

# Encuentros en la Biología

20  
AÑOS

## EL DONDIEGO DE NOCHE



Flores de *Mirabilis jalapa* en mosaico o quimeras de color blanco con máculas rosadas.  
Fotografía realizada por José Antonio López Sáez

Microbiología  
*Bacterias a dieta*

Genética  
*La endogamia en los Habsburgo*

Técnicas de biología molecular  
*Cuantificación en RT-qPCR*

## Equipo Editorial y Créditos

### Co-Editores:

**José María Pérez Pomares**

[jmperezp@uma.es](mailto:jmperezp@uma.es)

Biología del desarrollo y cardiovascular

*Coordinación general- Editoriales- Entrevistas*

**Miguel Ángel Medina Torres**

[medina@uma.es](mailto:medina@uma.es)

Biología Molecular y de Sistemas-Biofísica-  
Bioquímica

*Coordinación general- Editoriales- Monitor-  
Maquetación*

### Comité editorial ejecutivo:

**Alfredo de Hoces García-Galán**

[contacto@alfredodehoc.es](mailto:contacto@alfredodehoc.es)

Informática

*Calidad y difusión*

**Alicia Rivera**

[arivera@uma.es](mailto:arivera@uma.es)

Neurobiología

Enfermedades neurodegenerativas

*La imagen comentada*

**Ana Grande**

[agrande@uma.es](mailto:agrande@uma.es)

Genética-Virología, Patogénesis virales

*Rincón del doctorando*

**Antonio Diéguez**

[dieguez@uma.es](mailto:dieguez@uma.es)

Filosofía de la Ciencia

*A Debate- Recensiones*

**Carmen González**

[carmen.glez@uma.es](mailto:carmen.glez@uma.es)

Biblioteconomía

*Calidad y difusión*

**Enrique Viguera**

[eviguera@uma.es](mailto:eviguera@uma.es)

Genética- Genómica

*Monográficos- Eventos especiales*

**José Carlos Dávila**

[davila@uma.es](mailto:davila@uma.es)

Biología Celular -Neurobiología

*¿Cómo funciona?*

**Juan Carlos Aledo**

[caledo@uma.es](mailto:caledo@uma.es)

Bioquímica-Biología Molecular,

Energética de procesos biológicos

*Vida y obra*

**Juan Carlos Codina**

[jccodina@uma.es](mailto:jccodina@uma.es)

Microbiología, Educación Secundaria

*Ciencias en el Bachillerato*

**Luis Rodríguez Caso**

[caso@eelm.csic.es](mailto:caso@eelm.csic.es)

Técnicas de Laboratorio

*Calidad y difusión*

**Ramón Muñoz-Chápuli**

[chapuli@uma.es](mailto:chapuli@uma.es)

Biología del desarrollo y cardiovascular

*Coordinación de edición electrónica-*

*Foros de la Ciencia*

### Encuentros en la Biología

Revista de divulgación científica

(Indexada en Dialnet)

Edición electrónica:

[www.encuentros.uma.es](http://www.encuentros.uma.es)

Correspondencia a:

Miguel Ángel Medina Torres

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

29071 Málaga

[medina@uma.es](mailto:medina@uma.es)

[encuentrosenlabiologia@uma.es](mailto:encuentrosenlabiologia@uma.es)

Entidad editora:

Universidad de Málaga

Editado SIN FINANCIACIÓN INSTITUCIONAL

Depósito Legal: MA-1.133/94

ISSN (versión electrónica): 2254-0296

ISSN (versión impresa): 1134-8496

Diseño:

Raúl Montañez Martínez ([raulemm@gmail.com](mailto:raulemm@gmail.com))

### Comité editorial asociado:

**Alberto Martínez**

[almarvi@wanadoo.es](mailto:almarvi@wanadoo.es)

Educación Ambiental, E. para el Empleo

**Alejandro Pérez García**

[aperez@uma.es](mailto:aperez@uma.es)

Microbiología, Interacción planta-patógeno

**Enrique Moreno Ostos**

[quique@uma.es](mailto:quique@uma.es)

Ecología- Limnología

**Félix López Figueroa**

[felix\\_lopez@uma.es](mailto:felix_lopez@uma.es)

Ecología-Fotobiología, Cambio climático

**Francisco Cánovas**

[canovas@uma.es](mailto:canovas@uma.es)

Fisiología Molecular Vegetal, Bioquímica y

Biología Molecular

**Jesús Olivero**

[jesusolivero@uma.es](mailto:jesusolivero@uma.es)

Zoogeografía, Biodiversidad animal

**Juan Antonio Pérez Claros**

[johnny@uma.es](mailto:johnny@uma.es)

Paleontología

**Margarita Pérez Martín**

[marper@uma.es](mailto:marper@uma.es)

Fisiología Animal

Neurogénesis

**María del Carmen Alonso**

[mdalonso@uma.es](mailto:mdalonso@uma.es)

Microbiología de aguas, Patología vírica de  
peces

**María Jesús García Sánchez**

[mjgs@uma.es](mailto:mjgs@uma.es)

Fisiología Vegetal, Nutrición mineral

**María Jesús Perlés**

[Mjperles@uma.es](mailto:Mjperles@uma.es)

Geomorfología, Riesgos medioambientales

**M. Gonzalo Claros**

[claros@uma.es](mailto:claros@uma.es)

Bioquímica-Biología Molecular y Bioinformática

**Raquel Carmona**

[rcarmona@uma.es](mailto:rcarmona@uma.es)

Ecofisiología, Biorremediación

**Salvador Guirado**

[guirado@uma.es](mailto:guirado@uma.es)

Biología Celular -Neurobiología

**Trinidad Carrión**

[trinicar@uma.es](mailto:trinicar@uma.es)

Ciencias de la Salud, E-Salud

### Periodicidad:

Encuentros en la Biología publica 4 números  
ordinarios (uno por trimestre) y al menos 1  
número extraordinario monográfico al año.

El equipo editorial de esta publicación no se hace  
responsable de las opiniones vertidas por los autores  
colaboradores.

## EDITORIAL

En el presente número de *Encuentros en la Biología* continúa nuestra colaboración con el área de divulgación de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, publicando dos artículos originalmente publicados en la URL SEBBM Divulgación en Junio y Marzo de 2013: un artículo sobre *La reprogramación celular*, firmado por el prestigioso investigador del CNIO Manuel Serrano y un artículo titulado *El gen como medicamento: terapia génica*, firmado por José Carlos Segovia, del CIEMAT. Entre las secciones habituales, en el presente número de *Encuentros en la Biología* no faltan los *Foros de la ciencia*, *La imagen comentada* y la sección *Monitor* y vuelven a aparecer contribuciones para las secciones *Recensión* y *Cómo funciona*. En este último caso, un

investigador holandés y otro español firman un interesante artículo en el que repasan las principales recomendaciones para estandarizar los diversos pasos implicados en la tecnología de la PCR cuantitativa a tiempo real. Este número del verano de 2013 se completa con tres artículos de temática variada. El primero de ellos, acompañado de hermosas fotografías, analiza la genética del "color" en las flores del dondiego de noche. La segunda contribución comenta varios trabajos de investigación científica publicados en torno a la endogamia en los Habsburgo. Finalmente, el tercer artículo se centra en la microbiota intestinal.

Creemos conveniente terminar reproduciendo las últimas frases recogidas en esta sección en el número anterior (142, primavera

de 2013) de *Encuentros en la Biología*. Una vez más, queremos agradecer a todos nuestros colaboradores el envío desinteresado de sus contribuciones y animamos a investigadores, profesores y estudiantes a que sigan enviándonos artículos de divulgación, pues son imprescindibles para mantener esta iniciativa editorial. Cuando aludimos a *Encuentros en la Biología* como "nuestra revista" el posesivo "nuestra" es inclusivo, pues no sólo integra a sus editores sino también a todos sus colaboradores y lectores.

*Los co-editores*

25

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Editorial  | 25 |
| <i>Foros de la Ciencia</i>   | 26 |
| La imagen comentada  | 27 |
| <i>Monitor</i>   | 28 |
| SEBBM Divulgación  | 29 |
| <i>La genética del "color" en las flores del dondiego de noche</i> | 35 |
| De la Historia a la Genética. La endogamia en los Habsburgo        | 41 |
| <i>Recensión</i>   | 43 |
| Bacterias a dieta  | 45 |
| <i>¿Cómo funciona? En busca del "No" en la RT-qPCR</i>             | 47 |



## TEMIA en España:

Una tendencia de la moderna Biología es la de replantear los problemas no desde un punto de vista "vertical" (niveles de organización, biología molecular, celular, de organismos, de ecosistemas...) sino "horizontal", atendiendo a procesos que afectan a diferentes niveles. La transición epitelio-mesénquima (TEM) es uno de esos procesos. La TEM consiste en la transformación de células epiteliales, polarizadas, ancladas a una lámina basal y relativamente estables, en células mesenquimáticas con capacidad migratoria. Esto que podría parecer un fenómeno menor ha adquirido en los últimos años una extraordinaria importancia, ya que no sólo es un acontecimiento fundamental durante el desarrollo embrionario de los animales, sino que es imprescindible para comprender procesos patológicos tan relevantes como la metástasis tumoral o la fibrosis que afecta a muchos órganos. Además, la TEM ha intervenido de forma decisiva en la evolución de los animales,

generando innovaciones evolutivas tan importantes como la cresta neural de los vertebrados, y está implicada en procesos reparativos y regenerativos. La regulación a nivel genético y molecular de la TEM es un tema central en la investigación de muchos laboratorios a nivel mundial, y científicos españoles han destacado de forma especial en desvelar dichos mecanismos. Precisamente TEMIA (<http://www.mtci.com.au/TEMIA/TEMIA-Assn.html>), la Asociación Internacional para el estudio de la TEM fundada en 2002, se reúne este año por primera vez en España, concretamente en Alicante (13-16 de noviembre de 2013, <http://www.emtmeeting.org/>). Los más recientes avances en este campo serán presentados en esta interesante reunión.

Por ejemplo, el Primer Simposio de Conservación Internacional, con una atención especial hacia las colecciones de Historia Natural (Barcelona, 18-20 de septiembre, <http://www.igme.es/internet/novedades/congresos/1st%20Program-%20NEW.pdf>), la V Conferencia Internacional sobre Microbiología Ambiental, Industrial y Aplicada (BioMicroWorld2013, Madrid, 2-4 de octubre, <http://www.biomicroworld2013.org/>), un simposio internacional sobre Epigenómica del Cáncer (Sitges, 6-8 de octubre, <http://www.cell-symposia-cancerepigenomics.com>), Aquaculture 2013 (Las Palmas, 3-7 de noviembre, <http://www.aquaculture-conference.com/>) o el III Congreso Mundial de la Sociedad Internacional para la Preservación de la Fertilidad (Valencia, 7-10 de noviembre, <http://comtecmed.com/isfp/2013/Default.aspx>).

## Más reuniones internacionales en España:

Y ya que estamos con reuniones científicas para este otoño, tenemos otras citas de gran interés en el ámbito de la Biología.

Ramón Muñoz-Chápuli [chapuli@uma.es](mailto:chapuli@uma.es)



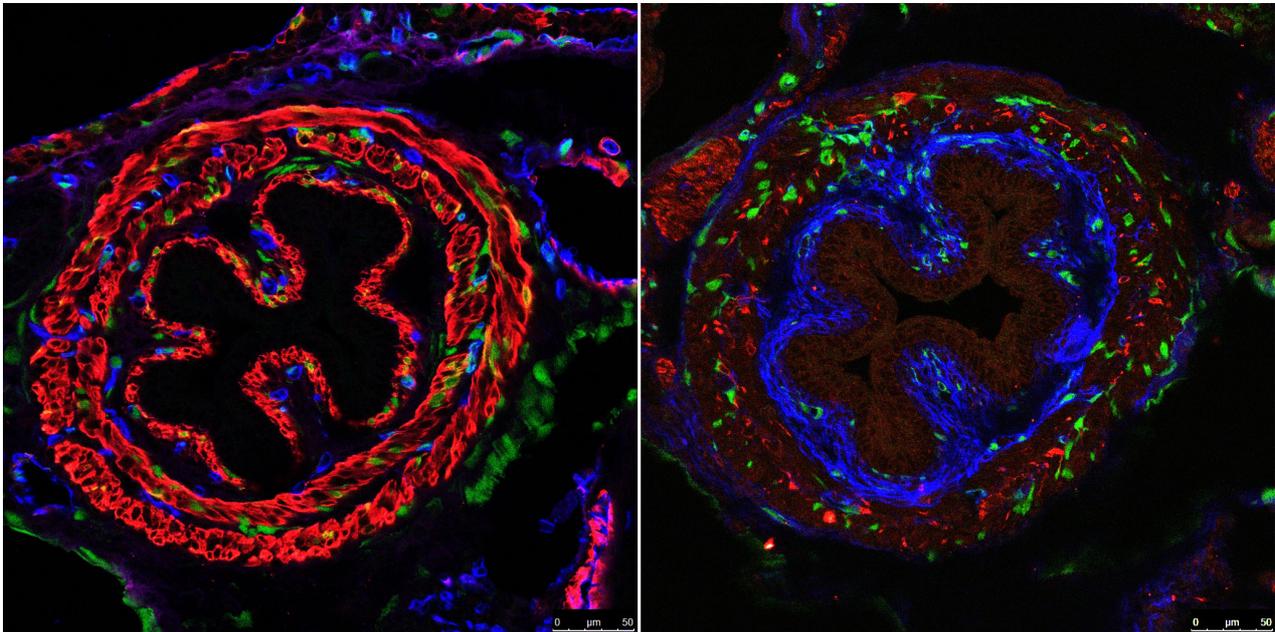
## Instrucciones para los autores

La revista **Encuentros en la Biología** es una publicación que pretende difundir, de forma amena y accesible, las últimas novedades científicas que puedan interesar tanto a estudiantes como a profesores de todas las áreas de la biología. Además de la versión impresa, la revista también se puede consultar en línea en <http://www.encuentros.uma.es/>. **Cualquier persona puede publicar en ella** siempre que cumpla las siguientes normas a la hora de elaborar sus originales:

- 1 Todos los manuscritos deberán ser inéditos o contarán con la autorización expresa del organismo que posea los derechos de reproducción. Además, deben tener alguna relación con el objetivo de la revista —los que simplemente reflejen opiniones se rechazarán directamente—.
- 2 El formato del documento puede ser RTF, SXW/ODT (OpenOffice) o DOC (Microsoft Word). Debido a las restricciones de espacio, la extensión de los mismos no debe superar las 1600 palabras; en caso contrario, el editor se reserva el derecho de dividirlo en varias partes que aparecerán en números distintos.
- 3 Cada contribución constará de un título, autor o autores, y su filiación (situación académica; institución u organismo de afiliación; dirección postal completa; correo electrónico; teléfono). Para diferenciar la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (\*, #, ¶, †, ‡) después del nombre de cada autor.
- 4 Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas y redondilla (ABC o Abc). Los de los genes y las especies aparecerán en cursiva (*ABC*, *Homo sapiens*). También se pondrán en cursiva aquellos términos que se citen en un idioma que no sea el castellano.
- 5 En esta nueva etapa, contemplamos aceptar que aquellos autores que no tengan el castellano como lengua materna puedan remitir sus manuscritos en inglés. Una vez aceptado, un resumen del mismo en castellano sería elaborado por el propio equipo editorial.
- 6 Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos, en blanco y negro puros, escalas de grises o color, deberán adjuntarse en ficheros independientes. Las figuras, las fórmulas y las tablas deberán enviarse en formatos TIFF, GIF o JPG, a una resolución de 300 dpi y al menos 8 bits de profundidad.
- 7 Cuando sean necesarias, las referencias bibliográficas (**cuatro** a lo sumo) se citarán numeradas por orden de aparición entre paréntesis dentro del propio texto. Al final del mismo, se incluirá la sección de Bibliografía de acuerdo con el estilo del siguiente ejemplo:  
Einstein Z, Zwestein D, DReistein V, Vierstein F, St. Pierre E. Saptial integration in the temporal cortex. Res Proc Neurophysiol Fanatic Soc 1: 45-52, 1974.  
En caso de citar un libro, tras el título deben indicarse la editorial, la ciudad de edición y el año.  
Si el texto principal no incluye referencias bibliográficas, se ruega a los autores que aporten 3-4 referencias generales "para saber más" o "para más información".
- 8 Aquellos que quieran contribuir a la sección **La imagen comentada** deberán remitir una **imagen original** en formato electrónico con una resolución mínima de 300 dpi y, en documento aparte, un breve comentario (de no más de **300** palabras) de la misma. Dicho comentario describirá la imagen, destacará la información relevante que aporta y/o especificará los procedimientos técnicos por los que se consiguió.
- 9 Los co-editores considerarán cualesquiera otras contribuciones para las diferentes secciones de la revista.
- 10 Envío de contribuciones: el original se enviará por correo electrónico a los co-editores ([medina@uma.es](mailto:medina@uma.es), [jmperezp@uma.es](mailto:jmperezp@uma.es)) o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al contenido de su contribución. Aunque lo desaconsejamos, también se pueden enviar por correo ordinario (Miguel Angel Medina, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España) acompañados de un CD. No se devolverá ningún original a los autores.



## LA IMAGEN COMENTADA



27

### Esófago de embrión de ratón.

Determinados modelos transgénicos de ratón permiten seguir el desarrollo de linajes celulares caracterizados por la expresión de un gen concreto. En este caso mostramos dos imágenes del esófago de un embrión de ratón (18,5 días de gestación) que expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen supresor del tumor de Wilms (*Wt1*). Este gen se expresa en una subpoblación de células mesodérmicas derivadas del epitelio celómico embrionario. El cruce de ratones *Wt1-Cre* con ratones portadores del gen reportero ROSA- YFP-fl/fl, permite obtener embriones en los que las células del linaje *Wt1* expresan de manera constitutiva la proteína fluorescente YFP (en verde en la foto). La diferenciación de estas células se puede estudiar con marcadores específicos. En la imagen de la izquierda un marcador de músculo liso (SMC alfa-actina) se muestra en rojo, y un marcador endotelial (PECAM-1) en azul. En la imagen de la derecha, el receptor c-Kit del *stem cell factor* se marca en rojo, y el antígeno CD34, expresado por un tipo de fibroblastos, en azul.

#### Elena Cano

Investigadora predoctoral en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga

#### Rita Carmona

Investigadora postdoctoral en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga

#### Ramón Muñoz-Chápuli

Catedrático del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga  
[chapuli@uma.es](mailto:chapuli@uma.es)

### El Derecho y la Neurociencia:

La revista *Nature Reviews Neuroscience* ha iniciado en su número de Julio de 2013 la publicación de una serie de artículos que exploran las interacciones entre la neurociencia y el derecho. Dichas interacciones son bidireccionales. Por una parte, los avances en el conocimiento de los procesos neuronales que subyacen a los patrones conductuales hacen necesario discutir la relevancia que estos descubrimientos pueda tener para el sistema judicial. Por otra parte, es evidente que la legislación puede influenciar la investigación en neurociencias, como ponen de manifiesto los casos de la investigación con células madres y con compuestos psicoactivos.

En el momento del cierre de la edición de este número de *Encuentros en la Biología* hay ya disponibles dos artículos de esta serie. En el número de Julio de *Nature Reviews Neuroscience* se publicó el artículo titulado *The influence of neuroscience on US Supreme Court decisions about adolescents' criminal culpability*. En el número de Agosto ha aparecido el segundo artículo, titulado *Effects of Schedule I drug laws on neuroscience research and treatment innovation*.

Esta iniciativa editorial refleja un aumento del interés en estas relaciones interdisciplinarias. Entre otras propuestas académicas en este ámbito, el *Baylor College of Medicine* mantiene activa una *Initiative on Neuroscience and Law*.

Enlaces: <http://www.nature.com/nrn/series/neurosciencelaw/index.html>

<http://www.neulaw.org>

### Mapas del cerebro:

El número de Junio de 2013 de la revista *Nature Methods* presenta una interesante colección de artículos y comentarios en el formato *Focus* (ampliamente utilizado por *Nature Publishing Group*) con el atractivo y actual tema *Focus on Mapping the Brain*. La serie comienza con un editorial específico y el editorial del número de Junio de la revista, titulado *Why mapping the brain matters*. En este editorial se defiende que la obtención de mapas anatómicos e información molecular acerca de circuitos cerebrales y sus patrones de actividad en relación con comportamientos específicos es una tarea esencial para una mejor comprensión de la función cerebral.

A continuación, se ofrece una perspectiva histórica con el título *From the connectome to brain function*. Las autoras de este texto formulan una pregunta inicial: ¿Que información se necesita además de los diagramas de conectividad para entender la función cerebral? Basándose en los circuitos neuronales de invertebrados cuyas conectividades ya son conocidas, las autoras resaltan la importancia de la dinámica neuronal y de la neuromodulación y muestran la existencia de circuitos paralelos.

La serie sigue con dos comentarios, titulados *Making sense of brain network data* y *Why not connectomics?* A estos comentarios les siguen dos artículos más extensos en formato *Perspectives*. El primero lleva por título *Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction*. El objetivo de su autor es resumir y cuantificar los retos para el análisis de datos en la conectómica con resolución celular y describir algunas soluciones actuales a estos retos. El segundo artículo se titula *CLARITY for mapping the nervous system*. CLARITY es una nueva tecnología que se puede usar para transformar tejidos biológicos intactos en una forma híbrida en la que diversos componentes tisulares son sustituidos por elementos

exógenos para aumentar la accesibilidad y funcionalidad del sistema. Esta tecnología fue públicamente descrita por primera vez en un artículo que apareció como *advanced online publication* el pasado 10 de Abril de 2013 en la revista *Nature* (*Chung et al., Structural and molecular interrogation of intact biological systems, Nature AOP, doi:10.1038/nature12107*). En el artículo se describe el potencial uso de CLARITY para mapear del sistema nervioso, analizando sus limitaciones, retos y oportunidades.

La serie se completa con dos revisiones y un artículo tipo *Resource*. Los títulos de las dos revisiones son *Mapping brain circuitry with a light microscope* e *Imaging human connectomes at the macroscale*. En el artículo tipo *Resource*, el grupo de investigación que en 2007 publicó la estrategia de transgénesis denominada *Brainbow* (*Livet et al., Nature 450: 56-62, 2007*) presenta ahora una versión mejorada de *Brainbow toolbox*, una colección que incluye líneas transgénicas, plásmidos y vectores víricos con capacidades mejoradas y nuevas en relación con las construcciones originales. Está previsto que en la sección *¿Cómo funciona?* del número 144 de *Encuentros en la Biología* se publique una contribución que describe precisamente el sistema *Brainbow* para el estudio del mapa conectómico neural a gran escala.

Enlace: <http://www.nature.com/nmeth/focus/brainmapping/index.html>



## La Ciencia al alcance de la mano 29

Tenemos el placer de presentar en la revista "Encuentros en la Biología" dos contribuciones seleccionadas entre las publicadas *on-line* en la sección «La Ciencia al alcance de la mano» de la web de la SEBBM, sección auspiciada por el Programa de Divulgación de la SEBBM, una de las sociedades científicas más influyentes en España. Los originales de estos artículos aparecieron publicados en Junio y Marzo de 2013, respectivamente. Estos y más artículos podréis encontrarlos en:

([http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos\\_10](http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10)).

Coordinadores: José Manuel Bautista, Catalina Lara, María de los Ángeles Pajares, Gemma Rodríguez-Tarduchy e Isabel Varela Nieto.



Autor: Manuel Serrano  
Programa de Oncología Molecular  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

### La reprogramación celular

**Resumen:** Se está empezando a entender la plasticidad celular y a manipularla de manera controlada. Este nuevo campo de investigación puede suponer una revolución para la medicina celular regenerativa. Aquí repaso algunos de los temas pendientes, incluida la posible relación entre plasticidad celular y cáncer.

**Summary:** Scientists are starting to understand the plasticity of cellular identity and to manipulate it in a controlled manner. This emerging field of research may open new strategies in regenerative medicine. Here, I discuss some of the pending issues, including the possible connection between cellular plasticity and cancer.

Hace tan sólo 6 años, Shinya Yamanaka sorprendió a la comunidad científica al descubrir que era posible convertir cualquier tipo celular diferenciado en células madre embrionarias (Takahashi and Yamanaka, 2006). De un plumazo se eliminaron todas las barreras técnicas y éticas que habían frenado la investigación sobre este tipo de células humanas, y a la vez comenzó un campo de investigación fascinante sobre la plasticidad de las células.

Hoy día es posible convertir células de piel (por ejemplo, fibroblastos de la endodermis que suelen ser las células más usadas por su fácil acceso y cultivo) en tipos celulares tan diversos como neuronas, hepatocitos o cardiomiocitos, y esto puede hacerse directamente, sin pasar por el estado de célula madre embrionaria, es lo que se llama “reprogramación directa” (Ladewig et al., 2013). Sin embargo, la “reprogramación embrionaria” original de Yamanaka sigue siendo el método más prometedor para una futura medicina celular regenerativa debido a que las células madre embrionarias se multiplican con enorme rapidez y facilidad y mantienen intactas sus propiedades y su integridad genética, algo que no pasa con los tipos celulares adultos que no crecen con la misma rapidez y que tienen tendencia a acumular alteraciones genéticas.

En las siguientes líneas repaso algunos de los temas pendientes que concentran gran parte de la investigación en el campo de la “reprogramación embrionaria” y que afectan en igual medida a la “reprogramación directa”.

**Reprogramación química.** Una limitación muy importante de la reprogramación celular, tanto la embrionaria como la directa, es el hecho de que requiere introducir genes exógenos en las células parentales. Estos genes son en su mayoría factores de transcripción y muchos de ellos tienen propiedades oncogénicas. Además, estos factores sólo se pueden introducir de manera eficiente y poco inmunogénica usando vectores de tipo retroviral que tienen la propiedad de integrarse al azar en el genoma y esto se sabe que conlleva un riesgo de producir lesiones oncogénicas. Por estos motivos hay un enorme interés en conseguir la reprogramación usando exclusivamente suplementos en los medios de cultivo, tanto péptidos activos como factores de crecimiento o citoquinas, como compuestos químicos que imiten la función de los factores de reprogramación genéticos (Li et al., 2012). Se ha avanzado mucho en esta dirección. Por ejemplo, algunos de los factores originales de Yamanaka se han podido sustituir por compuestos químicos, se han descubierto otros compuestos químicos que potencian la reprogramación, pero aún no se ha conseguido la “reprogramación embrionaria” completa sin usar factores genéticos.

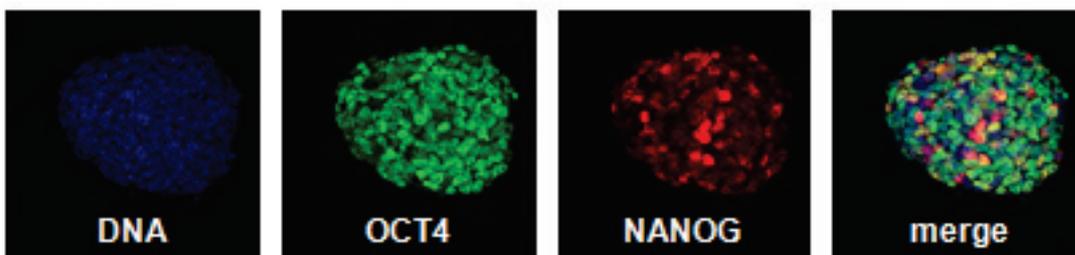
**Reprogramación por pasos.** Hasta ahora sólo es posible la “reprogramación embrionaria” cuando se introducen simultáneamente todos los factores genéticos (generalmente cuatro). Sin embargo hay muchas sospechas de que la reprogramación no ocurre en un solo paso (Polo et al., 2012). De hecho, la reprogramación suele implicar un plazo de tiempo extrañamente dilatado, normalmente 2 semanas. Qué pasa durante todo este tiempo es algo que se está empezando a diseccionar pero que todavía es muy oscuro. Uno de los grandes objetivos es conseguir una reprogramación por etapas, con sucesivas paradas en estados intermedios estables, pero esto aún no se ha conseguido. El deconstruir la reprogramación en etapas permitiría analizar separadamente cada etapa y optimizarla.

**Reprogramación eficiente.** La baja eficiencia del proceso de reprogramación es una dificultad añadida para la caracterización bioquímica del proceso de reprogramación. Las eficiencias más altas de reprogramación conseguidas están en el orden del 10% (es decir, una de cada diez células tratadas alcanzan el estado de célula madre embrionaria, mientras que el resto son procesos abortivos que terminan en apoptosis o senescencia celular). Nosotros hemos contribuido a este problema identificando a los genes supresores de tumores p16Ink4a, p19Arf y p53 como barreras importantes para la reprogramación (Li et al., 2009; Marion et al., 2009). Estos genes se pueden silenciar transitoriamente y de este modo conseguir eficiencias del 10% sin por ello perder la funcionalidad posterior de estos genes supresores.

**Reprogramación intermedia.** Las células madre embrionarias, a pesar de sus ventajas, como crecer rápida y establemente, presentan algunas limitaciones. Una de ellas es la dificultad, todavía no resuelta, de diferenciarlas *in vitro* de manera controlada y homogénea (es decir, conseguir diferenciaciones de todas las células parentales y únicamente en el tipo celular deseado). Una solución a este problema podría ser el renunciar a la reprogramación embrionaria y conformarse con reprogramaciones parciales o intermedias que hipotéticamente podrían ser ventajosas. Estos estadios intermedios no están bien caracterizados ni son estables, pero sí que hay evidencias experimentales de que una exposición transitoria de las células parentales a los factores de reprogramación las convierte por un tiempo en un estado “plástico” desde el cual es posible dirigir su diferenciación de manera más eficiente (Kurian et al., 2013). Como quizás se pueda intuir por lo anterior, una gran pregunta aún sin resolver es si la reprogramación embrionaria recapitula “marcha atrás” los procesos de diferenciación, o si por el contrario es un camino totalmente independiente que lleva al punto de partida embrionario por un “atajo”.

**Reprogramación y cáncer.** Finalmente, aún hay muchas preguntas pendientes sobre qué papel juega la reprogramación celular en el cáncer (Suva et al., 2013). Hay dos visiones no necesariamente en conflicto sobre este punto. Según una de ellas, el cáncer implica un proceso aberrante e incompleto de reprogramación (reprogramación oncogénica). Según otra visión, inducir la reprogramación en células cancerosas puede permitir a la célula tumoral reconducirse por un proceso de diferenciación que cancelaría el fenotipo tumorigénico (reprogramación anti-oncogénica). Todavía se sabe demasiado poco como para aventurar si alguna de estas posibilidades será relevante.

31



**Figura: Reprogramación de células de piel.** La imagen corresponde a una colonia de células embrionarias obtenidas por reprogramación de células de la piel. Las células fueron teñidas con varios compuestos fluorescentes. El núcleo de las células (DNA, azul), los niveles de la proteína de pluripotencia OCT4 (verde, homogéneos en todas las células), y los niveles de la proteína de pluripotencia NANOG (rojo, heterogéneos). La heterogeneidad de NANOG refleja estados transitorios de la células madre: altos niveles de NANOG favorecen la autorrenovación; bajos niveles de NANOG favorecen la diferenciación. La imagen de la derecha muestra la mezcla (*merge*) de las tres imágenes precedentes. El experimento fue realizado por Lucía Morgado-Palacín (CNIO).

### SEMBLANTE BIOGRÁFICO DEL AUTOR

Manuel Serrano se doctoró en la Universidad Autónoma de Madrid (1991). Entre 1992 y 1996 trabajó en el *Cold Spring Harbor Laboratory* (Nueva York, USA), donde caracterizó el gen p16. Volvió a España en 1997 para dirigir un grupo de investigación en el Centro Nacional de Biotecnología, y a partir de 2003 en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), donde actualmente es Director del Programa de Oncología Molecular. Es reconocido internacionalmente como uno de los líderes en el campo de la supresión tumoral. Su grupo fue pionero en la generación de ratones modificados genéticamente para que sean resistentes al cáncer, y también en la conexión entre los genes protectores del cáncer y la protección contra el envejecimiento. Más recientemente, su laboratorio ha hecho importantes descubrimientos sobre el papel que tienen los genes protectores del cáncer en la reprogramación celular. Sus trabajos han acumulado 17.000 citaciones, incluidas 22 publicaciones en las revistas *Nature*, *Science* y *Cell*.

## REFERENCIAS

1. Kurian, L., Sancho-Martinez, I., Nivet, E., Aguirre, A., Moon, K., Pendaries, C., Volle-Challier, C., Bono, F., Herbert, J.M., Pulecio, J., et al. (2013). Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods* 10, 77-83.
2. Ladewig, J., Koch, P., and Brustle, O. (2013). Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 225-236.
3. Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136-1139.
4. Li, W., Jiang, K., and Ding, S. (2012). Concise review: A chemical approach to control cell fate and function. *Stem Cells* 30, 61-68.
5. Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
6. Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., et al. (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617-1632.
7. Suva, M.L., Riggi, N., and Bernstein, B.E. (2013). Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 339, 1567-1570.
8. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

32



Autor: José Carlos Segovia  
Unidad de Diferenciación y  
Citometría, CIEMAT

## El gen como medicamento: terapia génica

**Resumen:** Entendemos terapia génica como la introducción de material genético con capacidad de expresar la versión correcta de una proteína en células donde el gen es deficiente. Este procedimiento ha servido para corregir enfermedades genéticas hereditarias en modelos animales y también en humanos. La Terapia Génica es hoy una realidad terapéutica.

**Summary:** *Gene Therapy can be defined as the introduction of genetic material with the ability to express the corrected version of a protein in cells where the endogenous gene is deficient. This process has been used to correct genetic diseases in animal models and in humans, being a therapeutic option nowadays.*

La Terapia Génica (TG) surge como concepto desde el momento en que se conocen las enfermedades con origen en defectos en genes del propio individuo. Estos genes defectuosos producirían proteínas defectuosas que serían las responsables del origen de la enfermedad. La sustitución del gen defectuoso por su versión normal, libre de mutaciones, curaría la enfermedad. Importantes dificultades hacían difícilmente abordable la TG. Era necesario i) conocer el gen responsable de la enfermedad y su versión "normal"; ii) introducir el material en el núcleo de células que lo requiriesen; iii) intercambiar el gen enfermo por la versión correcta; iiiii) y hacerlo en todas las células que requiriesen dicha proteína. Buena parte de las bases que han permitido que hoy la TG sea una realidad terapéutica se asenta-

ron en la década de los 80 del siglo pasado. Un importante desarrollo tecnológico a nivel mundial, no exento de importantes tropiezos, han hecho realidad la idea de la TG (1,2). Vamos a ver como se han ido superando los diferentes retos:

**Conocer el gen responsable.** Este ha sido y es uno de los objetivos principales de la Bioquímica y la Biología Molecular, Más recientemente, con la secuenciación del genoma completo humano disponemos de todo el libro completo de genes cuya función habrá que ir asignando paulatinamente (en la actualidad sólo conocemos la funcionalidad de un 20-30% de ellos). Aunque cualquier enfermedad de origen genético podría ser tratada mediante TG, en la práctica hay algunas limitaciones. Las enfermedades candidatas son aquellas que se originan por defectos en un único gen. Ejemplos claros de estas son las inmunodeficiencias (las que originan los llamados “niños burbuja”), anemias, enfermedades oculares, enfermedades musculares, etc. Además, dicho gen, o mejor, el mensajero responsable de la traducción a proteína debe tener un número de pares de bases (pb) en torno a las 5000 pb, dado que las herramientas disponibles para su introducción no pueden dar cabida a tamaños mayores, de momento. Introducir el gen en el núcleo de las células enfermas. Aunque se han desarrollado sistemas de introducción de material genético en células eucariotas utilizando diversos métodos, la evolución ha creado un sistema sofisticado y eficaz de introducción de material genético en las células, los virus. En los vectores virales se sustituye parte de sus propios genes por el gen o genes “terapéuticos”. La proteína o proteínas virales eliminadas son aportadas de forma exógena. Las principales familias de virus utilizadas son los retrovirus, los adenovirus, los virus adenoasociados, los herpesvirus y los Sendai virus, entre otros.

33

**Intercambiar el gen enfermo por el correcto.** De nuevo el sistema más adecuado ha sido la utilización del ciclo viral de determinados virus, los retrovirus, que tienen la capacidad de integrarse en el genoma de la célula que infectan. No obstante, en lugar de sustituir el gen enfermo se introduce la versión correcta que complementa el defecto. Aunque en un principio se pensaba que la inserción era al azar y con mayor probabilidad sobre zonas no codificantes se ha demostrado que lo que ocurre es lo contrario, produciéndose un fenómeno llamado mutagénesis insercional. Inserciones en oncogenes pueden generar su desregulación y producir una célula tumoral. Este fenómeno ha ocurrido en algunos de los ensayos clínicos que se han llevado a cabo hasta este momento (3). No obstante, nuevos vectores con sistemas de inserción diferentes solventarán este efecto adverso pronto.

**Llegar a las células que necesitan ser corregidas.** Tan importante es conocer los mejores sistemas virales para llevar a cabo la transferencia genética, como conocer la enfermedad que se está tratando de curar, y las células más adecuadas para llevar a cabo la transferencia. En el caso particular de las enfermedades genéticas de la sangre, la transferencia génica sobre las células madre hematopoyéticas, encargadas de mantener el número adecuado de células sanguíneas durante toda la vida del organismo, es la más adecuada ya que una vez corregida produciría células sanas. La forma de poner en contacto las células diana y los vectores virales puede ser ex vivo, extrayendo las células de interés y realizando la transferencia génica in vitro, o inyectando los vectores virales directamente en el organismo. La transferencia ex vivo optimiza la transferencia con la célula diana, aunque puede alterar sus características debido a la manipulación. La transferencia in vivo no altera el tejido o la célula diana pero dificulta la llegada del vector viral al lugar de interés e incrementa los posibles efectos tóxicos del vector viral al inyectarlo in vivo en grandes cantidades.

**Algunos ensayos en marcha.** En la actualidad hay numerosos ensayos clínicos utilizando vectores virales para la corrección de enfermedades genéticas (Tabla 1). Aunque en algunos de ellos se han producido efectos adversos derivados de la transferencia génica, estos han podido ser controlados. Nuevos vectores ya en uso minimizarán estos efectos adversos y harán que la TG sea una alternativa terapéutica en enfermedades genéticas.

| Compañía<br>(localización)      | Terapia  | Indicación                        | Fase de desarrollo |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|--------------------|
| <b>Gammaretrovirus</b>          |  |                                   |                    |
| San Raffaele<br>(Milan, Italia) | ADA-SCID TG: Células madre hematopoyéticas transducidas con un vector expresando el gen ADA                                  | Inmunodeficiencias primarias      | Fase 1/2           |
| Ribozyme<br>(Boulder, CO, USA)  | Células madre hematopoyéticas transducidas con un vector expresando múltiples ribozimas                                      | Linfoma No-Hodgkin's, HIV/SIDA    | Fase 2             |
| Tocagen (San Diego, CA)         | Toca-511: Retrovirus competente en replicación expresando la prodruga activada por citosina desaminasa inyectado en el tumor | Glioma                            | Fase 1/2           |
| <b>Lentivirus</b>               |  |                                   |                    |
| Bluebird Bio                    | LentiGlobin: Introduce el gen correcto de las globinas en células madre hematopoyéticas                                      | B-thalassemia y anemia falciforme | Fase 1/2           |
| Lentigen                        | LG-740: Células T tratadas ex vivo con lentivirus que expresan un receptor de células T quimérico                            | Leucemia de células B y linfoma   | Fase 1             |
| Oxford Biomedica                | ProSavin: Lentivirus que expresa tres genes necesarios para la biosíntesis de dopamina inyectado en el estriado del cerebro  | Enfermedad de Parkinson           | Fase 1/2           |

**Tabla: Algunos ensayos clínicos en marcha con virus integrativos.**  
(Extraído de la referencia 4)

### SEMBLANTE BIOGRÁFICO DEL AUTOR

José Carlos Segovia es Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Sus estudios predoctorales se centraron en el estudio de la patogénesis del parvovirus murino MVMi en células progenitoras hematopoyéticas. Durante su periodo post-doctoral se especializó en el desarrollo de herramientas de terapia génica para el tratamiento de enfermedades hematológicas hereditarias, así como en el estudio de las capacidades de diferenciación de células hematopoyéticas. Hoy es el Jefe de la Unidad de Diferenciación y Citometría del CIEMAT y Secretario de la Junta Rectora de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. Entre sus líneas de trabajo se pueden mencionar el desarrollo de herramientas de Terapia Génica para el tratamiento de la Deficiencia en Piruvato Quinasa y para el tratamiento de la anemia de Fanconi; los estudios de reprogramación a células pluripotentes inducidas de células derivadas de pacientes con estas enfermedades y su corrección genética; y el estudio de fenómenos de reprogramación directa.

### REFERENCIAS

1. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/genesandgenetherapy.html>
2. [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml)
3. <http://www.enfermedadesraras.es/noticia.php?id=831>
4. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. Nat Biotechnol 2011;29:121-128.

# La genética del 'color' en las flores del dondiego de noche (*Mirabilis jalapa* L.)

José Antonio López Sáez

Científico Titular, Grupo de Investigación "Arqueobiología"  
Instituto de Historia, Centro de Ciencias Humanas y Sociales, CSIC  
Albasanz 26-28, 28037 Madrid.  
[joseantonio.lopez@cchs.csic.es](mailto:joseantonio.lopez@cchs.csic.es)

## Introducción

El color en las flores se debe a la existencia de ciertos pigmentos determinados genéticamente por herencia, aunque éste ha ido evolucionando, por selección natural, para adecuarse a las preferencias de sus polinizadores. El color floral, desde los pioneros trabajos de Gregor Mendel en la segunda mitad del siglo XIX, tiene un interés coevolutivo entre las plantas y sus vectores de polinización que es muy evidente; al que se suma hoy el derivado del comercio en floristerías de flores cada vez más bellas y coloreadas. En este sentido, el dondiego de noche (*Mirabilis jalapa*) es un caso paradigmático, un *rara avis* en este mundo de la genética del color.

El dondiego es una herbácea perenne de la familia Nyctaginaceae, con raíz tuberosa que le permite resistir periodos de frío o sequía, de hasta 1.5 m de altura, tallos muy ramificados, hojas opuestas, pecioladas y tendencia ovada. Sus flores son hermafroditas y aparecen en cimas ramosas terminales muy fragantes. En su base, cada flor consta de un involucre de 5 lóbulos a modo de cáliz, aunque éste se prolonga en un perianto petaloideo coloreado infundibuliforme, a modo de campana o trompa con un tubo estrecho plegado de 2-3 cm. Consta de 5 estambres soldados en su base. El fruto (antocarpio), de 5-9 mm, es negro, rugoso o verrucoso, y se asemeja a una granada.

Procedente de las zonas tropicales de América Central y del Sur (Perú, México), aunque su origen concreto es todavía confuso, el dondiego se ha naturalizado en todas las regiones templadas y tropicales del planeta. Parece que fue exportado por los españoles a Europa en el siglo XVI. Es una especie ornamental de reconocidísimo prestigio, tanto por sus vivos y variados colores como por su dulce fragancia, de ahí que haya sido cultivada con profusión, asilvestrándose fácilmente en baldíos, bordes de carreteras o caminos. En la península Ibérica es frecuente en provincias cálidas o templadas, subespontánea o naturalizada, ya sea cerca de la costa o más raramente hacia el interior. La belleza y singularidad de sus flores, en todos los

sentidos, ha dado lugar a multitud de denominaciones vernáculas: arbolera, bella de noche, buenas noches, buenas tardes, clavellina, diego, diego de noche, dompedro, dondiego, dondiego de noche, donjuan de noche, falsa jalapa, galán de noche, hierba triste, jazmines de México, linda tarde, maravilla, maravilla de Indias, maravilla del Perú, maravilla de noche, noches, pepicos, periquitos, sampedros, suspiros y trompetilla.

Años antes de sus estudios sobre la variegación foliar, un ejemplo de herencia citoplásmica, Carl Correns (1) había realizado cruces entre diversas variedades de color floral de *Mirabilis jalapa*. Descubrió que si cruzaba plantas de flores rojas con otras de tonalidades blancas, la primera generación daba individuos híbridos de flores rosadas; mientras que la segunda generación ofrecía una progenie completamente alocada: flores rojas, blancas y rosas. Tales experimentos contradecían la primera ley de Mendel, según la cual si se cruzan dos variedades puras homocigotas de una misma especie, una dominante (AA) y otra recesiva (aa), toda la progenie es igual y heterocigota (Aa), fenotípicamente parecida a su progenitor dominante. A pesar del gran interés que por entonces tuvieron tales investigaciones, que supusieron el redescubrimiento del trabajo del denostado Mendel, Correns no fue especialmente cuidadoso a la hora de discernir tonalidades en un mismo color.

A finales de la primera década del siglo XX, Dorothea C.E. Marryat (2) estableció "clases de colores" en el dondiego de noche, gracias a que fue capaz de desentrañar el genotipo del material utilizado en sus investigaciones. Años más tarde se describieron el "rosa intenso" homocigoto y el "rosa claro" heterocigoto, las primeras variedades verdaderamente rosas descritas en la literatura genética (3). El "rosa" de Correns no era tal, sino una variedad magenta, entre el rojo púrpura y el fucsia. El maravilloso trabajo de Hiram M. Showalter (4) supuso un antes y un después en la investigación hereditaria del color en el dondiego de noche. Este investigador, de la Universidad de Virginia (EE.UU.), demostró que *Mirabilis jalapa* es una especie muy ade-

cuada para cruzamientos, pues su polen es tan grande (casi 200 micras de diámetro) que puede utilizarse individualmente para fertilizar los estigmas, además de ser capaz de autopolinizarse. Ello le llevó a establecer variedades "puras" de color: carmesí (carmín o grana), amarillo, blanco dominante, blanco recesivo, rosa intenso, salmón, violeta claro, violeta oscuro y ocre oscuro.

### Bases genéticas del color en las flores del dondiego

En el caso del dondiego, la herencia del color, aun dependiendo de genes del núcleo celular, es del tipo "dominancia incompleta o intermedia", ya que no hay dominancia de un color sobre otro, sino que el híbrido resultante es intermedio entre sus progenitores.

Los colores de las flores del dondiego de noche se deben a la acción e interacción de dos genes, uno que controla el color de base y otro que lo modifica. De acuerdo a los genetistas que han trabajado con esta especie (2, 3), el primero de ellos tiene dos posibles alelos (*Y* da como color de base el amarillo, e *y* ausencia de color de base); y el segundo cuenta con una serie de alelos, no sólo dos (*R* que modifica *Y* a rojo, con *y* produce flores blancas; *Rp* que también traduce *Y* a rojo y con *y* resulta flores rosadas; *r* que no modifica *Y*; *rp* tampoco modifica *Y* pero con el alelo *y* conduce a tonos salmón, siendo domi-

nante sobre *r*; y *Rpl*, alelo que domina incompletamente sobre *R* y *Rp* y presumiblemente sobre *r* y *rp*, responsable de colores violáceos brillantes) (Tablas 1 y 2). Hagamos todos los cruces que se nos ocurran, entre variedades homocigotas y heterocigotas del dondiego, e imaginemos el sinfín de tonos de color que podríamos conseguir (Figura 1), algunos por descubrir.

Antes de conocerse el factor *Rp-rp* resultaba sencillo identificar los individuos híbridos de una población, excepto los blancos. Tras descubrirse es imposible diferenciar clases de colores, salvo con experimentos de cultivo. Hay flores de color amarillo, salmón y carmesí en ejemplares homocigotos y heterocigotos, incluso con distinta intensidad de color. En presencia del alelo *R* el amarillo *Y* se transforma en rojo, aunque si comparte alelos tipo *r* o *rp* se consiguen tonos más anaranjados o violáceos. Cuando *Y* se acompaña de *y* los tonos son más claros que en las variedades homocigotas *YY*, de aquí que tiendan hacia magentas rosados con *R* o rojos rosados con *Rp*, o hacia amarillo pálido con *r* y *rp*. Los ejemplares que cuentan con el factor *Rp* derivan a rosas o violetas claros, y aquéllos con *R* a rojizos. El factor *Rpl* es poco conocido, y aunque también tiene el poder de modificar *Y* a rojo, suele proporcionar tonalidades púrpuras más intensas (4).

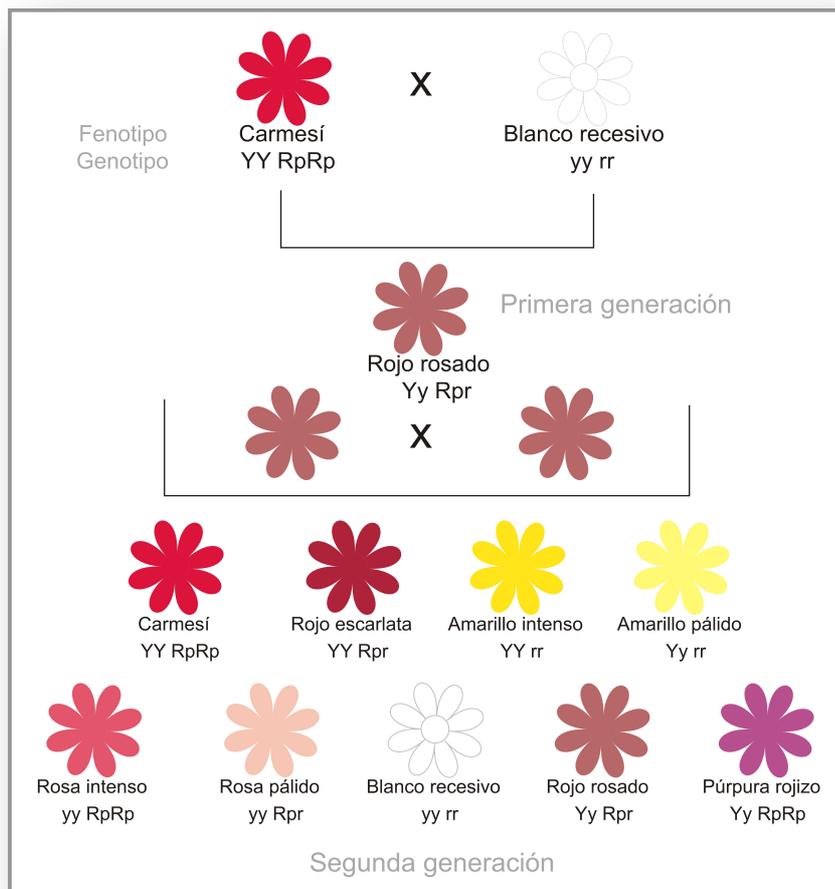
Teniendo en cuenta sus genotipos y el color de las flores, se conocen al menos 9 grupos de heterocigotos (Tabla 2), aunque dependiendo de las condiciones ambientales (luz solar, suelos, etc.), dos plantas del mismo genotipo pueden

| Color (fenotipo) | Genotipo             |
|------------------|----------------------|
| Carmesí          | <i>YYRR - YYRpRp</i> |
| Amarillo         | <i>YYrr - YYrprp</i> |
| Blanco dominante | <i>yyRR</i>          |
| Blanco recesivo  | <i>yyrr</i>          |
| Rosa intenso     | <i>yyRpRp</i>        |
| Salmón           | <i>yyrprp</i>        |

Tabla 1: Variedades homocigotas de color de flor en el dondiego de noche.

| Color (fenotipo)                | Genotipo                              |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Carmesí                         | <i>YYRRp</i>                          |
| Amarillo intenso                | <i>YYrrp</i>                          |
| Amarillo claro                  | <i>Yyrr - Yyrrp - Yyrprp</i>          |
| Blanco                          | <i>yyRr</i>                           |
| Rosa claro a intenso            | <i>yyRRp - yyRpr - yyRrp - yyRprp</i> |
| Salmón                          | <i>yyrrp</i>                          |
| Naranja rojizo a rojo escarlata | <i>YYRr - YYRrp - YYRpr - YYRprp</i>  |
| Magenta rosado a rojo rosado    | <i>YyRr - YyRpr - YyRrp - YyRprp</i>  |
| Magenta a púrpura rojizo        | <i>YyRR - YyRRp - YyRpRp</i>          |

Tabla 2: Variedades heterocigotas de color de flor en el dondiego de noche.



**Figura 1:** Ejemplo de cruzamiento entre dos variedades homocigotas del dondiego de noche y entre sí de la variedad heterocigota obtenida en la primera generación. Se puede observar que la segunda generación resulta enormemente variada en cuanto a colores de flor.

variar en la intensidad de su tonalidad. Las flores jóvenes suelen ser más pálidas, oscureciéndose al madurar, e incluso algunas llegan a cambiar de color por una transformación de sus pigmentos: amarillas a rosa intenso, blancas a violetas claro.

Las variedades puras más comunes (Tabla 1) son la amarilla, blanco dominante y carmesí. En las amarillas existe un pigmento amarillo soluble que da el color de base, aunque algunos autores sostienen que todos los dondiego proceden de una variedad carmesí, que aparentemente contiene una mezcla de un pigmento magenta y el otro amarillo, que por pérdida del primero da lugar a la mayoría de colores y de ambos a las variedades blancas. Las flores de *M. jalapa* no están formadas por verdaderos pétalos, sino por elongaciones modificadas de los sépalos (perianto petaloideo) que adquieren forma de una campana tubular. Tanto el tubo como los márgenes de la flor y su zona central estrellada tienen una coloración menos intensa que el resto. Así, en las flores rojas el tubo es magenta apagado; mientras que en las amari-

llas, blancas y rosas es del mismo color pero más pálido y verdoso.

## La quimera del dondiego

Si hasta ahora la genética de *Mirabilis jalapa* no era ya lo suficientemente compleja, a lo dicho se suma que en los mismos pies de planta pueden encontrarse flores de diferentes colores simultáneamente, e incluso que algunas flores, a nivel individual, estén salpicadas de varios. Ello implica que en un mismo ejemplar hay zonas o células con ADN diferente. Esto suele ocurrir en ramas terminales, indicando que se produjo algún tipo de mutación somática durante su crecimiento, produciendo un nuevo color que en ocasiones aparece formando mosaicos, en los cuales un grupo de células tiene un genotipo diferente al

resto. A mayor tiempo pasado desde la mutación, más flores "quimeras" en el dondiego. Las ramas con flores normales no se habrán visto envueltas en la mutación, por lo que ésta no se transmite a la descendencia.

No es raro encontrar plantas de flores blancas con algunas teñidas de rosa (*R* muta a *Rp* o *rp*) o púrpura (*R* a *Rpl*), carmesís con flores mutantes anaranjadas (*R* muta a *r*), etc. Muchas son las posibilidades dependiendo de los alelos concernientes en la mutación, aunque la probabilidad parece ser mayor en unos colores que en otros y sobre todo en las variedades heterocigotas (4).

Más curiosas son las flores variegadas o en mosaico, bicoloradas (blanco/rojo, blanco/amarillo, amarillo/rojo) e incluso tricoloradas (blanco/amarillo/rojo). Algunos autores proponen que la variegación en las flores del dondiego puede estar mediada no sólo por una mutación sino también por algún tipo de factor presente en los padres (5). También se conocen casos de mutaciones gaméticas en la línea germinal, que pasan a los gametos y que a diferencia de las anteriores sí se transmiten a la proge-



**Foto 1:** Variedad de dondiego de noche de flores amarillo intenso. El color se debe a las betaxantinas y a la presencia del alelo Y en homocigosis (YY).

nie, la cual llevará la mutación en todas las células de los nuevos individuos. Lógicamente, este tipo de mutación sólo se puede controlar mediante experimentos de cultivo.

### Un mundo de pigmentos y posibilidades

Las betalaínas son un grupo de pigmentos nitrogenados característicos del orden Caryophyllales al que pertenece el dondiego. Se dividen en dos subgrupos según el número de dobles enlaces presentes en sus estructuras químicas: las betaxantinas (amarillas) y las betacianinas (violetas/rojas). Las primeras constituyen

el pigmento de base soluble en agua, presente en todas las células de la flor, que da el color amarillo al dondiego, habiéndose identificado varias a partir de la condensación del ácido betalámico con aminoácidos y aminas (6). En cambio, la pigmentación violeta y roja se debe a algunas betacianinas, con la estructura básica de la betanidina, restringidas a la epidermis (7).

En presencia del alelo Y se sintetizan los precursores bioquímicos de las betaxantinas, mientras que si está presente la serie de alelos R algunos de ellos derivan hacia betacianinas (7, 8) y dan tonalidades rojizas, rosadas o violáceas según la concentración de ambos tipos de pigmentos. La presencia de estos pigmentos en las flores juega un papel fundamental, proporcionando el color que sirve de atracción a muchos animales que actúan como agentes polinizantes. En muchas especies son las antocianinas las responsables de la coloración, pero en el orden botánico al que pertenece el dondiego, como también ocurre en la buganvilia (*Bougainvillea*), los amarantos dulces (*Gomphrena*), la verdolaga (*Portulaca*) o la flor de terciopelo (*Celosia*), este papel lo cumplen las betalaínas. Betaxantinas y betacianinas se localizan en las vacuolas y su ruta biosintética deriva del aminoácido tirosina, gracias a la acción de tres enzimas. La ocurrencia de mutaciones en algunos de los pasos de su síntesis conduce a esa gran variabilidad de colores de las flores del dondiego.

### La magia de la noche

Las flores cuentan con diversos medios para atraer a los animales polinizadores: presencia de néctar y polen, un patrón de color determinado, la producción de compuestos volátiles y fero-



**Foto 2:** Flor amarilla mutante bicolor del dondiego de noche. La mutación deriva de la transformación de alelos r en R que cambian el amarillo a rojo sólo en algunas células, en las cuales la biosíntesis conduce hacia betacianinas (rojas) en vez de a betaxantinas (amarillas).

monas, e incluso emitir fluorescencia como señal de atracción. Se ha demostrado que las betaxantinas del dondiego tienen fluorescencia natural, actuando como faros guía hacia sus flores, utilizando una estrategia similar a la descrita en el plumaje de algunos loros (9).

Si algo de peculiar tiene el dondiego, y basta con echar un vistazo a sus nombres vernáculos, es que sólo abre las flores cuando se pone el sol, al atardecer, permaneciendo abiertas hasta la mañana siguiente en que se cierran. En días nublados y otoñales puede incluso abrirlas en las horas del día. Cuando lo hace, es tal el dispendio de color y dulce fragancia que desprende que llamarla “maravilla” se antoja poco a la vista (y el olfato) de ilustres botánicos como Charles de l’Ecluse, uno de los primeros en prestarle atención. No debe extrañar que su nombre genérico, derivado del latín *mirabilis*, signifique “admirable” o “maravilloso”.

El dondiego de noche es polinizado por polillas halcón (*O. Lepidópteros*, Fam. Esfíngidos), las cuales con su larguísima probóscide no tienen mayor problema en alcanzar el néctar y el polen situados al final de la estrecha trompeta del perianto de su flor, siempre y cuando no haga mucho frío. En poblaciones naturales del centro de México, por debajo de 13°C los esfíngidos son incapaces de volar durante el crepúsculo, por lo que el dondiego recurre a la polinización autógama (estambres y pistilos en la misma flor). En noches más templadas, según sube la temperatura, la polinización alógama se incrementa (10). El dondiego, como otras muchas especies de la familia *Nyctaginaceae*, emite su fragancia durante la noche, cuando las polillas son más activas, demostrando así la convergencia evolutiva existente entre la atracción del vector y el olor, más la morfología floral.

Numerosos estudios han demostrado que las polillas halcón polinizan flores cuya esencia volátil comprende terpenoides oxigenados y compuestos nitrogenados. En el caso del dondiego, su fragancia floral cuenta con monoterpenos ( $\beta$ -ocimeno sobre todo, mircenolol) y sesquiterpenos (farnesano, nerolidol) (11), siendo muy semejante a la de otras especies del género *Mirabilis*. Al parecer, no importa tanto la cantidad de estos compues-



**Foto 3:** Ejemplar de *Mirabilis jalapa* con flores completamente blancas (alelos yy homocigotos).

tos, en su poder de atracción, sino su presencia. Curiosamente, especies emparentadas como *M. macfarlanei* o *M. triflora*, polinizadas respectivamente por abejas y colibríes, casi no tienen perfume. La primera apenas cuenta con el monoterpeno limoneno, percibido por las abejas que en combinación con las señales visuales es suficiente. La segunda emite cierto olor más para disuadir a potenciales herbívoros que para atraer a los colibríes, pues éstos ignoran completamente la fragancia cuando se alimentan de néctar. En definitiva, la fragancia floral desempeña diversos papeles en la polinización, atrayendo a las polillas en primera instancia, lo cual combinado con señales visuales y alimenticias, facilita el aprendizaje asociativo y la discriminación por parte de los vectores polinizantes.

39



**Foto 4:** Variedad de dondiego de noche de flor color carmesí. Para este fenotipo existen hasta tres genotipos diferentes.



**Foto 5:** Las variedades de color magenta tienen una gran variedad de tonalidades en el dondiego de noche. Todas ellas se caracterizan por ser heterocigotas (Yy) y contar con alelos de la serie R.



**Foto 6:** Curiosa variedad mutante bicolor del dondiego de noche, pues el color púrpura rosáceo aparece siempre en bandas longitudinales en el centro de cada pétalo sobre un fondo blanco.

#### Bibliografía citada:

1. Correns C. Ueber Bastardierungsversuche mit *Mirabilis*-Sippen. *Ber Deutsch Bot Ges* 20: 594-608, 1902.
2. Marryat DCE. Hybridization experiments with *Mirabilis jalapa*. *Reports to the Evolution Committee of the Royal Society of London* 5: 32-50, 1909.
3. Kiernan FP, White OE. Inheritance in four o'clocks. *J Hered* 17: 383-386, 1926.
4. Showalter HM. Self flower-color inheritance and mutation in *Mirabilis jalapa* L. *Genetics* 19: 568-580, 1934.
5. Engels JMM, Van Kester WNM, Spitters CJT, Vosselman L, Zeven AC. Investigations of the inheritance of flower variegation in *Mirabilis jalapa* L. 1. General introduction and 2. Inheritance of colour in uniformly coloured flowers. *Euphytica* 25: 1-5, 1975.
6. Piatelli M, Minale L, Nicolaus RA. Pigments of *Centrospermae* V. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L. *Phytochemistry* 4: 817-823, 1965.
7. Van Kester WNM, Spitters CJT, Vosselman L, Engels JMM, Zeven AC. Investigations of the inheritance of flower variegation in *Mirabilis jalapa* L. 3. Somatic chromosome number, 4. Distribution of the pigments and 5. Chromatographic studies. *Euphytica* 24: 6-12, 1975.
8. Spitters CJT, Vosselman L, Engels JMM, Van Kester WNM, Zeven AC. Investigations of the inheritance of flower variegation in *Mirabilis jalapa* L. 6. Genetic system of flower variegation and speculation about its existence. *Euphytica* 24: 323-332, 1975.
9. Gandía-Herrero F, Escribano J, García Carmona F. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* 222: 586-593, 2005.
10. Martínez del Río C, Búrquez A. Nectar production and temperature dependent pollination in *Mirabilis jalapa* L. *Biotropica* 18: 28-31, 1986.
11. Levin RA, Raguso RA, McDane LA. Fragrance chemistry and pollinator affinities in *Nyctaginaceae*. *Phytochemistry* 58: 429-440, 2001.

# De la Historia a la Genética. La endogamia en los Habsburgo

Ramón Muñoz-Chápuli

Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga  
[chapuli@uma.es](mailto:chapuli@uma.es)

41

Como todos recordamos, o deberíamos recordar, de nuestro Bachillerato, Carlos II "El Hechizado", es sujeto de mandíbula prominente y mirada inexpresiva, fue el último de los reyes Habsburgo o Austria, la dinastía que reinó en España durante casi doscientos años. Su muerte sin descendencia, a pesar de haber contraído dos matrimonios, supuso la extinción de la rama masculina de la familia en España, y la implantación de la dinastía borbónica, no sin la correspondiente guerra de sucesión (1701-1713) entre Francia y España, de un lado, y la alianza antiborbónica formada por Inglaterra, Austria, Prusia, otros estados alemanes y los Países Bajos.

La esterilidad, así como otros problemas de salud de Carlos II, que tantas consecuencias históricas tuvieron, se ha atribuido tradicionalmente por parte de los historiadores al alto grado de consanguinidad de los matrimonios de la familia Habsburgo, muy proclives a unir primos hermanos, primos segundos o incluso tíos con sobrinas, para mantener los intereses de poder de la familia. Esta consanguinidad no había sido investigada desde el punto de vista estrictamente genético hasta recientemente. En 2009, tres investigadores de la Universidad de Santiago de Compostela Gonzalo Álvarez, Francisco Ceballos y Celsa Quinteiro, publicaron en la revista *PLoS One* un primer análisis del papel que pudo desempeñar la consanguinidad de los Habsburgo en la extinción de la casa de Austria en España (Álvarez et al. *PLoS One*, 4, e5174 [2009]). Más recientemente, Ceballos y Álvarez han publicado en *Heredity* un análisis más exhaustivo de la consanguinidad en las distintas ramas familia Habsburgo, dentro y fuera de España, a lo largo de trescientos años, llegando a interesantes y sorprendentes conclusiones (Ceballos y Álvarez, *Heredity*, avance on-line [2013]). Vamos a hacer aquí un resumen de ambos estudios, mostrando cómo pueden entrelazarse Historia y Biología.

La historia española de la dinastía Habsburgo comienza en 1496, cuando los Reyes Católicos casan a su hija Juana, la que pasaría a la historia como "la loca", con un príncipe flamenco, Felipe, que parecía hacer honor a su calificativo de "el hermoso". Felipe I fue proclamado rey de Castilla en 1506, aunque murió poco después. A partir de Felipe se suceden cinco reyes más de la dinastía Habsburgo a lo largo de 200 años, en concreto Carlos I, Felipe II, Felipe III, Felipe IV y Carlos II. Estos cinco reyes se casaron un total de diez veces, casi siempre con parientes más o menos cercanas, primas, primas segundas o sobrinas (véase la figura 1). Por ejemplo, la cuarta esposa de Felipe II fue su sobrina Ana de Austria, y Felipe IV casó en segundas nupcias con su sobrina Mariana de Austria. Esto hizo que el coeficiente de endogamia (*inbreeding*) de los

miembros de la familia ascendiera de un valor de 0.025 en el caso de Felipe I a 0.254 en el de Carlos II, con una media de 0.129. Tampoco andaban muy lejos en coeficientes de endogamia el rey Felipe III (0.218) y el príncipe Carlos (0.211), hijo de Felipe II. Estos son los valores calculados por los investigadores gallegos después de estudiar los matrimonios y la descendencia de 3000 individuos pertenecientes a 16 generaciones de Habsburgo incluyendo los ancestrales a la rama española de la familia. Recordemos que el coeficiente de endogamia es la probabilidad de que dos alelos en cualquier *locus* sean idénticos por descendencia. Es decir, los descendientes del cruce de dos hermanos (que comparten un 50% de alelos por su parentesco, tienen un coeficiente de endogamia de 0.25 (0.5 x 0.5). El valor para primos hermanos sería de 0.125, y para primos segundos de 0.0625. Esto quiere decir que el coeficiente de endogamia de Carlos II era incluso superior al que resultaría de un matrimonio incestuoso entre hermanos.

¿Por qué es desfavorable la endogamia? Porque favorece la homocigosis de alelos recesivos potencialmente deletéreos, que en condiciones normales permanecerían en heterocigosis y no tendrían efecto. Esta acumulación de alelos perjudiciales produce el efecto conocido como depresión endogámica, es decir, una pérdida de condiciones resultante de la endogamia. Desde el punto de vista de la genética de poblaciones se habla de "carga endogámica" (*inbreeding load*) a la disminución del *fitness* o aptitud del individuo o de la población a medida que aumenta el coeficiente endogámico.

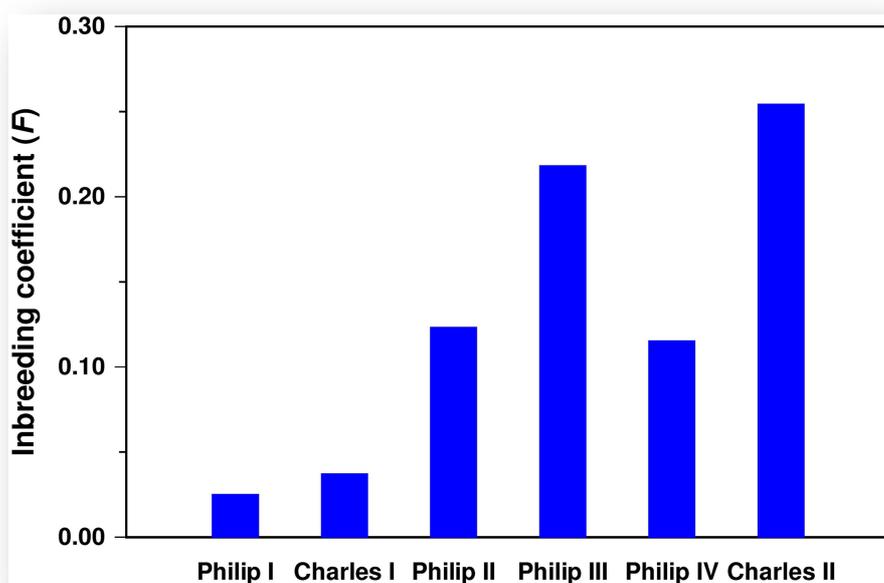


Figura 1: Pedigrí de la dinastía Habsburgo en España, mostrando la consanguinidad de los enlaces. Reproducido de Álvarez et al. *PLoS One*, 4, e5174.

De acuerdo con el estudio de Álvarez, Ceballos y Quinteiro, la consanguinidad de los Habsburgo españoles llevó a una indudable depresión endogámica, que se manifestó en la descendencia de los matrimonios. Entre 1527 y 1661, los matrimonios reales tuvieron 34 hijos, diez de los cuales murieron antes de un año y otros 17 no alcanzaron los diez años. De los 51 embarazos totales de los Habsburgo, cinco acabaron en abortos o partos de fetos muertos, seis en muerte neonatal, y 14 en fallecimientos antes de los diez años. Sólo 26 de estos embarazos (alrededor del 50%) dieron lugar a niños que alcanzaron los diez años de edad. Dado que la mortalidad infantil en la España de aquella época se ha estimado en un 20%, incluyendo todos los estratos sociales, parece más que probable que la depresión endogámica esté detrás del exceso de mortalidad observado.

En el caso extremo de Carlos II, los autores del estudio especulan sobre los alelos deletéreos que pudieron causar sus problemas de salud. Probablemente una deficiencia congénita en producción de hormonas hipofisarias pudo estar detrás de su infertilidad, su debilidad física y su carácter abúlico. La causa genética más frecuente del déficit de hormonas hipofisarias es una mutación puntual del gen *PROPI*, que codifica para un factor de transcripción necesario para la producción de gonadotropinas, tirotrópina y hormona del crecimiento. En cuanto a los graves problemas renales que padeció Carlos II, incluyendo piedras en el riñón y hematuria, estos podrían estar relacionados con mutaciones recesivas en los genes *ATP6VOA4* o *ATP6V1B1*, componentes de la ATPasa vacuolar, un transportador de protones y regulador del pH. Estas mutaciones producen dRTA, acidosis tubular distal renal, que suele derivar en graves problemas renales.

Los estudios de endogamia en la familia Habsburgo plantean interesantes ucronías, es decir, ¿qué hubiera pasado si...? Por ejemplo, el coeficiente de endogamia de las hijas de Felipe II e Isabel de Valois eran muy bajos (0.008), pero al no tener descendencia masculina, esta ventaja no fue aprovechada en beneficio de la dinastía. La endogamia de los hijos de Felipe IV e Isabel de Borbón, su primera esposa, era tan sólo de 0.050, pero el príncipe heredero, Baltasar Carlos, que siendo niño fue inmortalizado por Velázquez en un extraordinario retrato ecuestre, murió a los 17 años, no a causa de deficiencias genéticas, sino a consecuencia de la viruela. El rey, como hemos dicho, necesitado de un descendiente varón, casó con su sobrina y engendró al muy endogámico Carlos II, llevando a la dinastía a una vía muerta. Resulta una obviedad la observación de que la supervivencia de Baltasar Carlos hubiera cambiado radicalmente la historia no sólo de España sino de toda Europa. Podría haber tenido herederos, no habría habido Guerra de Sucesión, no se hubieran establecido los Borbones en España y el equilibrio de poderes en Europa hubiera sido muy diferente.

En el trabajo publicado en *Heredity*, Ceballos y Álvarez extienden su estudio a las ramas no españolas de la familia Habsburgo, lo que les permite aumentar el periodo de observaciones a tres siglos y medio, entre 1450 y 1800, incluyendo a 4000 individuos de veinte generaciones. Durante este periodo, el coeficiente medio de endogamia de los Habsburgo fue de 0.0628, similar al correspondiente a matrimonios entre primos hermanos. De un total de 502 embarazos registrados, sólo 333 niños alcanzaron los diez años de edad. 93 murieron en el primer año, y 76 entre uno y diez años. Estas cifras superan de nuevo a las estimadas para la población general, mostrando la existencia de una carga endogámica significativa.

Sorprendentemente, la carga endogámica estimada por la mortalidad infantil entre uno y diez años disminuye de manera muy significativa (¡en un 80%!) al comparar los periodos 1450-1600 y 1600-1800. Sin embargo no hay cambios significativos en la mortalidad durante el primer año de vida. Esto se presta a diversas interpretaciones. Ceballos y Álvarez no descartan factores ambientales (más higiene, mejores cuidados médicos), pero sugieren que se podría haber producido una "purga" genética por selección, que tendería a eliminar los alelos más deletéreos de la población, aún manteniéndose los niveles de endogamia. Este proceso se ha estudiado en poblaciones sometidas a selección artificial, por ejemplo en vacas lecheras (Parland et al., *Genetics Selection Evolution*, 41:16 [2009]), pero nunca había sido descrito en poblaciones humanas. No todos los genetistas de poblaciones están de acuerdo con esta posibilidad, dado lo reducido de la muestra y la dificultad de explicar las diferencias entre la mortalidad infantil por debajo y por encima del año de edad, algo que podría deberse, según Ceballos y Álvarez, a los diferentes alelos implicados en sus causas.

En resumen, estos trabajos no sólo aportan una perspectiva novedosa a los estudios de los historiadores, sino que demuestran en la práctica las ventajas de lo que se ha dado en llamar la "transversalidad". La clásica división entre "ciencias" y "letras" nos sigue pareciendo injustificable. No existen "ciencias" y "humanidades", sino conocimiento, saber y cultura. Y las investigaciones de este grupo de genetistas gallegos nos han proporcionado una nueva prueba de ello, por si hiciese falta.



## La Recensión



### Cara y cruz de la biología sintética

#### Recensión sobre los libros:

**SCHMIDT, M., KELLE, A., GANGULI-MITRA, A. & DE VRIEND, H. (eds.)**  
**Synthetic Biology. The Technoscience and Its Societal Consequences,**  
 Dordrecht: Springer, 2010, 186 págs.  
 ISBN 978-90-481-2677-4

**CURCH, G. & E. REGIS, Regenesis. How Synthetic Biology Will Reinvent Nature and Ourselves,** New York: Basic Books, 2012, 284 págs. ISBN 978-0-465-02175-8

Es difícil decir con precisión en qué consiste la biología sintética y, sobre todo, en qué se distingue de la ingeniería genética; por eso hay quien ha tirado por la calle de en medio y la ha definido como una ingeniería genética que ha tomado esteroides. Pero, buscando un poco más de precisión, podría decirse que es la ingeniería genética que se ha tomado en serio su faceta ingenieril, y ha entendido, por tanto, que para la biotecnología es fundamental la introducción de viejos procedimientos, criterios y valores en los que se ha basado tradicionalmente la ingeniería: la estandarización, la fabricación de componentes aislados intercambiables y combinables (modularidad), el diseño previo (preferiblemente realizado mediante ordenadores), la automatización y simplificación de los procesos, los análisis de eficiencia (costes-beneficios), el acceso a los mercados, etc. Si se quiere una definición más formal, la biología sintética es la síntesis de biomoléculas, de sistemas biológicos, o de componentes de los mismos, con funciones nuevas que no se encuentran en la naturaleza, o bien el uso de componentes naturales o artificiales para el rediseño de organismos vivos. Los componentes así producidos han de ser diseñados de forma estandarizada y modular (*BioBricks*), siguiendo los principios ingenieriles que hemos mencionado, de modo que puedan ser fácilmente usados en la fabricación de sistemas biológi-

cos más complejos con el objetivo de alcanzar fines prefijados.

A estas alturas pocos serán los que no hayan oído hablar del resultado de la biología sintética más divulgada por los medios de comunicación: la creación en 2010, por parte del equipo de Craig Venter, de una nueva especie biológica; una bacteria a la que se denominó *Mycoplasma laboratorium*, aunque su nombre popular es "Synthia". De este asunto se ocuparon de forma certera en esta misma revista Enrique Viguera y Ramón Muñoz Chápuli (ver Nota 1). En realidad, lo que hicieron Venter y su equipo fue sintetizar artificialmente el genoma completo de la bacteria *Mycoplasma mycoides* y este genoma artificial fue utilizado para reemplazar el genoma original en células de *Mycoplasma capricorum*, proceso que dio lugar a células capaces de replicarse. Como comentaba al respecto Muñoz Chápuli, éste era un logro más notable por sus aplicaciones tecnológicas que por la aportación de nuevos conocimientos. Hasta el momento, ha sido el logro de la biología sintética que más extensamente ha llegado a la opinión pública, pero a nadie se le escapa que están muchos más por venir, y no todos ellos parecen ser igualmente deseables o necesarios. Algunos incluso pueden ser claramente amenazadores. Por eso es muy aconsejable la lectura de obras que permitan al lector formar un juicio apropiado acerca de estos avances que se nos acercan, y que lamentablemente, en ocasiones, se nos anuncian con un énfasis en el tono más parecido al de un vendedor de alfombras que al que cabe esperar del discurso científico.

Los dos libros que quiero comentar son como la cara y la cruz de todo este asunto. Se trata de dos libros escritos en colaboración por especialistas acreditados y serios, pero mientras que uno nos introduce en el tema con rigor y con cautela, el otro, salvando todo lo salvable, nos intenta vender una alfombra.

Markus Schmidt, que es quien encabeza la lista de autores del primer libro, es,

pese a su juventud, uno de los más prestigiosos analistas en cuestiones de bioseguridad y en los problemas éticos y sociales suscitados por la biología sintética (ver Nota 2). Entre sus muchas tareas, como la de asesorar en diversos comités u asociaciones científicas de todo el mundo, está la de ser investigador principal en el proyecto europeo METACODE (*Code-engineered new-to-nature microbial cell factories for novel and safety-enhanced bio-production*) y en el proyecto ST-FLOW on standardization in synthetic biology, dos proyectos de investigación que se cuentan entre los más ambiciosos desarrollados actualmente en la Unión Europea.

El libro que coordina es una recopilación de nueve trabajos acerca de diversos aspectos sociales y éticos de la biología sintética expresamente escritos para este volumen por especialistas de varios países, entre ellos algunos españoles. Como no podemos aquí dar cumplida cuenta de todos, resumiré muy brevemente su contenido. El capítulo 1 es una somera presentación del libro. El capítulo 2, escrito por Luis Campos, del Departamento de Historia de la Universidad de Drew, en Madison, es un breve pero suculento recorrido por los precedentes históricos de la biología sintética a lo largo del siglo XX, desde que en 1912 fuera acuñado el término por el médico francés Stéphane Leduc hasta los primeros congresos internacionales sobre la materia, celebrados en 2004 (en el MIT), en 2006 (en la Universidad de California en Berkeley), en 2007 (en el ETH de Zurich) y en 2008 (en la Universidad de Hong Kong) —los siguientes, por cierto, no recogidos en el texto por razones obvias, han sido en 2011 en la Universidad de Stanford y en 2013 en el Imperial College de Londres—. Es de interés la atención que en este capítulo se presta a las relaciones entre la biología sintética y la ingeniería genética. El capítulo 3, de Carolyn Lam y otros, es una introducción a los temas centrales de la biología sintética, fundamentalmente los circuitos de ADN, las rutas metabólicas sintéticas, las protocélulas, los genomas mínimos, los componentes no naturales (códigos genéticos y proteínas ortogonales con las naturales) y consorcios microbianos sintéticos. El capítulo 4 versa sobre el diseño computacional en biología sintética. El 5, de Anna Deplazes y otros, es una excelente presentación de los problemas éticos fundamentales que suscita el desarrollo de la biología sintética, problemas que en muchos casos coinciden con los que ya vienen siendo debatidos en relación con la ingeniería genética, pero en otros casos, como en la posibilidad del desdibujamiento de las fronteras entre lo viviente y lo no-viviente, y en la de la conversión del científico en "creador" de vida, pueden ser de nuevo cuño. El capítulo 6 está escrito por el propio Markus Schmidt y se detiene en el asunto en el que él es un reconocido experto: la bioseguridad (*biosafety*). En este punto, la lengua inglesa permite hacer una distinción, que la lengua española no recoge, entre 'biosafety' y 'biosecurity'. Sugiero, de modo meramente tentativo, que una manera de marcar en nuestro idioma esta distinción podría ser traduciendo estos



términos por 'biocautión' (o 'biocautela', si es que no gusta ese neologismo) y 'bioseguridad' respectivamente. La *biosafety* consiste en prevenir consecuencias no intencionadas de las entidades o procesos creados por la biotecnología, mientras que la *biosecurity* consiste en la prevención del mal uso intencional de esos productos. Un problema de *biosafety* o biocautión, además del de cómo prevenir la aparición de propiedades emergentes o de efectos colaterales, sería el de cómo dotar a los organismos vivos creados artificialmente de mecanismos que aseguren su inocuidad para los organismos naturales (por ejemplo, mediante rutas metabólicas dependientes de sustancias no accesibles en la naturaleza o mediante el uso de códigos genéticos ortogonales al existente). Un problema de *biosecurity*, en cambio, sería el de cómo controlar las investigaciones de modo que no pueda hacerse un uso perverso de ellas, como, por ejemplo, su utilización por parte de terroristas, o simplemente por parte de *biohackers* lunáticos con un laboratorio en su garaje. Los problemas de *biosecurity* son tratados con más detalle en el capítulo siguiente, escrito por Alexander Kelle. Para evitar en lo posible esos usos perversos o simplemente irresponsables, el artículo destaca la importancia de una educación ética dirigida a la comunidad científica, la creación de grupos de discusión, de comisiones evaluadoras y asesoras en bioseguridad y el desarrollo de regulaciones nacionales e internacionales. Es decir, se propone una combinación de medidas de autocontrol y medidas de control externo de la investigación. El capítulo 8 se dedica a cuestiones de propiedad intelectual y de patentes en la biología sintética. El capítulo 9 vuelve sobre los problemas de bioseguridad, comparándolos con los que suscita la nanotecnología. El capítulo 10 trata sobre el papel de las organizaciones de la sociedad civil en los debates sobre la biología sintética y su función de intermediarias entre las instituciones científicas y gubernamentales, por un lado, y el gran público, por el otro. Finalmente, el capítulo 11, redactado también por Kelle, incluye un resumen y conclusiones.

El libro de Georg Church y Ed Regis –hay que admitirlo– es mucho más ameno y sugerente que el que acabamos de comentar. De hecho, creo que merece ser traducido al español porque a buen seguro puede venderse con éxito como un buen libro de alta divulgación. Es una introducción a la biología sintética escrita por un Catedrático de genética de Harvard (Church) y un exitoso autor de libros de divulgación biológica (Regis). Sin embargo, pese a esta virtudes (o precisamente por ellas), no creo que su contenido haga mucho por fomentar el aprecio

de la biología sintética entre los lectores. El libro presenta algunos de los avances más sorprendentes de la biología sintética estableciendo un cierto paralelismo entre cada uno de ellos y las etapas fundamentales de la evolución de la vida en nuestro planeta, desde su origen hace unos tres mil ochocientos millones de años. Las descripciones de los logros tecnológicos de la biotecnología son claras y oportunas, y las anécdotas y descripciones históricas que las rodean ciertamente atrapan al lector. Mi favorito es el capítulo 4, en el que se explica cómo poner a *E. coli* a fabricar petróleo. No obstante, ya desde las primeras páginas encontramos por aquí y por allá un cierto ruido de fanfarria científica, por no decir visionaria, y una alegre despreocupación del análisis de las consecuencias reales de las quimeras que se ensalzan; algo que desafortunadamente nos acompañará durante todo el libro. En la página 8 se nos dice, por ejemplo: “[E]stas tecnologías tienen el poder de mejorar la salud de los seres humanos y de los animales, aumentar la duración de nuestra vida, incrementar nuestra inteligencia y mejorar nuestra memoria, entre otras cosas”. Muy interesante, sin duda, pero buena parte de eso, por ahora no son más que promesas, no hechos. Y son promesas muy alejadas del estudio de los genomas mínimos, o del diseño de circuitos de ADN, o del diseño de protocélulas, que son preocupaciones mucho más cotidianas de los biólogos sintéticos (ver Nota 3). Unas líneas después se nos pide que consideremos la posibilidad “modesta” de hacer a los seres humanos inmunes a todos los virus, “los conocidos y los desconocidos, los naturales y los artificiales”. ¿Saben cómo? Se nos explica en el capítulo 1: cambiando la quiralidad de todas nuestras moléculas susceptibles de tal cambio, especialmente aminoácidos y ADN. Claro que entonces nuestras enzimas no serían capaces de digerir los nutrientes naturales. Pero no vamos a dejar que los pequeños detalles nos paralicen. Church y Regis proponen que produzcamos también de forma masiva nuestros alimentos con moléculas de quiralidad opuesta a la habitual. Aunque, a fuer de sinceros, entre paréntesis reconocen que puede ser que todas estas pequeñas molestias no sirvan para nada porque un *biohacker* muy bien podría producir en su laboratorio casero virus hechos de moléculas especulares.

Más adelante, en el capítulo 6, el libro nos proporciona una nueva subida de adrenalina: se nos plantea la posibilidad de resucitar especies extintas del Pleistoceno, como un mamut o... ¡un neandertal! ¿Por qué hacer tal cosa? Bueno, al parecer los mamuts “están casi pidiendo a gritos una resurrección” (p. 137) y los neandertales deben haber soli-

citado turno. Resucitar a un mamut, nos dicen los autores, aumentaría la biodiversidad (suplico que por que no veríamos obligados a resucitar también muchos componentes esenciales de su ecosistema), y resucitar a un neandertal nos ayudaría a saber más cosas acerca de nuestra mente, dado que podríamos compararla con la suya, y además podríamos beneficiarnos de tomar cosas prestadas de su sistema inmunológico. ¿Hace falta algún comentario? Sólo dos interrogantes por mi parte (y eso dejándonos llevar por lo que no es sino ciencia-ficción): ¿Se han preguntado nuestros autores si es legítimo utilizar como un mero instrumento de investigación a un miembro del género *Homo*? ¿Se han preocupado lo más mínimo por el modo en que se sentiría un ser así viviendo entre nosotros? La respuesta en ambos casos es ‘no’. Lo más parecido a una justificación ética de este frankensteiniano empeño se nos da en la página 143. Se trata de un argumento que, pese a su manifiesta insolencia, es muy repetido por los tecno-entusiastas de todo signo. Con todo ello –se aduce– no haríamos más que lo que ya hacen los pájaros al construir sus nidos, o los castores al construir sus presas, o las abejas al construir sus colmenas: “reconstruir el mundo de acuerdo con [nuestras] necesidades y deseos”.

El colofón digno del recorrido realizado lo pone un “epílogo epigenético” dedicado fundamentalmente al tema del transhumanismo, esto es, al movimiento filosófico-científico que reivindica la manipulación de nuestro genoma encaminada a un mejoramiento constante de nuestra especie, hasta dar lugar finalmente a una nueva especie posthumana, un anhelado *Homo excelsior*, que nos sustituirá como dominadores de este planeta. Después de avisarnos de que no tiene sentido prohibir nada de esto, porque frente al desarrollo tecnológico las prohibiciones son contraproducentes y nunca han funcionado (afirmación ésta que, digan lo que digan, es susceptible de muchas matizaciones desde un punto de vista histórico), nos proporcionan lo que ellos creen que es un pequeño respiro: “Incluso si no puede conocerse de antemano el ritmo de crecimiento del progreso tecnológico, incluyendo la tecnología genómica y la marcha hacia el transhumanismo, este progreso está al menos bajo el control humano. Y esto debería ser un pensamiento reconfortante” (p. 242). ¿Seguro? A mí, personalmente, no me parece nada reconfortante, sobre todo si el control estuviera en manos así.

**NOTAS:** (1) Viguera, E., “Biología Sintética: un nuevo desafío”, *Encuentros en la Biología*, 100, enero de 2005, pp. 27-28 (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros100/sintetica.htm>); Muñoz-Chápuli, R. “¿Ha creado Craig Venter vida en el laboratorio?”, *Encuentros en la Biología*, 130, septiembre-octubre 2010, pp. 52-53 (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros130/CraigVenter.pdf>).

(2) Recientemente ha coordinado un segundo libro sobre este asunto: Schmidt M. (ed.) 2012, *Synthetic Biology: Industrial and Environmental Applications*. Wiley-VCH.

(3) Si se quiere consultar una introducción más técnica (aunque clara) a los trabajos reales en biología sintética, yo recomendaría la lectura del libro de Geoff Baldwin et al., *Synthetic Biology. A Primer*, London: Imperial College Press, 2012.

# Bacterias a dieta

S. Vidal y S.T. Tapia-Paniagua

Investigadoras del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga  
[vidal@uma.es](mailto:vidal@uma.es) [stapia@uma.es](mailto:stapia@uma.es)

Los cambios en nuestro estilo de vida de los últimos tiempos, asociados a un mayor acceso a alimentos ricos en calorías, están contribuyendo de forma importante a la aparición de una “epidemia” de diferentes trastornos metabólicos en todo el mundo. La incidencia de algunos de ellos, como la diabetes o la obesidad, se han convertido en un problema social en países desarrollados, siendo la situación aún más dramática en aquellos que están todavía en vías de desarrollo, ya que no pueden hacer frente a los gastos económicos que suponen la prevención y el tratamiento de dichas enfermedades. Por tanto, en zonas donde estos trastornos ya son predominantes, así como en zonas donde están emergiendo con fuerza, es necesario identificar los factores de riesgo y establecer nuevas dianas terapéuticas.

Los diferentes trastornos metabólicos son el resultado de la suma de factores genéticos y ambientales. Se puede estimar que las mutaciones puntuales representan menos del 10% del fenotipo metabólico general. El bajo impacto de la genética en las metabolopatías es un indicativo de que la incidencia de la diabetes y de la obesidad en las últimas décadas está ligada a otras causas. En el caso concreto de la diabetes tipo II es importante tener en cuenta que alcanza una frecuencia del 4,5% en Europa, un 8-10% en EEUU, siendo su incidencia todavía más elevada en el sur de Asia. Estos números se han duplicado en los últimos 20 años sugiriendo que los cambios en nuestro genoma no son el único responsable de este aumento. Se han propuesto numerosas hipótesis para explicar esta tendencia. Entre ellas se encuentra la que sugiere la implicación de la microbiota intestinal del hospedador en estos trastornos metabólicos.

La microbiota intestinal se puede contemplar como un órgano microbiológico, que se compone de diferentes estirpes celulares con capacidad de comunicarse entre sí y con el hospedador. Está formada por una gran cantidad de especies microbianas que pueden llegar a alcanzar unos 100 billones de individuos, diferenciándose en 2000 especies distintas de las cuales el 90% son pertenecientes a los Filos Firmicutes y Bacteroidetes. Además de consumir, almacenar y redistribuir energía, estos organismos median fisiológicamente reacciones químicas importantes y puede mantenerse por sí mismas a través de mecanismos de división celular. A lo largo del tiempo, estas funciones metabólicas y genéticas han hecho que se produzca una co-evolución entre el organismo hospedador y su microbiota, dando lugar a una serie de cambios necesarios para la supervivencia del individuo cuyo control es, además, esencial para la homeostasis del ser humano. Se ha podido calcular que un 50-55% del genoma humano tiene una estrecha relación con la comunidad microbiana, generando una fuerte dependencia genética.

Hay que tener en cuenta que cada bacteria vive, en condiciones normales, en una ecología mutualista con el resto, por lo tanto, un exceso o falta de nutrientes puede cambiar tanto el número como la actividad de una bacteria dada, o producir un metabolito esencial o perjudicial para las bacterias “vecinas”. Un ejemplo bien conocido es la disponibilidad de oxígeno en la parte distal del intestino, debido a que ha sido consumido por los microorganismos presentes en la parte anterior del tracto gastrointestinal. Esto induce un profundo estado anaeróbico en el intestino distal, permitiendo por lo tanto sobrevivir a los anaerobios estrictos. Ya son conocidas algunas de las importantes funciones que la microbiota puede ejercer en el intestino, tales como la defensa contra patógenos e inmunidad, desarrollo de microvellosidades intestinales, fermentación de fibra dietética no digerible (como el almidón u otros oligosacáridos), biotransformación de los ácidos biliares conjugados, síntesis de algunas vitaminas (ej. B12 y K), etc. Pero cada vez son más frecuentes los trabajos científicos que relacionan la microbiota intestinal y su influencia en los distintos procesos metabólicos que suceden en el hospedador, tales como la extracción de energía de los alimentos, por lo que una microbiota determinada puede contribuir al desarrollo de la obesidad, la diabetes y enfermedades cardiovasculares. Otros desequilibrios metabólicos en los que se ha visto que está implicada la microbiota son la celiaquía o intolerancia al gluten, alergias o intolerancias alimentarias.

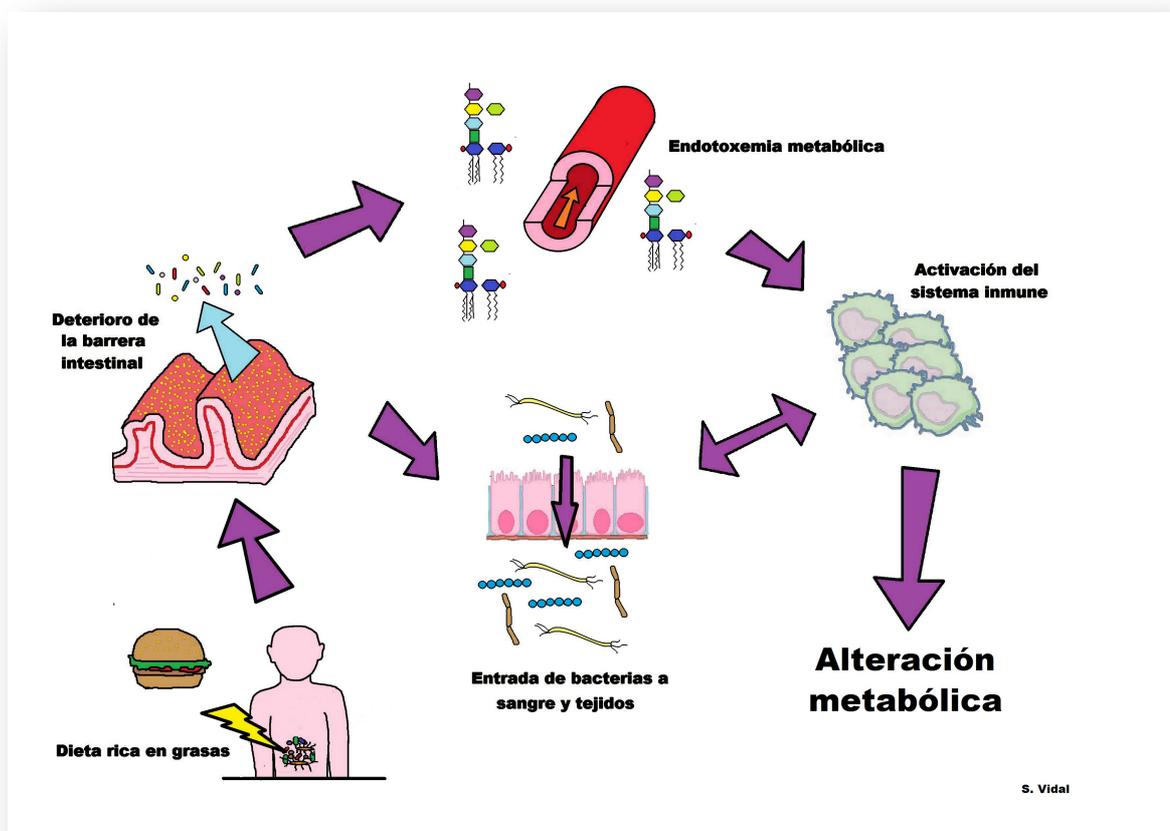
Para el estudio y comprensión de los efectos de la microbiota intestinal en la fisiología y metabolismo de los mamíferos han sido utilizados ratones gnotobióticos o libres de gérmenes. Estos ratones nacen sin microorganismos interstinales permitiendo la manipulación de la misma, y su intestino es colonizado con especies microbianas seleccionadas o comunidades enteras procedentes, incluso, del ser humano. De este modo se intenta examinar la transmisión de fenotipos fisiológicos y patológicos y probar cuál es el papel que tiene la microbiota en un fenotipo particular.

Con la intención de buscar evidencias del papel de la microbiota intestinal en la regulación de la homeostasis energética del hospedador, se llevaron a cabo los primeros experimentos con estos ratones para ver cómo se veían afectados por una dieta alta en calorías. Se comprobó que los ratones gnotobióticos desarrollaron un 40% menos de grasa corporal que los controles, mientras que éstos desarrollaban obesidad, intolerancia a la glucosa, y un patente cambio en la microbiota intestinal acompañado de una endotoxemia metabólica e hipersensibilidad a la insulina. Además, la inducción de la endotoxemia metabólica por inoculación de lipopolisacáridos o LPS de forma externa, los ratones control acumulan triacilglicéridos hepáticos, y desarrollan resistencia a la insulina, diabetes de tipo II y arteriosclerosis. Por otra parte, hay estudios que demuestran que, ratones alimentados con fibras prebióticas incrementan significativamente las concentraciones de *Bifidobacterium* spp. y presentan una mejor tolerancia a la glucosa, probablemente por una mejor secreción de insulina inducida por la misma, así como una disminución del fenómeno de endotoxemia.

Otros estudios similares se están llevando a cabo en organismos modelos como el cerdo, debido a que tienen tractos gastrointestinales y dietas parecidas a las de los seres humanos. En estos estudios se intenta manipular la microbiota intestinal con vistas a una mejora de la salud y una mejor prevención de las enfermedades. Los datos obtenidos hasta ahora indican que la microbiota podría convertirse en diana para el tratamiento de muchas enfermedades metabólicas añadiendo en la dieta probióticos, que producen sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) y que compiten por el mismo nicho biológico que los patógenos, previniendo la replicación de microorganismos no deseables, o ingredientes alimentarios no digeribles (o prebióticos), que estimulan la expansión de microorganismos específicos que mejoran la regulación metabólica. En humanos, las investigaciones deben centrarse en las especies de la microbiota intestinal que mayor beneficio implican para la salud. Sin embargo, este trabajo no es fácil porque la relación de la microbiota con algunas de las enfermedades mencionadas no están del todo claras; también debido a que en una misma alteración pueden estar implicados multitud de factores y porque las condiciones experimentales son de muy difícil control, ya que el uso de antibióticos, la actividad física, la dieta, el contenido de endotoxinas en el alimento ingerido e incluso la frecuencia de comidas, puede afectar a la microbiota intestinal, al balance energético, y en última

instancia, al metabolismo del individuo. Por todo ello, es muy complicado conseguir una población homogénea sobre la que estudiar los efectos individuales de la microbiota. Además, los muestreos se basan en técnicas no invasivas por lo que las muestras más comunes, sobre todo en humanos, se llevan a cabo mediante el estudio de la microbiota fecal. Sin embargo, muchas de las funciones metabólicas se producen en el propio epitelio del intestino delgado. Es precisamente en este tejido dónde se deberían analizar marcadores biológicos microbianos presentes en estados saludables y en aquellos que sufren alguna alteración metabólica para, una vez identificados, estudiar por qué están presentes en uno u otro estado y a qué propiedades se debe esa situación con el fin de encontrar una aplicación médica futura.

Hoy en día nos enfrentamos a una nueva era en la que tendremos que entender el papel de un órgano que tiene más de 3 millones de genes: la microbiota intestinal. Es indudable que descifrar este metagenoma será la base de muchos de los nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento y la prevención de las enfermedades metabólicas y las correspondientes consecuencias cardiovasculares, identificando nuevas estrategias ecológicas basadas en el uso de prebióticos, probióticos o incluso a través del uso de antibióticos específicos. La identificación de los genes eucariotas regulados por la microbiota intestinal también debe ser un objetivo fundamental en el que centrarse para diseñar nuevas estrategias. Finalmente, la microbiota intestinal debe ser considerada como un gran conjunto de antígenos y algunos de ellos podrían servir como la base de las estrategias inmunoterapéuticas para prevenir o tratar estas enfermedades metabólicas.



**Figura 1:** Representación esquemática de algunos de los procesos en los que está implicada la microbiota intestinal.

**Bibliografía citada:**

- 1. Fredrik Bäckhed. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine *Science*, 307, 1915 (2005).
- 2. Giovanni Musso, Roberto Gambino, Maurizio Cassader. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. *Diabetes Care*, 33:2277–2284 (2010).
- 3. Patrice D. Cani and Nathalie M. Delzenne. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1546-1558 (2009).
- 4. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 13;489(7415):242-9 (2012).

## ¿CÓMO FUNCIONA?

# En busca del “N<sub>0</sub>”: siguiendo el camino de baldosas amarillas

Jan M. Ruijter<sup>#</sup>, Adrián Ruiz Villalba\*

<sup>#</sup>Dept Anatomy, Embryology and Physiology, Academic Medical Center  
Amsterdam, The Netherlands  
[j.m.ruijter@amc.uva.nl](mailto:j.m.ruijter@amc.uva.nl)

\*Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga  
[adruiz@uma.es](mailto:adruiz@uma.es)

En los últimos 15 años, la cuantificación de la reacción en cadena de la transcriptasa inversa (RT-qPCR) se ha convertido en el método más utilizado para la cuantificación de la expresión génica (Baker M, *Nature Methods*, 2011, 8(3): 207-212). Algunos de sus características han contribuido al uso tan extendido de esta metodología: i) es un ensayo en un solo paso, sin la necesidad de procesamiento post-PCR; ii) permite una comparación sencilla entre transcritos con un rango amplio de expresión (diferencias > 107 veces); y iii) utiliza el potencial cuantitativo implícito en una PCR convencional, haciéndolo un ensayo tanto cuantitativo como cualitativo (Bustin SA et al, *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34: 597-601).

Los principios básicos de este popular método de análisis son un conjunto de asunciones que tratan de solucionar el problema de la variabilidad asociada a cada uno de los pasos implicados en la RT-qPCR. El RNA se extrae, se estandariza y se retrotranscribe a cDNA. Se usan *primers* (cebadores) específicos para copiar y amplificar secuencias de interés en ciclos sucesivos de PCR hasta que la fluorescencia empleada para monitorizar los amplicones resultantes puede ser detectada. Finalmente, la fluorescencia observada por ciclo se usa para calcular la cantidad/concentración inicial del transcrito de interés; ésta se normaliza o calibra en función de un gen de referencia, caracterizado por mantener una expresión constante en las condiciones experimentales analizadas. Cada uno de estos pasos puede introducir sesgos y errores en el procedimiento (Baker M, *Nature Methods*, 2011, 8(3): 207-212). Para facilitar y viabilizar la comparación de resultados entre los diferentes experimentos y laboratorios, en 2009 se publicaron las *MIQE guidelines* como un intento de estandarizar todos los pasos implicados en la tecnología de la RT-qPCR (Bustin SA et al, *Clinical Che-*

*mistry*, 2009, 55(4): 611-622). Aquí se simplifican las 85 recomendaciones incluidas en dicha publicación en un diagrama que representa la RT-qPCR (figura 1). Las principales fuentes de variación y su posible solución se discuten paso a paso.

## 1. Diseño experimental

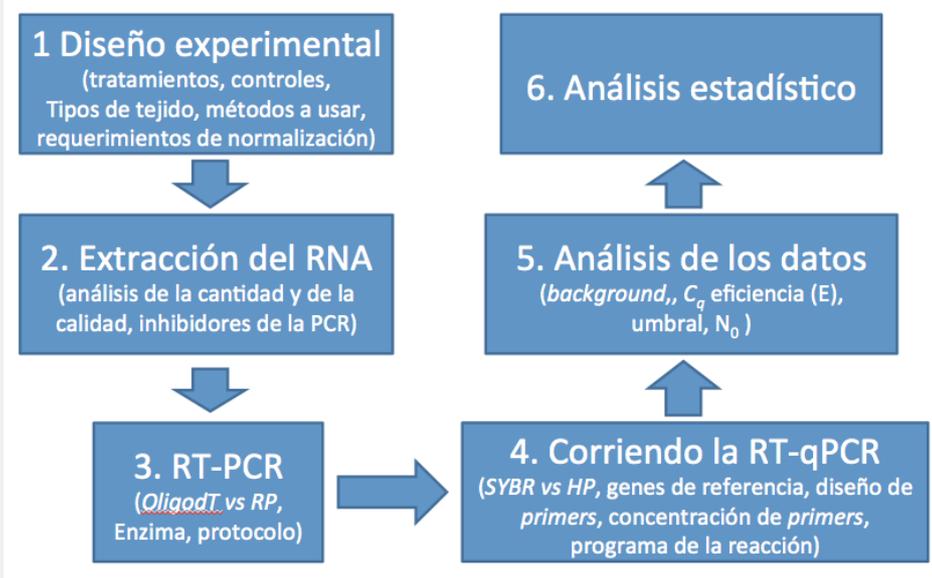
El diseño de experimentos biológicos es el paso más importante en el uso de la RT-qPCR. El tipo de tejido empleado y la forma de obtenerlo determinarán la calidad y la fiabilidad de la muestra y los requerimientos para la normalización de los resultados analizados. La estrategia de maximización de genes o de muestras se ha descrito como una estrategia de optimización para determinar eficientemente diferencias entre las muestras tratadas y los controles (Hellemans J et al, *Genome Biology*, 2007, 8:R19).

## 2. Extracción del RNA

El mercado ofrece diferentes métodos de extracción de RNA y los usuarios pueden elegir la opción más adecuada para su experimento (sales de guanidinio tipo Trizol, columnas de sílica-gel, *Cell-to-Ct* kits, entre otros). Tras la extracción, se analizan tanto la calidad como la cantidad de RNA usando métodos espectrofotométricos (*Nanodrop*, *2100 Bioanalyzer-Agilent Technologies*, *Experion-Biorad*). Tradicionalmente, la estabilidad del RNA ribosomal (rRNA) se ha considerado como una medida razonable para definir una extracción de RNA como óptima mediante un análisis en geles de electroforesis. Sin embargo, este punto de vista ha sido puesto en duda recientemente (Vermeulen et al, *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(9):e63). La variabilidad asociada a este paso se puede

47

**Figura 1. Esquema del flujo de trabajo de un experimento de la reacción en cadena de la transcriptasa inversa (RT-qPCR).**



reducir usando el mismo método para todas las muestras analizadas.

### 3. RT-PCR

La mayoría de los usuarios obtienen cDNA a partir del RNA extraído y es en este paso donde se suele normalizar la cantidad de material de partida. Aquí se puede elegir entre diferentes primers para transformar el RNA en cDNA (oligo-dT, *random primers* o una mezcla entre ambos – Bustin et al, *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34: 597-601) al igual que entre diferentes protocolos de RT-PCR (Stahlberg A et al, *Clinical Chemistry*, 2004, 50(3): 509-515). La eficiencia de la RT-PCR es una fuente de variación muy importante en la tecnología de la RT-qPCR (Kitchen RR et al, *Methods*, 2010, 50(4): 231-236), ya que es clave asegurarse de que la enzima recorre todo el molde de mRNA, generando un set de transcritos representativo del transcriptoma de la muestra.

### 4. Corriendo la RT-qPCR

En este paso, el diseño/elección de *primers* (contenido en GC, secuencia del transcrito molde, longitud del amplicón); su optimización (temperaturas de *melting* y de *annealing*) y estandarización; el protocolo de la termocicladora; y la master mix que se va a usar son, entre otros aspectos, absolutamente esenciales. Existen muchas aplicaciones, como *Primer3Plus* o *RTPrimerDB*, ayudan al usuario a diseñar y estimar la combinación óptima de *primers*. La concentración de los *primers* afecta de forma muy directa a la línea base de fluorescencia (*baseline*) (Ruijter JM et al, *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(6): e45), que es, como se verá más adelante, clave en la correcta estimación de los niveles de expresión del transcrito de interés. Otro de los factores que pueden introducir mayores fuentes de variación en el resultado final de la RT-qPCR es la elección de los genes de referencia. Normalmente, es necesario seleccionar genes de referencia para cada análisis, pero dado que hay ocasiones donde tanto económica como técnicamente esto no es posible, se recomienda el uso de al menos dos genes de referencia por ensayo (Vandesompele J, et al, *Genome Biology*, 2002, 3(7): research0034.1-0034.11).

### 5. Análisis de los datos de la qPCR

La cinética básica de la reacción de PCR se describe como  $N_c = N_0 \times E^c$  donde la cantidad de amplicón en el ciclo  $c$  ( $N_c$ ) es igual a la cantidad inicial de molde,  $N_0$ , multiplicada por la eficiencia de la PCR ( $E$ ) elevada al número de ciclos ( $c$ ). Después de ajustar el umbral de fluorescencia ( $N_q$ ) y determinar el número de ciclos necesario para alcanzar dicho umbral ( $C_q$ ), la ecuación de la cinética puede ser invertida, lo cual permite el cálculo del  $N_0$  a partir del umbral, de la  $C_q$  y de la eficiencia de la PCR ( $E$ ):  $N_0 = N_q / E^{C_q}$ . Todas las ecuaciones generalmente empleadas en cuantificaciones tanto absolutas como relativas de expresión génica derivan de esta ecuación básica (ver tablas 1 y 2).

Hoy en día, la mayoría de las termocicladoras de qPCR del mercado estiman el parámetro  $C_q$  por cada reacción y amplicón. Este valor se calcula en relación al umbral elegido por el usuario (generalmente, el software de dichas máquinas permite ajustar un umbral de fluorescencia ( $N_q$ ) tanto de forma manual como de forma automática). Con el valor de  $C_q$  obtenido usando una dilu-

48

**TABLA 1. Ecuación básica de análisis de qPCR y cálculo de la expresión relativa del transcrito de interés.**

$$\left. \begin{aligned} \text{Transcrito de interés: } N_{0,T} &= N_{q,T} / E_T^{C_{q,T}} \\ \text{Gen de referencia: } N_{0,R} &= N_{q,R} / E_R^{C_{q,R}} \end{aligned} \right\} \text{ratio de expresión por muestra}$$

$$\text{Ratio} = N_{0,T} / N_{0,R} = (N_{q,T} / E_T^{C_{q,T}}) (N_{q,R} / E_R^{C_{q,R}})$$

$$\text{Si } N_{q,T} = N_{q,R} = E_R^{C_{q,R}} / E_T^{C_{q,T}} = \begin{cases} \text{asumiendo } E_R = E_T \rightarrow E^{(C_{q,R} - C_{q,T})} \\ \text{asumiendo } E = 2 \rightarrow 2^{(C_{q,R} - C_{q,T})} \end{cases}$$

**TABLA 2. Ecuaciones para calcular las diferencias de expresión entre las muestras control y las tratadas.**

$X = \text{veces que difieren entre sí los niveles de expresión entre muestras control y tratadas}$

$$X = 2^{(C_{q,R} - C_{q,T})_{TREATED} / 2^{(C_{q,R} - C_{q,T})_{CONTROL}} \quad \text{Livak, Methods, 2001}$$

$$X = (E_R^{C_{q,R}} / E_T^{C_{q,T}})_{TREATED} / (E_R^{C_{q,R}} / E_T^{C_{q,T}})_{CONTROL}$$

$$X = E_T^{(C_{q,T,C} - C_{q,T,Tr})} / E_R^{(C_{q,R,C} - C_{q,R,Tr})} \quad \text{Pfaffl, NAR, 2001}$$

$$X = (N_{0,T} / N_{0,R})_{TREATED} / (N_{0,T} / N_{0,R})_{CONTROL} \quad \text{Ruijter, NAR, 2009}$$

ción seriada, también llamada curva estándar, el *software* o el usuario estiman la eficiencia de cada amplificación.

Para calcular las diferencias entre las condiciones control y experimentales, la mayoría de los usuarios usan la ecuación  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (Tabla 2, línea superior; Livak K and Schmittgen TD, *Method*, 2001, 25:402-408) e ignoran la eficiencia real obtenida en la PCR, asumiendo que esta tiene un valor constante de 2. Otros usuarios usan una cuantificación relativa de la eficiencia (se denomina *eficiencia corregida*) (Tabla 2, segunda línea; Pfaffl M et al, *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): 2003-7). Sin embargo, la cantidad de transcrito de interés por muestra y amplicón puede ser calculada como  $N_0 = N_q/EC^q$  y normalizada con los niveles de expresión de los genes de referencia; los cálculos de las diferencias de expresión del transcrito de interés pueden ser estimados a partir de los valores de  $N_0$ , lo cual evita la asunción de que la eficiencia de la PCR es constante (Tabla 2, línea de abajo; Ruijter JM et al, *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6): e45).

### 6. Análisis estadístico

Tras el cálculo de la expresión relativa de los genes por cada réplica experimental, la comparación estadística entre 2 condiciones biológicas distintas se realiza mediante un análisis de *t-Student* (para distribuciones normales) o un test de U de Mann-Whitney (para distribuciones no normales). Para comparar 3 grupos o más, se recomienda el uso del ANOVA, conjuntamente a un análisis post-hoc como el test de Tukey, o el test de Kruskal-Wallis. Para estudiar la dependencia entre genes y condiciones experimentales también se pueden realizar análisis de correlación y agrupaciones homogéneas.

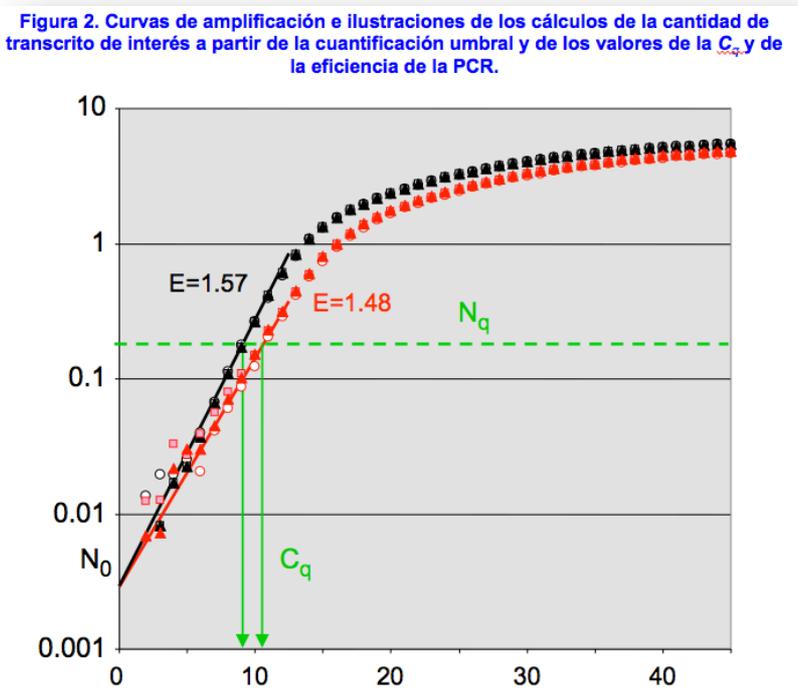
Con el objetivo de minimizar todas estas fuentes de variación potenciales, la mayoría de los usuarios usan el mismo método de extracción del RNA; fijan los criterios de calidad para el análisis de éste; emplean el mismo protocolo para la RT-PCR; y usan los mismos genes de referencia.

Las compañías que comercializan productos de RT-qPCR realizan un gran esfuerzo para facilitar el uso de esta tecnología a todos los usuarios y ofrecen muestras control, manuales de uso sencillos, soporte de problemas y dudas y organizan constantemente cursos o seminarios de formación para el diseño de este tipo de experimentos (Baker M, *Nature Methods*, 2011, 8(3): 207-212). A pesar de que se usan diferentes máquinas, aplicaciones y de que existe un mercado amplio de reactivos, toda la información dada tiende a facilitar la labor del usuario final para que éste solo tenga que *seguir el camino de baldosas amarillas*, que le llevará hasta el deseado *Mago de Oz*: el valor de la  $N_0$ .

### $C_q$ , E y $N_0$

Como se ha comentado previamente, los valores de  $C_q$ , E y  $N_0$  están estrechamente relacionados entre sí (figura 2). Sin embargo, se han descrito muchos métodos que estiman estos parámetros a partir de los datos de amplificación obtenidos. Es muy importante destacar como estas diferentes aproximaciones afectan al resultado final de expresión relativa del transcrito de interés en el análisis de la RT-qPCR.

La aplicación de las ecuaciones citadas en la figura 2 para el cálculo de  $N_0$  desde  $N_q$ ,  $C_q$  y E es matemáticamente idéntica al uso de la ecuación de la cinética de la PCR en el ciclo 0 de amplificación. Esto es más intuitivo cuando se representa la fluorescencia



Se muestran grupos de dos réplicas experimentales de curvas de amplificación donde la eficiencia de la PCR de una réplica (en rojo) fue inhibida al añadir *primers* modificados en 3' que previenen la elongación. La pérdida de eficiencia de la PCR conlleva un incremento del valor de la  $C_q$ . Los datos son obtenidos desde la base de datos *competimer* (<http://qPCRDataMethods.hfrc.nl>).

producida en un eje logarítmico: la región recta de la fase exponencial presenta una pendiente igual a  $\log(E)$  y su extrapolación al ciclo 0 da el valor  $N_0$  (figura 2).

La figura 2 muestra un experimento en el cual dos grupos de datos presentan la misma concentración del transcrito de interés, pero a uno de los grupos se le aplica una inhibición de la PCR (línea roja). Esto genera una eficiencia de amplificación menor, lo que conlleva un valor más alto de  $C_q$ . Sin embargo, al calcular el valor de  $N_0$  con la ecuación  $N_0 = N_q/E^{C_q}$ , la diferencia del valor de la  $C_q$  es compensada por el 9% de diferencia en la eficiencia de la PCR, sin afectar, por tanto, a la cuantificación observada del transcrito de interés. Desde otro punto de vista, a pesar de las fuertes diferencias entre las eficiencias de la PCR, el investigador determina el valor correcto de  $N_0$  en ambos grupos de réplicas. Así, si a la hora de indicar el valor de  $C_q$  se hubiese asumido una eficiencia constante, se hubiesen obtenido diferencias significativas NO REALES entre los dos grupos de análisis.

Este ejemplo muestra que es absolutamente esencial para el investigador estar seguro sobre la estimación de los parámetros de la RT-qPCR, especialmente del valor de la eficiencia de cada transcrito de interés. Los autores recomendamos ir un paso más allá: las *MIQE* indican cómo describir los valores de  $C_q$  y de la eficiencia, que los investigadores usarán principalmente como medida de la calidad del experimento. Sin embargo, el objetivo de un experimento de qPCR es determinar la cantidad del transcrito de interés, que se deriva del valor de la  $C_q$  individual tanto como de cada eficiencia de la PCR de cada transcrito. Describir sólo los valores de  $C_q$ , dejando fuera los de su eficiencia asociada, hace ignorar la dependencia de la qPCR a la eficiencia y puede llevar a resultados e interpretaciones erróneas. El valor de la eficiencia de la qPCR no solo es una propiedad del ensayo, sino un parámetro esencial en el cálculo correcto de la cantidad de transcrito de interés.

### LinRegPCR: el camino de baldosas amarillas

Tal y como hemos demostrado previamente, la eficiencia de la qPCR es un parámetro esencial y muy sensible a la hora de obtener un valor correcto de  $N_0$ . Se han publicado diferentes métodos que obtienen los parámetros de interés a partir de la curva de amplificación; todos estos métodos de análisis emplean diferentes algoritmos/aproximaciones para analizar las curvas de amplificación y determinar tanto la eficiencia como otros parámetros (Ruijter J et

al, *Methods*, 2013, 59(1): 32 - 46). Entre todos los parámetros que afectan fuertemente a la eficiencia, y en menor medida a la  $C_q$ , el más importante es la corrección de la línea de referencia de la fluorescencia (*baseline*) (Ruijter J et al *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6): e45). En base a esta premisa, nosotros recomendamos el uso del programa **LinRegPCR** (Ruijter J et al, *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6): e45) para analizar las curvas de amplificación de la RT-qPCR por tres razones principales:

1. LinRegPCR se basa en una sustracción de la línea base de fluorescencia que busca reconstruir la región lineal de la fase exponencial de una forma menos variable que la línea base dada por el sistema de la PCR después de que el usuario haya definido la fase de suelo de la reacción.

2. El programa define una ventana de datos que determina la mínima variación observada de la eficiencia de la PCR por amplificación y del  $C_q$  por reacción. Estos ajustes son automáticos, rápidos y fácilmente aplicables.

3. El programa genera pruebas de calidad basadas en el análisis de cada curva de amplificación. Adicionalmente, el usuario puede seleccionar manualmente los puntos más alejados de la media como consecuencia de un fallo durante la PCR en comparación con el resto de datos.

Estas tres propiedades del programa permiten al usuario obtener el valor real del  $N_0$  por amplificación y por muestra de una forma muy intuitiva.

En resumen, concluimos que la determinación de la eficiencia de la PCR es al menos tan importante como determinar la  $C_q$  para llegar al valor real del  $N_0$ . Determinar la eficiencia con el programa LinRegPCR es tan sencillo como seguir el camino de baldosas amarillas: buscar la fase exponencial de la curva de amplificación de cada transcrito de interés para obtener el valor real de  $N_0$ .

