

Capítulo séptimo

Tendencias tecnológicas

*Javier Vicente Sánchez
Domingo Marquina Díaz
Pedro Lorenzo González*

Resumen

El avance tecnológico ocurrido en los últimos años ha permitido un avance significativo en el campo de las ciencias de la vida. En un mundo globalizado que cuenta con tecnología interconectada y con aplicaciones múltiples, el desarrollo de una determinada aplicación para un sector en concreto rápidamente se expande a otros sectores y ámbitos, incrementando de manera exponencial la versatilidad de estos avances. Los diferentes avances en informática ocurridos desde mediados del siglo XX han permitido el diseño de nuevos procesos, aplicaciones y protocolos de análisis y manejo de datos biológicos, en especial en estas primeras décadas del siglo XXI. Los avances en el conocimiento sobre la estructura, función e ingeniería de los ácidos nucleicos, en especial ADN, han sido el motor que han permitido, y permiten, la rápida evolución de las tecnologías de ingeniería genética que permiten la edición de microorganismos haciendo que estos adquieran nuevas funciones, o incluso, crearlos desde cero aprovechando información genética depositada en bases de datos y generando microorganismos de manera sintética. La democratización de la ciencia, los protocolos y el conocimiento que la componen, ha hecho que numerosos actores, ya sean científicos de carrera o aficionados, puedan contribuir de manera sustancial al

progreso. El riesgo de estas nuevas tecnologías no reside en ellas mismas, si no en el uso que determinados actores maliciosos puedan hacer de ellas. Cualquier avance tecnológico diseñado para hacer el bien, en cualquier momento, se puede emplear para causar un daño, intencionado o no.

Palabras clave

Biotechnología, edición génica, bioinformática, biología sintética, síntesis de ADN, CRISPR-Cas, tecnología de doble uso, ciencia abierta.

Technological trends

Abstract

The technological advances in the last years have allowed an important development of life sciences. In a global world in which technology is interconnected with multiple options, the development of a certain application for a purpose is rapidly adapted for its application in other fields, exponentially increasing the versatility of such advances. Bioinformatics development since the middle of the 20th century has allowed the design of new process, applications, and analytical protocols for biological data management, especially in the first decades of this century. The advances regarding structure, function, and engineering of nucleic acids, especially DNA, have been the power that has allow, and nowadays allows, the development of genetic engineering techniques. These procedures enable the development of new functions in different microorganisms or even the development of synthetic ones using the genetic information from databases. Science democratization, together with the protocols and knowledge that conforms it, has triggered the collaboration of different people, scientific or amateur. The misuse of the new technologies by some actors conforms its risk since technology is designed for good purposes. Every technological development designed with a good objective could cause, in any moment, a deliberated, or unintended, harm.

Keywords

Biotechnology, genetic engineering, bioinformatics, synthetic biology, DNA synthesis, CRISPR-Cas, dual-use technology, open science.

1. Introducción

En los últimos años se ha producido un abismo en el conocimiento de las ciencias de la vida. Abismo que año a año va siendo más profundo por el aumento de los conocimientos en ciencia y tecnología. Estos avances han tenido como detonante principal la explosión en áreas esenciales como la biología molecular. En este mismo aspecto, si comparamos los conocimientos que poseemos actualmente con los que potencialmente obtendremos en los próximos años, podríamos considerarlos mínimos. Este abismo de conocimiento abierto en apenas los últimos 20 años no es causa en exclusiva del carácter del descubrimiento, si no, de la velocidad a la que estos se realizan. Esta velocidad viene definida por la inercia del desarrollo de la tecnología durante todo este periodo.

Este conocimiento desmesurado no solo se limita a aspectos sanitarios, sino también a aspectos relacionados con la agricultura, el ambiente, la biotecnología, etc. Diversos autores consideran que, todos estos cambios y avances en el conocimiento están provocando una gran revolución en las ciencias de la vida, revolución que, si es comparada con la revolución industrial del siglo XIX o las revoluciones socioculturales del siglo XX hacen que este, nuestro siglo, pueda ser considerado como el «siglo de la biología» (Moodie *et al.*, 2008).

Hasta este momento, la biología, se había centrado desde su remoto y difuso origen en el estudio de la naturaleza a través de la observación. Paralelamente, durante toda la historia de la humanidad, la naturaleza se ha explotado de una forma totalmente empírica, a través de la dicotomía prueba/error. Un ejemplo de este fenómeno es la selección continua de razas y/o especies en la ganadería y agricultura, pero también de aquellos fenómenos empíricos que actuaban de manera desconocida, como los procesos de fermentación microbiana para la conservación de alimentos. La revolución industrial del siglo XIX se basó en la explotación del máximo potencial de los recursos materiales y energéticos como respuesta a las nuevas necesidades (materiales) de una sociedad en ascenso mediante el aprovechamiento de los medios disponibles.

Así, podemos afirmar que una nueva ciencia, la biotecnología, surge para el empleo como instrumento de toda forma de vida aplicada para el beneficio humano, uso que se nutre de la observación y la

descripción tradicional de los procesos de la naturaleza, así como de la explotación empírica de diferentes aspectos. De la misma forma que la industria ha evolucionado a lo largo de todos estos siglos, la biotecnología ha avanzado adaptándose a las nuevas necesidades, modificando y mejorando los instrumentos (u organismos) según las necesidades de cada momento. La innovación es el principal motor del avance científico, en especial la innovación tecnológica que, no solo debe ser lo más avanzada, sino que también debe comprender un aspecto fundamental del progreso, hacer de lo viejo algo nuevo, es decir, mediante el aprovechamiento de tecnología disponible, crear nuevas aplicaciones o combinaciones que permitan el avance de la ciencia (Moodie *et al.*, 2008).

La convergencia entre la biología y química implican, entre otros, nuevos avances en toxicología y las neurociencias, la convergencia entre genómica e inteligencia artificial, automatización, robótica y computación, suponen importantes avances en los datos genómicos, su manejo y análisis. La unión entre genómica e inteligencia artificial, están a su vez modelando los avances en el desarrollo y creación de nuevos organismos, incluyendo humanos, y como nuestras diferencias y el entorno en el que vivimos (epigenética) nos hacen más susceptibles a enfermedades o a la respuesta frente a medicamentos y tratamientos. Así, los avances en inteligencia artificial y *machine learning* pueden hacer que el diseño de nuevos agentes biológicos para su empleo como armas sea mucho más específico, permitiendo el diseño de un agente que discrimine según del grupo racial, la carga o acervo génico, las vacunas recibidas u otras vulnerabilidades conocidas como ya ocurrió en diferentes programas biológicos en el que se diseñaron armas éticas (Ethno bomb, 1998 o Project Coast, 1988-1995 (Leitenberg *et al.*, 2012)). El *bigdata* y los *cloud labs*, laboratorios completamente robotizados disponibles en alquiler, facilitan el proceso de escalado de la experimentación, acortando el proceso de diseño-testeo-implantación y aumentando la ratio de éxito (Lentzos, 2020; Lentzos *et al.*, 2020).

A pesar de que estos avances se enfocan de manera general hacia la mejora de la calidad de vida a través de la optimización de tratamientos para determinadas enfermedades, el aumento de la producción agrícola o la eliminación de contaminantes en el ambiente, hace que las mismas tecnologías puedan ser empleadas con objetivos totalmente diferentes, como de destrucción y/o alteración de las condiciones de vida (Moodie *et al.*, 2008). Este pensamiento ya se recogió en la Estrategia Española de Seguridad

de 2011. Este hecho y otros similares hacen que, a los avances alcanzados en el sector biotecnológico y aquellos que están aún por venir, se les denomine herramientas de doble uso (término adaptado del inglés, *dual-use technologies*). Este concepto parte de la premisa de que todo avance tecnológico posee una doble vertiente. Los avances tecnológicos en origen son generalmente diseñados para obtener un noble objetivo, pero si esa tecnología emergente es empleada por ciertos grupos o sectores cuyo objetivo es totalmente diferente, pueden llegar a utilizarse, con distintos resultados, generalmente adversos para los seres humanos y el medio ambiente. Este concepto ha evolucionado progresivamente hacia el concepto *dual use research of concern* (DURC) para hacerlo así más restrictivo y que se refiera exclusivamente a determinadas investigaciones o técnicas que con el conocimiento actual, puedan, de manera anticipada, aportar conocimiento sobre productos o tecnologías que pueden directamente emplearse de manera inadecuada por otros con el objetivo de desestabilizar a la población, la salud y la seguridad (Lentzos, 2020). El objetivo político y legislativo tradicional ha sido el control de una lista de organismos patógenos empleados de manera tradicional como herramientas de destrucción masiva, así como el control de diferentes aspectos como la biocontención de estos cuando se emplean en laboratorio. Por el contrario, el concepto de DURC, adoptado por la legislación, incluiría, las nuevas herramientas biotecnológicas que pueden emplearse para la generación de microorganismos con características mejoradas en cuanto a patogenicidad, transmisión, mortalidad (mediante técnicas de edición génica), reordenación metabólica o incluso la generación de nuevos organismos empleando técnicas de biología sintética.

El desarrollo científico implica la difusión del conocimiento y la tecnología, lo que sumado al doble uso que se puede hacer de estos avances, ha provocado un cambio importante en la seguridad mundial como han manifestado el Comité Internacional de la Cruz Roja y Medina Luna Roja. Con el avance y el desarrollo de los procesos biotecnológicos, que son cada vez más baratos, eficientes y aplicables por una mayor diversidad de agentes, se ha incrementado la posibilidad de que alguien se encuentre interesado en un uso malicioso de esta. El acceso a infraestructuras y material biológico es, en algunas ocasiones, el menor de los problemas al que un determinado actor potencialmente agresivo se enfrenta si su objetivo es el empleo de un agente biológico *tradicional*. La infraestructura puede encontrarse en un laboratorio con unos medios básicos como laboratorios de investigación

en centros educativos o puede adquirirse de manera fácil a través de la red. En cuanto a los agentes biológicos, en caso de no tener acceso a aquellos depositados en colecciones por no tener los permisos necesarios, se puede llevar a cabo mediante procedimientos de aislamiento y selección de estos agentes que se encuentran presentes en la naturaleza. En la actualidad, el mayor riesgo se encuentra en el potencial que supone la biología sintética, que permite la creación (o modificación) de microorganismos o agentes biológicos prácticamente desde cero. Otro de los factores que más riesgo entraña para la seguridad es el hecho de que, en ocasiones, no es el material, si no el conocimiento, el desafío al que se enfrenta la seguridad. Las personas u organismos que poseen los conocimientos científicos para poder desarrollar todos estos procesos pueden decidir cómo aprovecharlos, así si se opta por la proliferación de agentes biológicos, una mayor disponibilidad de conocimientos permite situarse en un nivel superior en la curva de aprendizaje que lleva a alcanzar el éxito en un ataque biológico, lo que reduce los esfuerzos necesarios para lograr los objetivos.

A pesar de los riesgos que pueden llegar a suponer las tecnologías emergentes, debemos reconocer, que también pueden y, sobre todo, deben, jugar un papel fundamental en la prevención y la defensa frente a esos posibles ataques o actos subversivos empleando agentes biológicos. El avance en el conocimiento y las herramientas disponibles, deben servir para el desarrollo de sistemas para la vigilancia, detección y respuesta frente a posibles ataques empleando agentes biológicos conocidos o por conocer.

2. Bioinformática

En los últimos años, uno de los campos de las ciencias biológicas que más incrementos ha experimentado ha sido la bioinformática. Se trata de una subdisciplina que aúna la informática al servicio de las ciencias de la vida para el análisis, almacenamiento y diseminación de datos biológicos.

La bioinformática, podemos decir que es una ciencia en sí misma, transversal a varias áreas de la ciencia: ingeniería, programación, física, matemática, estadística, y claro está, la biología y todas sus ramas. Al tratarse de una disciplina transversal a multitud de campos de la ciencia, es, actualmente, la viga maestra sobre la que se apoyan todas las disciplinas de las ciencias de la vida.

A pesar de ser una ciencia que ha sufrido su mayor crecimiento y aplicación en las últimas décadas, el origen de esta disciplina se remonta a mucho antes, cuando los ordenadores de sobremesa eran impensables y la importancia del ADN apenas se estaba comenzando a vislumbrar (en 1952 se demuestra el papel que desempeña el ADN en el almacenamiento de información y en 1953 Watson y Crick publican sus estudios sobre la estructura en doble hélice del ADN). Es en la década de 1950 cuando aparecen las primeras aplicaciones de la bioinformática, basados, no en el análisis del ADN, si no de las proteínas. Esta primera aproximación se logró gracias al avance en las técnicas de cristalización de proteínas que permitieron la secuenciación de las primeras proteínas a través del método desarrollado por Edman que permitía secuenciar pequeños péptidos de hasta 60 residuos. Determinar la estructura primaria de una proteína de alto peso molecular requería, primero, fragmentar y secuenciar cada uno de estos fragmentos para, después, unir las diferentes secuencias obtenidas. El procesado de estas uniones para dar lugar a una sola cadena de mayor longitud fue lo que propició el interés por el desarrollo de diferentes procesos que automatizasen el alineamiento. Así, a inicios de los años 60 se desarrolló el primer *software* conocido para análisis bioinformático (Gauthier *et al.*, 2019).

El primer programa informático fue un hito en la automatización del análisis, pero no dejaba de ser una colaboración *puntual* entre dos campos científicos bastante alejados: biología e informática. El verdadero origen de la bioinformática se lo debemos a Margaret Dayhoff, química-física americana pionera en la aplicación de diferentes métodos computacionales en el campo de la bioquímica. David J. Lipman, director del NCBI (National Center for Biotechnology Information), la describió como «la madre y el padre de la bioinformática».

Posteriormente, con la democratización de los conocimientos en bioinformática y principalmente en el continente americano, se consiguieron importantes avances, como el alineamiento múltiple de secuencias proteicas para establecer relaciones filogenéticas. A partir de este momento se comenzaron a desarrollar diferentes métodos de análisis de filogenia basados en el alineamiento de secuencias y en el análisis matemático de estos. Por tanto, es en este punto, donde la bioinformática pasó de ser una herramienta más a un fin en sí mismo.

A finales de los años 60 fue cuando se terminó de relacionar la información contenida en el ADN con la contenida en las proteínas

a través del análisis y descripción de todos los codones empleados en la traducción de ADN a proteínas. Por tanto, cuando el ADN comienza a ser relevante y somos capaces de comprender la información que contiene a través de las proteínas que sintetiza. No es hasta 1977, 25 años después de haber secuenciado la primera proteína, cuando el equipo de Frederick Sanger describe el protocolo de síntesis y electroforesis para la secuenciación del ADN que, con ciertas modificaciones, es el método que se sigue empleando para la secuenciación del ADN (Gauthier *et al.*, 2019). Desde ese momento, se desarrollaron múltiples aplicaciones de análisis bioinformática de secuencias de ADN, para el alineamiento, comparación o búsqueda de patrones o motivos en estas secuencias.

En 1977 aparece el primer ordenador destinado a usuarios. La democratización de la tecnología hace que múltiples entidades desarrollen herramientas bioinformáticas de utilización en cualquier laboratorio. En 1984, un grupo de investigación en genética de la Universidad de Wisconsin lanza el primer programa de análisis bioinformático para usarse en estos ordenadores a nivel de usuario, destinado a la manipulación de secuencias de ADN, ARN o proteínas. Desde ese momento, se han liberado multitud de *softwares* para el manejo de información genética y proteínas, de acceso libre y fácil aplicación. Con la liberación de programas y el uso extendido del ordenador de sobremesa, la bioinformática pasa de ser un campo restringido a la élite científica para comenzar a ser una herramienta absolutamente democrática en cualquier campo de las ciencias de la vida.

Durante todo este tiempo han aparecido diferentes movimientos de *software* libre, programas no sometidos a licencias de marcas o servidores en los que al tratarse de un método experimental más, se considera que debe ser de libre acceso, uso y modificación para toda la comunidad científica. En 1985 Richard Stallman publica el primer manifiesto por el código abierto, el manifiesto GNU, con la motivación de crear un sistema basado en Unix gratuito. Este movimiento se transformó posteriormente en la Fundación de Software Libre, la encargada de mantener la filosofía del acceso libre y gratuito a todos los recursos bioinformáticos. Desde ese momento, tomando como inspiración ese movimiento, han surgido diferentes plataformas como el European Molecular Biology Open Software Suite en el año 1995. No solo ha resultado fundamental la liberación de los diferentes *softwares* desarrollados, si no también, la liberación de datos de manera homogénea,

libre y sin restricciones. A partir de 1986, el European Molecular Biology Laboratory (EMBL), GeneBank y el Data Bank of Japan (DDBJ), llegaron a diferentes acuerdos para la unificación de datos, estandarizando formatos e interconectando el contenido de sus bases.

Alrededor de la década de 1980 se desarrollan multitud de lenguajes de programación enfocados a la biología, como Perl (Practical Extraction and Reporting Language) nacido en 1987 o Python en 1989, diseñado con una sintaxis mucho más sencilla que hace que el código de programación sea fácilmente interpretable sin un elevado conocimiento informático. A partir de los años 2000 se publican las primeras librerías específicas para análisis bioinformático y Python comienza a desplazar a Perl. Hasta ahora han surgido otros lenguajes de programación como C, R o Java que han contribuido al desarrollo de la bioinformática en diferentes aspectos, como el análisis estadístico y visualización de datos con aplicación en metagenómica, transcriptómica o biología de sistemas. La aparición de esta batería de programas enfocados al análisis de datos bioinformáticos de cualquier naturaleza facilitó la explosión de datos de biología molecular ocurrida desde finales del siglo pasado. Sin este tipo de programas bioinformáticos, rudimentarios, pero de gran valía, no habría sido posible la obtención de los primeros genomas de diferentes organismos a comienzos de los años 1990.

No solo se han diseñado y liberado programas para su uso en ordenadores personales o servidores locales, sino que también han surgido importantes iniciativas de bioinformática en línea, donde se emplean servidores externos y de acceso libre para diferentes operaciones. Desde la aparición de la World Wide Web (WWW) a inicios de 1990, numerosas bases de datos se han incorporado a este sistema, además de haber liberado parte de sus servidores para el público en general. Entre 1992 y 1993, tanto la EMBL como el NCBI se incorporaron de manera pública a la WWW, desapareciendo paulatinamente, sus anteriores formas de compartir información, basadas en ediciones en texto y CD. En 1994, el NCBI crea su web, incluyendo accesos a la versión primitiva de BLAST (Basic Local Alignment Tool) programa ampliamente utilizado para el alineamiento de secuencias de ADN o proteínas frente a la base de datos del NCBI, así como otras bases que se liberaron progresivamente: Genomes (1995), base de datos que contiene todos los genomas de multitud de organismos depositados por cualquier investigador, disponibles y

accesibles a cualquier persona o PubMed (1997) base de datos de información y bibliografía científica.

Poco a poco, los investigadores y desarrolladores de programación diseñaron diferentes programas de ejecución on-line que evitaba el paso de instalación y empleo de los programas mediante códigos de programación. Así, desarrollando interfaces sencillas, y visualmente atractivas hicieron que cualquier usuario sin ningún tipo de conocimiento avanzado en informática o programación pudiera emplear este tipo de herramientas.

La primera década del siglo XXI (2000-2010) se considera como la era de la bioinformática de alto rendimiento. Es la década en la que la secuenciación del ADN se ha democratizado con la aparición de diferentes técnicas de secuenciación, denominadas de segunda generación, que permiten la secuenciación de miles o millones de cadenas de ADN en una sola plataforma y al mismo tiempo, planteando nuevos retos computacionales y la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de análisis y procesado de la cantidad masiva de datos generados. La explosión de datos generados se debe, no solo al abaratamiento de las técnicas de secuenciación (en 2001, cada megabase secuenciada costaba unos 10 millones de dólares, en la actualidad sobre 1), sino también al desarrollo de técnicas de análisis más sencillas y aplicables.

En el año 2015 se estimó que, en 2025, la genómica sería el sector que mayor cantidad de datos y almacenamiento requerirá en todo el mundo. Se estima que la genómica genere al año entre 2 y 40 exabytes (109 GB; EB / año), seguido de YouTube (1-2 EB / año), la astronomía (1 EB/año) y Twitter (0,017 EB / año). Tal cantidad de datos, públicos y privados requiere no solo de potencia informática para su análisis y manejo, sino también para su almacenamiento. Gran cantidad de datos, se encuentran depositados en bases de acceso público, controladas por diferentes instituciones científicas (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002195>). No obstante, algunas compañías como Amazon (<https://aws.amazon.com/es/health/genomics/>) o Microsoft (<https://azure.microsoft.com/es-es/services/genomics/>), ofrecen diferentes servicios de análisis y almacenamiento de datos genómicos. Otras plataformas de ciencia colaborativa como BOINC, desarrollada en la Universidad de Berkley, resultan de interés. BOINC es una plataforma en la que expertos pueden lanzar diferentes trabajos que son posteriormente ejecutados aprovechando los recursos computacionales ofrecidos por otros usuarios.

Existen también herramientas para la construcción de rutas genéticas optimizadas como Autodesk's Genetic Constructor o Cello, ambas con una interfaz cómoda de usar que permiten el diseño de diferentes circuitos genéticos para ser empleados en estudios de ingeniería metabólica en diferentes organismos, el diseño modular de proteínas (como Pinecone) o diferentes herramientas online para el diseño de experimentos que implican el uso de CRISPR. En los últimos años se ha puesto de manifiesto el aumento significativo de herramientas bioinformáticas fáciles de usar que no requieran un elevado conocimiento informático para su uso además de diferentes comunidades o plataformas para la diversificación del uso de estas herramientas y de ayuda en el uso de estas.

La biología tiende actualmente a una visión holística de la vida, interrelacionando toda la información disponible. Esto requiere el desarrollo de nuevas técnicas analíticas y de procesado de datos. El desarrollo de diferentes tecnologías ómicas son clave para lograr este objetivo junto con el desarrollo de la biología sintética, que se nutre de la bioinformática y la biología de sistemas. El siguiente paso será la biología sintética *in silico*. El desarrollo de nuevas técnicas analíticas y la interconexión entre campos permite, por ejemplo, la aplicación de diferentes herramientas inmunoinformáticas, que permiten el análisis computacional del genoma completo de un determinado microorganismo para la búsqueda de genes codificantes para proteínas que sean la mejor diana para un tratamiento terapéutico como una vacuna (Kumar & Flora, 2020).

Existen dos factores fundamentales para mejorar el empleo de herramientas en bioinformática: nuevas técnicas en el manejo de datos (meta)genómicos y mejora de los sistemas de detección microbiana. Los estudios en biodefensa deben aprovecharse del conocimiento generado en otras investigaciones, aún distantes en los objetivos que persiguen. Algunos de los retos a los que se debe hacer frente en este aspecto son los siguientes (Valdivia-Granda, 2010):

- A pesar de los avances en biología computacional, no hay un avance significativo que permita la identificación de diferentes regiones genómicas de microorganismos relevantes para la biodefensa.
- Existe un elevado grado de desarrollo de las técnicas que permiten la comparación e identificación de motivos, patrones y

estructuras en proteínas, pero aún no se ha conseguido la discriminación de regiones que guardan una determinada relación, pero con origen evolutivo absolutamente diferentes (parálogo), provocando una pérdida en la sensibilidad y especificidad de los cebadores y sondas de detección.

- No existe un protocolo normalizado para identificar, computacionalmente, las regiones genómicas que permiten la detección de organismos con potencial interés en biodefensa bien para diagnóstico, detección forense o la aplicación de contramedidas.

Existen multitud de estudios basados en el muestreo y análisis genómicos empleando diferentes técnicas en multitud de ambientes naturales o antrópicos a lo largo de todo el mundo, así, de manera indirecta, se toman muestras ambientales, de multitud de organismos, bacterias, hongos o virus patógenos o no. De manera general, no existe un consenso en los datos a recoger en la toma de muestras o en la información que debe acompañar a todos los datos generados en este proceso. Resulta por tanto imprescindible, primero, el desarrollo de una terminología homogénea para describir los detalles del muestreo. A pesar de que existen diferentes sistemas de manejo de información científica, como el sistema LIMS, este tipo de sistemas requieren del desarrollo e implementación de un lenguaje más adaptado. Esta modificación haría más fácil la interoperabilidad entre las diferentes bases de datos. Así, las autoridades en biodefensa deberían perfilar una serie de descriptores a incluir en los muestreos, un protocolo de descripción, así como información adicional que no se incluye tradicionalmente en los diferentes formatos de almacenamiento de datos e información de ontología. Algunas iniciativas como el Global Emerging Infectious Disease Surveillance and Response System (GEIS) y el Pathogen Information Markup Language (PIML) persiguen la inclusión de diferentes atributos en las bases de datos. Además, resulta fundamental integrar el sistema de análisis genómico de microorganismos a través de la mejora de diferentes aspectos: desarrollo de nuevas técnicas de moleculares, una base de datos curada con información genómica de aplicación en defensa (incluyendo una óptima información espaciotemporal de acuerdo a lo arriba descrito), desarrollo de mejora de algoritmos de nueva generación para el análisis estadístico y comparativo en la comparación de muestras y perfiles de ADN, así como un registro único de infraestructura BSL-3

y BSL-4 y de investigadores con conocimientos clave en las diferentes disciplinas (Valdivia-Granda, 2010).

Por tanto, la diversidad de riesgos biológicos a los que potencialmente nos podemos enfrentar requieren de una gran cantidad de datos genómicos correctamente almacenados y anotados, así como de una potencia computacional suficiente para el procesamiento y análisis de estos para la detección de toda posible característica que puede ser aprovechada con fines viles, además de la modelización de todas aquellas características biológicas que nos permitan anticipar la posible creación de agentes biológicos sintéticos o quiméricos. Resulta esencial también la mejora de los sistemas de clasificación microbianos, considerando no solo las diferencias entre las secuencias genómicas, si no los patrones entre las diferencias encontradas, incorporando además el análisis multidimensional de los metadatos generados cuando se han creado las diferentes colecciones. El diseño de redes neuronales o árboles de clasificación pueden ser útiles para el seguimiento de las diferentes regiones genómicas expuestas a una elevada presión selectiva que pueden resultar en nuevos brotes de enfermedades o la ganancia de función en una determinada especie.

3. Bioprospección

La bioprospección es la búsqueda sistemática de genes, compuestos naturales, diseños y organismos completos en el medioambiente con un potencial en el desarrollo de productos por observación biológica, biofísica, bioquímica y a través de métodos genómicos sin alteración del medio natural. La biodiversidad que habita el planeta aporta tres fuentes clave de inspiración a la ciencia moderna: los productos químicos sintetizados, los genes y las estructuras biológicas. Así, números campos de estudio, entre los que se incluyen el diseño de fármacos, agroquímica, desarrollo de proteínas recombinantes, enzimas, ingeniería mecánica y de sensores, pueden (y deben) inspirarse en estas fuentes.

Los avances no solo han sido posibles gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, si no también gracias al avance de las técnicas de análisis bioinformático y las mejoras en el almacenamiento y anotación de los datos. A pesar de que el empleo de métodos *in silico* no pueden sustituir los métodos *in vitro*, en la actualidad sí que permiten obtener una importante cantidad de información para comprender el papel ecológico y el potencial

de los diferentes microorganismos que habitan en un ambiente concreto además del diseño de futuras estrategias de bioprospección y aislamiento de microorganismos viables en el futuro (Vuong *et al.*, 2022). El aprovechamiento de estos recursos depende en gran medida de las técnicas de secuenciación masiva de segunda y tercera generación. Este tipos de técnicas son independientes de cultivo, lo que posibilita el estudio de géneros y especies no cultivables de microorganismos, además de la síntesis de genes artificiales o quiméricos en otro tipo de organismos. En la actualidad disponemos de tres niveles de tecnología diferentes en relación con las técnicas de secuenciación de ADN, generalmente denominadas Sanger (primera generación) y NGS (segunda y tercera generación):

- *Técnicas de primera generación*: apareció en 1977, se basa en la secuenciación por síntesis, la principal técnica es la secuenciación Sanger. Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN por electroforesis capilar que son el producto de la incorporación selectiva de didesoxinucleótidos marcados fluorescentemente que impiden continuar la síntesis de ADN.
- *Técnicas de segunda generación*: aparecieron a inicios de los años 2000. El conjunto de técnicas desarrolladas en este periodo se basa en la amplificación clonal de ADN, la secuenciación masiva de forma paralela de numerosos fragmentos y la detección directa sin electroforesis, lo que implica que la longitud de las secuencias sean limitadas. Las principales técnicas son: *pirosecuenciación* (sistemas 454/Roche), detecta luminiscencia proporcional a la liberación de pirofosfatos de la polimerización del ADN; *terminación reversible* (sistemas Illumina), detecta la fluorescencia liberada tras la unión de desoxinucleótidos marcados fluorescentemente de manera reversible; *secuenciación por ligandos* (sistemas ABI/SOLiD), detecta secuencias cortas de 8 nucleótidos secuencialmente ligados con marcadores fluorescentes; *secuenciación por semiconductores* (sistemas Ion Torrent), detecta iones de hidrógeno liberados durante la polimerización del ADN.
- *Técnicas de tercera generación*: aparecen alrededor del años 2010, se basan en la secuenciación de una única molécula de ADN, sin requerir una amplificación previa, y permiten la lectura de secuencias ultralargas. Las principales técnicas disponibles son: *secuenciación SMRT* (sistemas PacBio), detecta nucleótidos fluorescentes incorporados por una DNA polimerasa inmovilizada en una guía de onda de modo cero; *secuencia-*

ción por nanoporos (sistemas Oxford), detecta cambios en el flujo de iones producido por el paso de los diferentes nucleótidos a través de un nanoporo. Este tipo de técnicas utilizan una infraestructura barata y compacta, en la que el secuenciador no es más grande que un teléfono móvil y solo requiere de conexión a un ordenador portátil. El empleo de este tipo de técnicas ha permitido que en la actualidad se consiga secuenciar la información génica de una única célula (*single-cell genomics*).

El empleo de las diferentes técnicas de secuenciación resulta fundamental para la correcta biovigilancia de enfermedades emergentes o la anticipación frente a la liberación intencionada de agentes biológicos. La biovigilancia implica la adquisición, comparación e interpretación de datos biológicos para la comunicación y la toma de medidas correctoras frente a enfermedades emergentes, así como a cualquier amenaza biológica independientemente de su origen (Minogue *et al.*, 2019). Para ello, es esencial conocer en tiempo real la circulación de patógenos y diferentes organismos que puedan causar un daño real y poder decretar las alarmas necesarias. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva de ADN resultan fundamentales, actúan como «filtros ciegos» en los que no hay una diana concreta a diferencia de las técnicas tradicionales, donde se emplean PCR en tiempo real o inmunoensayos para la detección de un tipo o un conjunto de microorganismos concretos. La implementación de estas técnicas nos permite un incremento exponencial de la capacidad de detección, no solo de patógenos conocidos, sino también de los desconocidos o de microorganismos modificados genéticamente o sintéticos.

El conjunto de estas técnicas resulta fundamental no solo para la vigilancia, sino también para el diagnóstico clínico y forense, como resaltó ya el grupo de trabajo de ciencia y tecnología de la OTAN en 2019. El uso de estas técnicas permitió la descripción de un nuevo rhabdovirus, Bas Congo virus, en un paciente que presentaba fiebre hemorrágica y la PCR específica para los virus hemorrágicos conocidos daba resultado negativo (Minogue *et al.*, 2019). La secuenciación por NGS de esta muestra clínica permitió, primero, describir un nuevo virus hemorrágico y, segundo, la toma de medidas preventivas. Al disponer de prácticamente el genoma completo del virus se diseñaron tanto un protocolo de PCR directa para la detección del virus, así como una prueba para la detección serológica del mismo. En la ola de casos de ébola ocurrida en 2014 en el oeste de África, la aplicación

de este tipo de técnicas resultó de la misma forma esencial para el control de la epidemia. Las técnicas de NGS se aplicaron tanto para caracterizar el genoma del virus que estaba causando esta nueva ola como para determinar las dinámicas de transmisión del virus. Así, se puede determinar la plasticidad del genoma del virus y la forma de transmisión de este (vía sexual) para la toma de medidas correctoras y el diagnóstico *in situ*. La plasticidad (diversidad) en el genoma de las diferentes muestras aisladas puso de manifiesto la inadecuación de algunas de las técnicas de diagnóstico empleadas hasta aquel momento. Las técnicas de tercera generación (principalmente nanoporos) se han empleado en la detección de diferentes virus en muestras clínicas humanas, con tiempos de detección de entre 10 en caso de carga vírica alta (virus del ébola) y 40 minutos en caso de carga vírica baja (virus de la hepatitis C) (Minogue *et al.*, 2019).

Uno de los papeles más importantes de las técnicas de secuenciación masiva en lo relativo a la biovigilancia es el control de microorganismos o virus liberados de manera accidental o intencionada. El empleo de ADN sintético ha permitido la creación de partículas virales infectivas, tecnología que podría emplearse para la síntesis de diferentes tipos de virus, que pueden además combinarse con algún tipo de edición génica para incrementar la patogenicidad del virus o microorganismos que se desee. En el caso de que este tipo de modificaciones o virus no se esperen, escaparían a las técnicas empleadas tradicionalmente, no así, a los «filtros ciegos» basados en NGS, que, con un procesamiento posterior de los datos, no solo detectaría el virus, si no las modificaciones incluidas por diferentes técnicas de edición génica en el mismo. Este tipo de técnicas se ha empleado, por ejemplo, en la detección de organismos modificados genéticamente utilizados como aditivos en alimentos en productos importados desde China a través de Alemania (Minogue *et al.*, 2019).

Las principales limitaciones de este tipo de técnicas se basan en la discriminación del ruido presente en las muestras, que pueden ocultar la presencia de microorganismos en bajas densidades, lo que requiere de una adecuada profundidad de secuenciación (secuenciación de alta densidad) y un adecuado procesamiento y filtrado de las secuencias resultantes. Requiere además de una estandarización y validación que permita que los resultados puedan ser empleados de manera posterior como pruebas legales frente a una corte penal, lo que implica el diseño de protocolos para la toma, custodia y procesamiento de muestras. Las técnicas

empleadas de manera tradicional como la PCR en tiempo real etc., requieren incluir un control positivo (*gold standard*) para dar el resultado como válido, las técnicas de secuenciación masiva requieren de una base de datos curada y depurada de calidad (Minogue *et al.*, 2019). La FDA de los EE. UU. dispone de una de estas bases de credibilidad internacional y acceso público depositada en el NCBI. Esta base se creó a petición de la FDA, ya que define las técnicas de secuenciación masiva como un conjunto de técnicas que incluyen desde el laboratorio de biología molecular al análisis bioinformático de los resultados que permiten dar un diagnóstico (Minogue *et al.*, 2019).

4. Herramientas de edición genética

La descripción de las técnicas de ADN recombinante a comienzos de 1970 permitió el desarrollo posterior de la biología molecular y la ingeniería genética, así como su aplicación con fines bélicos, como durante el programa biológico soviético de 1973, Biopreparat (Ainscough, 2002). Con el conjunto de herramientas que aporta la ingeniería genética se han clonado y editado multitud de secuencias, codificantes para diferentes tipos de moléculas, procesos metabólicos y fines en multitud de organismos diferentes, de bacterias o virus a organismos superiores (Creager, 2020).

Podemos definir clonación como sinónimo de copia, la copia de información genética de un organismo a otro mediante el empleo de diferentes vectores y técnicas (Creager, 2020). Por el contrario, la edición génica es la modificación de una secuencia específica de ADN mediante el empleo de enzimas que producen cortes en este (nucleasas) y así, en el caso de que sea necesario, introducir, modificar o eliminar fragmentos específicos de ADN.

Las técnicas tradicionales de ganancia (o adquisición) de funciones se basan en el empleo de plásmidos y marcadores de selección. La información molecular necesaria para que una bacteria presente una determinada actividad se consigue introduciendo el gen (o genes) en un elemento extracromosómico, un plásmido, para posteriormente seleccionar aquellos clones que presentan el marcador de selección incluido.

Existen multitud de herramientas de edición genómica en función del tipo de enzima empleada para introducir el corte en el ADN, pero el resultado siempre es el mismo, un corte en el ADN.

Una vez ocurrido el corte, en todos los casos, se presentan dos opciones:

- Unión de extremos no homólogos: *non-homologous end joining* (NHEJ), una vez producido el corte en el ADN, es la maquinaria celular encargada de reparar esa rotura en el ADN sin ningún tipo de molde o referencia así, durante este proceso, ocurren mutaciones puntuales (INDELS) que provocan la interrupción del gen donde se ha producido el corte, bien por introducción o delección de nucleótidos.
- Reparación dirigida por homología: *homology-directed repair* (HDR), una vez producido el corte, el ADN fragmentado se repara empleando como molde un ADN exógeno en el que parte de la secuencia es homóloga a la región diana, introduciendo así las modificaciones necesarias.

Por tanto, la edición genómica requiere de una enzima que se encargue del corte del ADN genómico diana. Las enzimas empleadas han ido variando en función de la tecnología y el desarrollo de esta (Tröder y Zevnik, 2022). Así, a lo largo del tiempo han aparecido diferentes herramientas para la edición de genomas:

- Meganucleasas: descubiertas en 1985 en levaduras, posteriormente se han encontrado en otros grupos microbianos. Poseen un sitio de reconocimiento fijo, definido por 20-30 nucleótidos, lo que limita el número de genes diana. Posteriormente se modificaron estructuralmente para incrementar la flexibilidad de reconocimiento, reestructurando la proteína completa en cada edición génica.
- Dedos de zinc: *zinc fingers*, descritos en 1985 en oocitos de rana, posteriormente encontrados en otros organismos. Son pequeños motivos de proteínas que poseen la capacidad de unirse específicamente al ADN y estabilizarse por un ión zinc. El reconocimiento de la zona de edición se hace en base a una cascada de módulos que reconocen de manera específica tres nucleótidos.
- Nucleasas de actividad similar al activador de la transcripción: *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN), descritas en 2010 como alternativa a los *zinc fingers*, después de descubrir módulos de reconocimiento de ADN formados por ADN en bacterias del género *Xantomonas*. Estos módulos regulan de manera específica la expresión de los genes del vegetal parasitado en función de una región de unión específica a

una secuencia de ADN. Si estos módulos se ligan *in vitro* a una nucleasa similar a la empleada en los *zinc fingers* se puede editar el ADN de una manera mucho más flexible y simple.

- Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), descritas originalmente en 2003 y su aplicación para edición genética en 2013. Son pequeñas regiones presentes en el genoma de las bacterias que proceden de infecciones víricas anteriores y que son reconocidas específicamente por una nucleasa (Cas). Conforman el sistema inmune natural de diferentes bacterias, ya que permiten destruir las partículas virales que infectan la célula. Si la molécula que participa en el reconocimiento específico de la secuencia de ADN a degradar se sustituye por una secuencia de 20 a 30 nucleótidos específica, la nucleasa producirá cortes exclusivamente en la zona indicada, lo que permite la posterior reparación mediante NHEJ/HDR.

Por lo tanto, el sistema CRISPR/Cas requiere de una ribonucleoproteína, esto es, una proteína (nucleasa, Cas) unida a una molécula de ARN. La molécula de ARN, a su vez, tiene dos regiones diferenciadas: *crRNA*, forma un «armazón» que la nucleasa emplea para adoptar su conformación estructural envolviéndose sobre este para desempeñar su función de manera adecuada; *tracrRNA*, aporta la especificidad del corte, formada por una región de entre 20-30 nucleótidos complementarios (específicos) a la región que se desea modificar. Entre estas dos regiones se localiza la región PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) una región de tres nucleótidos reconocida por la nucleasa y sobre la que se ancla para realizar el corte. Una vez realizado el corte todo el complejo se libera y la maquinaria celular es la encargada de reparar el corte mediante NHEJ/HDR. Respecto a la nucleasa Cas, tradicionalmente se emplea la Cas 9 de *Streptococcus pyogenes* (Cas9) pero existen otras nucleasas procedentes de otros microorganismos que también se emplean (por ejemplo, Cas12 o Cas13) (West y Gronvall, 2020). Adicionalmente, se han realizado modificaciones en estas enzimas para diferentes fines como el corte de una sola hebra de ADN, funciones activadoras o de inhibición de genes, etc.

El desarrollo y mejora de las técnicas de edición génica ha facilitado su empleo y aplicación, en especial el sistema CRISPR/Cas. Por ejemplo, en EE. UU. se ha empleado para la edición de semillas de interés en agroalimentación. Ya estas modificaciones

escapan a la regulación establecida por la FDA (Carter y Warner, 2018). La industria de biosensores se encuentra en la actualidad en un crecimiento exponencial. Los sensores de primera generación no solo se basan en el empleo de células editadas para responder a un cierto estímulo, si no que el propio sistema CRISPR/Cas es el biosensor para la detección de, por ejemplo, una determinada enfermedad. Mammoth Biosciences (EE. UU.) comercializa un sensor para la detección de diferentes microorganismos patógenos en el hogar mediante un sistema DETECTR (*DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter*). Existen otros sistemas, como SHERLOCK (*Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*) detectan secuencias de ADN de interés del tipo que sean. Los sensores de segunda generación permitirán aplicaciones más diversas, y se integrarán en tatuajes o tejidos para la detección de condiciones fisiológicas o ambientales, o incluso integrados en bacterias o vegetales que serán sensibles a la presencia de minas o explosivos (Carter y Warner, 2018). Otro campo de estudio que ha sido objetivo de desarrollo desde la aparición de las primeras técnicas de edición génica es la ingeniería metabólica, que permite, no solo la producción de determinadas sustancias por parte de los organismos modificados genéticamente, sino también el diseño de estos para que presenten unas determinadas características que permitan su aplicación directa en ambientes extremos (Carter y Warner, 2018). El desarrollo de la ingeniería metabólica permitirá obtener nuevos materiales, como seda de araña o componentes electrónicos de origen microbiano (Carter y Warner, 2018). Otras aplicaciones de los sistemas de CRISPR/Cas se basan en la corrección de desórdenes cromosómicos, prevención y tratamiento del cáncer, tratamiento de infecciones virales crónicas, o el desarrollo y mejora de modelos de experimentación (organismos o líneas celulares) (Ouagrham-Gormley y Fye-Marnien, 2019).

Una de las aplicaciones más controvertidas de los sistemas CRISPR/Cas es la generación de impulsores génicos (*gene drive*). Este abordaje se basa en un rasgo modificado que se hereda en (micro)organismos con reproducción sexual. Un organismo que ha sufrido este tipo de modificación hace imponer su rasgo frente al de su pareja silvestre, impulsando o dirigiendo de esta forma los rasgos que una determinada población presenta. Una aplicación de este tipo de abordaje es la eliminación de mosquitos vectores de la malaria, aunque aún se trabaja en la mejora de la difusión de estos impulsores en la población, así como en técnicas que permitan el control de estos dentro de una área

geográfica concreta. Otros abordajes menos agresivos, como el reemplazo génico (*gene replacement*), pretenden no acabar con los individuos, si no sustituir un rasgo negativo por uno neutro, como hacer a los mosquitos incapaces de transmitir la malaria (Carter y Warner, 2018). El desarrollo de técnicas de control de estos impulsores o reemplazos génicos es el cuello de botella al que se enfrenta este tipo de aplicaciones, ya que, a nivel de laboratorio, esas modificaciones son posibles de alcanzar.

Otra de las aplicaciones de los sistemas CRISPR es la incorporación de nuevas moléculas de ADN en el genoma que contienen nuevos nucleótidos y que quedan insertos en el genoma del organismo. Sin duda, esto afectará al organismo, pero amplía de manera notable la versatilidad y aplicaciones de las herramientas disponibles. Empresas como Synthorx (California, EE. UU.) se han interesado en este tipo de modificaciones, incrementado a seis el número de nucleótidos posibles. Así, la posibilidad de crear y modificar selectivamente nuevos códigos genéticos abre un nuevo frente en el campo de la ingeniería genética. Por ejemplo, el uso de este nuevo código genético basado en seis nucleótidos ha permitido el diseño de nuevas proteínas sintéticas con función terapéutica que tienen una actividad mejorada respecto a la proteína original (West y Gronvall, 2020).

El Departamento de Defensa de los EE. UU. ha financiado diferentes proyectos que tienen como objetivo la aplicación de este tipo de modificaciones génicas para el desarrollo de herramientas diagnósticas, organismos editados para eliminar vectores de enfermedades o el desarrollo de biosensores y nuevos organismos con aplicación en biorremediación, desarrollo de nuevos materiales de cobertura y estructurales así como microorganismos productores de biocombustibles u otros materiales para aplicación *in situ* (Carter y Warner, 2018).

Indudablemente los logros alcanzados con la aplicación de los sistemas CRISPR/Cas en relación con la edición génica son excelentes, no obstante, las modificaciones no deseadas (*off-target effects*) son numerosas. No se consideran efectos secundarios, pero, potencialmente, pueden ser mucho más perjudiciales, ya que no desaparecen cuando se elimina el agente causante (West y Gronvall, 2020). En ocasiones, las modificaciones indeseadas son el fruto del diseño poco acertado de las moléculas guía que aportan la especificidad de corte a la enzima. Se producen cortes en lugares no deseados del genoma, diferentes al deseado, dando lugar a mutaciones con efectos negativos que pueden

llevar al fracaso del proyecto por afectar a genes esenciales del organismo modificado (Vogel y Ouagrham-Gormley, 2018). Uno de los riesgos del uso del empleo de sistemas CRISPR/Cas en organismos (microorganismos u organismos superiores) empleando un vector de transferencia (como un virus) es que durante un tiempo ilimitado el organismo estará produciendo los componentes necesarios para su funcionamiento (proteína y ARN), lo que provocara modificaciones recurrentes y continuadas en el ADN del organismo sin control (Ouagrham-Gormley y Fye-Marnien, 2019). Establecer medidas de control o emplear directamente la maquinaria necesaria, sintetizada *in vitro* y que se degradará al poco tiempo de haber cumplido su papel en el interior celular, son algunas de las alternativas seguras a la inserción de material genético en el organismo que codifique la maquinaria necesaria. Una opción más avanzada es la inducción y activación del sistema CRISPR/Cas mediante miARN (micro-ARN) inducibles, pequeñas moléculas de ARN que sirven como señales de encendido/apagado de diferentes rutas celulares que regulan la expresión génica. La combinación de estos dos elementos (CRISPR/Cas+miARN) permite la activación en un momento o tejido concreto, lo que puede ser útil en determinadas aplicaciones terapéuticas. Otra forma de control son los sistemas CIRCLE-seq (West y Gronvall, 2020).

Los *off-target effects* no son los únicos impedimentos, otros factores son también vitales para lograr la modificación deseada. En esencia, el sistema lo único que hace es producir un corte (de manera más o menos específica), y es la célula afectada, su maquinaria, la que debe encargarse de reparar ese corte según los dos mecanismos NHEJ/HDR. Los mecanismos de reparación del ADN tienden, de manera general, a empalmar los dos extremos cortados, debido a la formación de extremos romos adyacentes. Así, se ha demostrado a lo largo de los diferentes experimentos llevados a cabo que es más sencilla la interrupción de un gen, dando lugar a la desaparición de la función que cumple, que a la inserción de una nueva función. El tercer problema al que se debe hacer frente son los sistemas de transformación celular, esto es, introducir en el interior de la célula la infraestructura necesaria para la que se dé lugar la modificación deseada en el ADN. Todo tipo de vector (plásmidos, virus, ribonucleoproteínas, etc.) o técnica (electroporación, biolística, etc.) empleado en la transformación lleva asociados sus inconvenientes y retos que enfrenar (Ouagrham-Gormley y Fye-Marnien, 2019).

La versatilidad y aparente facilidad del empleo de la tecnología CRISPR/Cas ha hecho levantar las alarmas en diferentes sectores de la bioseguridad, ya que en el caso de que se pretenda una aplicación negativa, el daño causado puede ser enorme. Los sistemas CRISPR/Cas podrían emplearse para incrementar la virulencia de microorganismos patógenos, toxinas, la inserción de genes patógenos en microorganismos no-patógenos o el incremento de la supervivencia de vectores de enfermedades. No obstante, debemos considerar que una vez eliminados todos los contratiempos que el desarrollo de un organismo modificado genéticamente puede conllevar, todavía no se dispone de un agente biológico con una actividad letal potencial. Aún es necesario hacer que ese organismos sea capaz de producirse en elevadas cantidades (estrés metabólico por el aumento de actividad catalítica, falta de espacio intracelular, etc.) además de procesar, almacenar y distribuir la biomasa de manera adecuada (Vogel y Ouaghrham-Gormley, 2018).

5. Biología sintética

La biología sintética es la rama de la ciencia que aplica los principios de diseño racional para el desarrollo de nuevos sistemas biológicos, organismos o componentes de novo, y que contribuye, de manera directa, a la producción a través del desarrollo de materiales, tecnologías o procesos (Douglas y Savulescu, 2010).

El aumento exponencial del número de genomas completos secuenciados en las tres últimas décadas ha proporcionado a la biología sintética una plataforma virtual para el diseño y reconstrucción de los factores de virulencia necesarios para introducir los cambios necesarios en los patógenos deseados a través de la manipulación genética de los mismos o para ser empleados como referencia en el ensamblaje de genomas sintéticos completos. Los avances en este ámbito permiten, sintetizar genes implicados en la patogenicidad y colocarlos de manera consecutiva para la creación de genomas quiméricos e incluso completamente sintéticos. Estos virus y bacterias pueden crearse de manera artificial empleando fragmentos de genoma aislados de distintos ambientes, incluso extremos, cadáveres, muestras fecales o a partir de muestras de tejido de cuerpos mantenidos en el permafrost. Algunos hitos en el desarrollo histórico de la biología sintética ponen de manifiesto la capacidad de desarrollo de estos agentes bacterianos o

víricos sintéticos o quiméricos. Entre los logros más llamativos, encontramos (Sharma *et al.*, 2020):

- *Síntesis de bacteriófagos*: el primer bacteriófago artificial fue el ϕ X174, construido en 2003 con el fin de comprender la estructura y función de los genomas virales que infectan a bacterias de interés para la salud humana. Se sintetizó un genoma de 5.386 pares de bases (pb), uniendo los fragmentos de ADN sintético por ciclos de PCR. Posteriormente, en 2005, se rediseñó y sintetizó, el fago T7, con un tamaño total de 39.937 pb, con el fin de estudiar la importancia de las diferentes funciones génicas. Se eliminaron secuencias repetidas de su genoma y se reemplazó alrededor del 30 % de la dotación génica por construcciones sintéticas.
- *Síntesis de virus humanos*: entre 2002 y 2008 se han sintetizado *in vitro* diferentes virus que afectan a la salud humana. El primero fue el virus de la polio (2002) para determinar la funcionabilidad de los factores de patogenicidad. Para la síntesis del virus de la polio se empleó ADN como molde para obtener el material génico del virus (ssARN), que posteriormente se empaquetó *in vitro*. Aprovechando la síntesis del material genético se introdujeron diferentes modificaciones en el genoma para poder realizar los análisis de patogenicidad necesarios en células inmortalizadas (línea HeLa) y en ratones, mostrando una patogenicidad reducida respecto al silvestre. Después se sintetizó el virus de la gripe de 1918 (2005) empleando técnicas de PCR reversa después de empalmar su secuencia a partir de ocho fragmentos de ARN viral obtenidos de tejido humano preservado. Posteriormente, entre 2006 y 2008, se sintetizaron diferentes virus de ARN (de doble cadena), entre ellos: retrovirus endógenos, virus causantes de inmunodeficiencias (HIV y SIV) y virus similares a SARS. Este último virus, ha sido el virus sintético de mayor tamaño (30 kb) empleado para la infección *in vitro* de líneas celulares inmortalizadas después de haber introducido algunas modificaciones en el genoma del virus causante de enfermedades en murciélagos (Sharma *et al.*, 2020).
- *Síntesis de bacterias patógenas*: en 2008 se consiguió la síntesis *in vitro* de la bacteria *Mycoplasma genitalium* reduciendo el tamaño de su genoma al máximo posible (589.970 pb), eliminando los genes no esenciales para su supervivencia aprovechando el conocimiento previo. Este genoma se introdujo en células del género *Mycoplasma* a las que se les había eliminado

su dotación cromosómica original, resultando células absolutamente funcionales. En 2010 se consiguió la primera bacteria sintética con el genoma intacto, sin reducir. En este caso, se empleó *M. mycoides* cuyo genoma se obtuvo de manera sintética, dando lugar así a la primera bacteria totalmente sintética que además incluía en su propio genoma la información codificada de todos los investigadores involucrados en su creación y la frase del físico R. Feynman «No puedo comprender lo que no puedo crear» (Gronvall, 2019).

El punto clave en este tipo de trabajos es la introducción de toda la dotación génica en una infraestructura celular previa que sirva de factoría al nuevo genoma sintetizado. En el caso de las bacterias, hasta ahora, se ha conseguido eliminando la información génica presente en la célula receptora. En el caso de las partículas virales, la cápside es fundamental para la patogenicidad de las partículas virales sintetizadas, existiendo diferentes métodos para la generación de cápsides sintéticas (Sharma *et al.*, 2020).

En caso de que un actor malicioso pretenda usar la biología sintética para la obtención de agentes biológicos, algunos de los objetivos más ambiciosos de esta tendencia son la generación de patógenos a partir de bacterias ubicuas o virus no patógenos a través de la edición genómica de estos o incluso a través de la construcción de organismos sintéticos o quiméricos desde cero para dar lugar a agentes etiológicos concretos causantes de una determinada sintomatología en el organismo infectado (Sharma *et al.*, 2020). Además, estos agentes pueden ser diseñados para afectar a una línea celular concreta (somática o germinal) así como a una raza concreta originando el efecto deseado, como la destrucción de tejido por apoptosis, la proliferación celular descontrolada (cáncer) e incluso la supresión del sistema inmune.

Debemos tener en cuenta que el objetivo de la biología sintética cubre todo el espectro de (micro)organismos. El 80 % de los agentes con potencial bioterrorista son agentes zoonóticos, constituyendo una línea de interacción entre agricultura, medioambiente y salud humana muy fina (*one-health*) (Dixon, 2019). Por ejemplo, los virus zoonóticos, requieren de un reservorio natural en el que multiplicarse y desarrollarse sin causarle daño para dar lugar a enfermedad en su organismo diana. Así, estos virus pueden modificarse genéticamente para que empleen de manera preferencial el sistema de codones humano, lo que haría a este sensible al virus y que fuera rápidamente transmitido de un animal reservorio al humano. De la misma forma, ciertos

virus podrían modificarse para dar lugar a virus silenciosos cuya infección, en origen, no causaría síntomas visibles, infectando de manera críptica al organismo pero insertando oncogenes que de manera posterior, tras la exposición a un estímulo concreto, promueven el desarrollo tumoral del tejido (Sharma *et al.*, 2020).

La biología sintética implica también la síntesis de material genético con valor en sí mismo. El ADN es una poderosa herramienta multifunción, no requiere gran cantidad de energía para su conservación y es especialmente útil almacenando y copiando información. Traduciendo el código binario a un código alfabético de cuatro caracteres (A, T, G, C) se puede almacenar una gran cantidad de información digital en el ADN. Microsoft (Nuevo México, EE. UU.) ya ha desarrollado diferentes proyectos basados en esta tecnología. En el caso de que la información contenida en el ADN se transforme en un fichero ejecutable durante el proceso de caracterización puede emplearse para contener programas. Por tanto, se puede liberar un virus informático en el terminal empleado para la caracterización del ADN, que posteriormente podrá extenderse por todo el sistema informático. Algunos sectores, como las empresas tecnológicas de base genética (*genoma foundries*) (A Dixon *et al.*, 2020), ya emplean medidas de control en los sistemas de caracterización de ADN para protegerlos de ciberataques (Dixon, 2019).

El bioterrorismo es un hecho de baja probabilidad pero con un elevado número de consecuencias. El empleo de biología sintética reduce aún más la probabilidad. No obstante, la preocupación en este aspecto es universal y sin fronteras. Un ataque bioterrorista con un agente sintético tendría consecuencias en todo el mundo independientemente del lugar donde ocurra (Dixon, 2019). Como todas las nuevas tecnologías de aplicación en biología, es una tecnología de doble uso, no obstante, su uso para generar un agente biológico con fines terroristas es contenido por el grado de conocimiento que se requiere para comprender completamente las técnicas empleadas y por la dificultad de llevarlas a cabo en una infraestructura inadecuada. Existen diferentes presuposiciones en relación con la bioseguridad que acompañan a la biología sintética y que se deben analizar para determinar exactamente el potencial de esta tecnología:

- Generalmente se piensa que la biología sintética hace más fácil que los bioterroristas puedan aplicar los avances de la ciencia ya que existe una mayor cantidad de conocimiento disponible para toda la comunidad científica (Trump *et al.*, 2020). No obs-

tante, a pesar de que el conocimiento se encuentra depositado en bases de datos abiertas los investigadores aún se enfrentan a diferentes retos cuando abordan un experimento de este tipo. Transformar toda la información disponible en un ente tangible es harto complicado, aún se requiere de experiencia y cualificación para lograr estos objetivos (Jefferson *et al.*, 2014). A pesar de ello, en algunos casos, se opta por ocultar la información genética que acompaña a un determinado descubrimiento a pesar de que este se haga público, como ocurrió en el año 2013 cuando se describió una nueva toxina botulínica pero no se publicó su secuencia al no existir tratamiento (Dover *et al.*, 2014).

- El abaratamiento y fácil acceso a plataformas de síntesis química de ADN no hacen más accesible a los bioterroristas el uso de la biología sintética. Debemos diferenciar tres tipos de síntesis de ADN: síntesis de oligonucleótidos (tamaño inferior a 100 nucleótidos), síntesis de genes (tamaño entre 200 y 3.000 nucleótidos) y ensamblaje de síntesis *de novo* de grandes fragmentos para dar lugar a circuitos génicos y genomas completos. La generación de genomas presenta varios puntos problemáticos a los que hacer frente: las empresas especializadas en síntesis de ADN no pueden sintetizar *de novo* cualquier molécula de ADN, el ensamblaje de secuencias de entre 5 y 10 kb es dificultoso y la creación de un genoma completo sintético no es lo mismo que un genoma funcional (Jefferson *et al.*, 2014). No obstante, las propias empresas de síntesis poseen mecanismos internos de control, como el análisis de todas las secuencias solicitadas frente a las bases de datos en busca de rastros sospechosos. Por ejemplo, desde 2010, en EE. UU, se exige a las empresas de síntesis de ADN conocer los usuarios y analizar las secuencias encargadas por estos en busca de secuencias pertenecientes a patógenos concretos (Robiński y Simon, 2009; West y Gronvall, 2020).
- A pesar de la concepción de que la biología sintética puede ser usada para diseñar o incrementar la virulencia de microorganismos patógenos, el número de frentes es elevado. Es cierto que existen estudios sobre virus de la viruela de ratones y el virus H5N1, en los que se obtuvieron partículas virales con una mayor virulencia respecto a las originales, pero en esos casos, se aprovecharon mutaciones naturales en el genoma vírico para estudiar el aumento de transmisibilidad y patogenicidad. En muchas ocasiones los experimentos dirigidos en los que se

busca aumentar un determinado efecto de la especie de interés fracasan debido a los efectos pleiotrópicos (un gen afecta a más de una característica o función del organismo) y la falta de estabilidad de los organismos modificados (Jefferson *et al.*, 2014).

- Frecuentemente se considera que los bioterroristas pretenden obtener agentes biológicos con un número elevado de consecuencias en el caso de ataques en masa de la misma forma que generalmente el bioterrorismo se ha considerado como un peligro inminente y se ha hecho un gran énfasis en el elevado número de consecuencias que podría causar un ataque masivo casual. Este temor se apoya en que un grupo terrorista podría emplear con mayor facilidad un arma de destrucción masiva basada en un agente biológico que en tecnología nuclear. No obstante, los expertos consideran que un ataque masivo a gran escala es bastante menos probable que un pequeño ataque localizado y por un actor no estatal, de manera que ha ocurrido históricamente (uso de *Salmonella* en Oregón, EE. UU.; uso de toxina botulínica y ántrax en Japón; correo con ántrax en EE. UU.). La obtención de un arma biológica concreta no implica además una capacidad suficiente para la producción, mantenimiento y liberación de este agente (Douglas y Savulescu, 2010; Jefferson *et al.*, 2014).

De acuerdo con la Secretaría Estadounidense de Defensa NBQ, las mismas herramientas que nos preocupan de la biología sintética son las herramientas más útiles para desarrollar respuestas. Por ejemplo, en ocasiones las vacunas no son el método más eficaz para la prevención de enfermedades y debemos recurrir al desarrollo de tratamientos. Estas alternativas son diseñadas frente a un virus concreto e interrumpen su ciclo celular a nivel molecular mediante el uso de anticuerpos, proteínas específicas y oligonucleótidos. En este aspecto se han desarrollado toxinas químicas de naturaleza proteica para la protección frente al HIV-1 cuya diana es la envoltura del virus y que destruyen de manera específica las células infectadas por este; anticuerpos sintéticos para la protección frente a virus respiratorios sincitiales; u oligonucleótidos antisentido, pequeños oligonucleótidos sintéticos que inhiben la producción de proteínas víricas por bloqueo de la traducción del ARNm viral, que se han empleado frente a infecciones causadas por el virus de la gripe, hepatitis B y C y HIV. Destacar que además de tratamientos se han desarrollado partículas víricas para estudiar la patogenicidad y los mecanismos

de transmisión de diferentes filovirus como el ébola y marburgo empleando un lloviu virus no patógeno como receptor, además de partículas víricas quiméricas para incluir en vacunas, como en el caso del virus del Zika, Chikunguya o del oeste del Nilo (Sharma *et al.*, 2020).

Un punto fundamental para hacer frente a los riesgos planteados por la biología sintética es la creación de un grupo de expertos nacionales con capacidad suficiente de respuesta frente a los nuevos riesgos que puede generar la biología sintética (Dixon, 2019). La mayor parte de las normas y reglamentos internacionales en relación con agentes biológicos data del siglo XX, cuando aún no se habían desarrollado muchos de los protocolos biotecnológicos actuales. Este hecho invita a una actualización urgente de la regulación internacional en materia de biotecnología y control de agentes biológicos. Algunos puntos de control en el desarrollo de políticas que establezcan el nivel de biopeligrosidad de determinados agentes son los planteados por las academias nacionales de ciencias, ingeniería y medicina de EE. UU., que desarrollaron un marco conceptual para la evaluación de la amenaza, en el que identifican cuellos de botella o barreras que si son solventadas o eliminadas pueden generar un problema, además de poderse emplear como perspectivas de futuro en materia de bioseguridad. Para valorar el potencial que posee una determinada tecnología para acabar engendrando un riesgo en la bioseguridad, plantearon varios puntos de control a evaluar: facilidad de uso, tasa de desarrollo de esa tecnología, barreras para aplicar esta tecnología, sinergias que se pueden establecer entre esta y otras tecnologías, así como el coste final del uso de esta. Una vez evaluado el potencial de esta tecnología, para conocer el potencial que tiene esta tecnología para generar un arma biológica, plantean los siguiente puntos: alcance del posible empleo del agente biológico, predictibilidad del resultado de un ataque y protocolo necesario para testar la eficacia del agente (Gronvall, 2019). Estas academias recomiendan el seguimiento de proyectos específicos que contemplen aspectos como inactivar una determinada vacuna, conferir resistencia a antimicrobianos, incrementar la virulencia/transmisibilidad/rango de hospedadores de patógenos o transformar agentes no patógenos en patógenos, la evasión de los mecanismos de diagnóstico y detección de patógenos, estudios sobre la forma de diseminación y transformación en armamento de patógenos o toxinas además de los experimentos de ganancia de función (Lentzos, 2020).

6. Bioseguridad y ciencia colaborativa

El empleo de los diferentes avances tecnológicos para la obtención de microorganismos con una capacidad de virulencia incrementada, organismos con modificaciones para actuar como impulsores génicos u otro tipo de modificaciones génicas que puedan transmitirse, no solo verticalmente a la descendencia, si no horizontalmente a otros individuos, hacen patentes varios problemas de seguridad biológica. Estos problemas no surgen solo cuando se emplean organismos modificados genéticamente, si no también cuando se trabaja con agentes silvestres patógenos. Para el manejo de estos microorganismos generalmente se precisa de infraestructuras específicas, como laboratorios de alto nivel de contención (BSL-4). El número de laboratorios de este tipo se ha incrementado desde finales del siglo XX en países como China, India o Malasia, lo que hace plantearse ciertas cuestiones sobre los objetivos de esos países en materia de bioseguridad. Este incremento se ha visto acelerado por los diferentes picos epidémicos de enfermedades emergentes, pero también, por el empleo de ciertas herramientas de la biología sintética (Carter y Warner, 2018). El número de estas instalaciones puede emplearse como indicador del potencial defensivo de un determinado país para mantener/generar agentes biológicos que pudieran usarse con fines ofensivos/defensivos (Moodie *et al.*, 2008).

Cuando se desarrollan normativas por parte de las autoridades respecto a la contención biológica, estas deben contar con el asesoramiento de los científicos, ya que son estos los más familiarizados con los problemas y riesgos que conlleva el trabajo con ciertos grupos de microorganismos y la adecuación de las medidas de contención biológica, dando así lugar a un *autogobierno* científico (Zettler, Guerrini y Sherkow, 2019; West y Gronvall, 2020).

El control de las entidades públicas y privadas interesadas en el desarrollo de agentes con un posible potencial negativo es relativamente sencillo, basta con tomar las medidas de contención oportunas para evitar escapes que puedan generar una alarma. No obstante, algunas organizaciones y grupos de individuos quedan fuera de control al no encontrarse al amparo de ningún tipo de institución. El mayor riesgo en este aspecto lo generan las plataformas de ciencia abierta o colaborativa, denominadas originalmente *do it yourself* (DiY). Este tipo de iniciativas DiY se basan en diferentes grupos independientes de investigación formados

por científicos, entusiastas y voluntarios con un claro objetivo de aprender y experimentar para contribuir al desarrollo de la ciencia, la tecnología y la innovación (Sarpong *et al.*, 2020). En los últimos años, este tipo de plataformas han incrementado de manera exponencial su número debido a la facilidad para acceder a material de laboratorio económico a través de plataformas especializadas, los avances de la tecnología y la aparición de comunidades *on line* de apoyo (Sarpong *et al.*, 2020).

La falta de regulación y supervisión genera diferentes riesgos no solo para las propias personas involucradas, sino también para la salud humana general y el medioambiente. Estos riesgos pueden no ser inmediatos y pueden darse en el futuro ya que no existe un control ni de las personas involucradas ni de los proyectos desarrollados, además comparten gran cantidad de información, material (de laboratorio y biológico) y técnicas entre los diferentes grupos de trabajo (Sarpong *et al.*, 2020). Debemos considerar que el conocimiento es, en sí mismo, valioso. No debemos considerar solo el conocimiento adquirido durante un proceso de formación reglada, sino también el conocimiento adquirido a través del ensayo, de la prueba y error o del trabajo diario, el conocido *know-how* o conocimiento tácito (Douglas y Savulescu, 2010). Es este conocimiento el que genera el mayor riesgo por parte de estas comunidades. El incremento en número y variedad de grupos que pueden entrar en juego, unido al aumento de la capacidad y movilidad de estos son los principales factores que incrementan el riesgo ya que permiten el acceso al conocimiento tácito y la difusión descontrolada del mismo. La naturaleza global de la ciencia continúa dirigiendo la difusión del conocimiento a lo largo del mundo, incrementando los nudos de interconexión, tejiendo una red mucho más redundante.

Existen diferentes comunidades de ciencia ciudadana supervisadas por diferentes entidades académicas. Una de las iniciativas más conocidas es la de los *Biobricks*, surgida al amparo de la Universidad de Stanford y líder del proyecto *Free Genes*, con el que pretender hacer la información génica más accesible al público general a través de la síntesis de genes a cualquiera que lo desee, pero siempre quedándose ellos con una copia. Existen otros movimientos como *iGEM (International Genetically Engineered Machine)*, amparado por el MIT, que actúan, no como núcleos de trabajo en sí mismo, si no como núcleos de competición, en los que grupos amateur procedentes de todo el mundo, controlados mediante registro previo en la plataforma y

siguiendo una estricta normativa de trabajo y seguridad, compiten por conseguir la mejor aplicación biotecnológica. Otro tipo de plataformas, como *Genspace*, ofrecen la infraestructura básica de un laboratorio para un determinado proyecto, así como asesoría y formación (como los cursos *Biohacker Boot Camp* o *Biotech Crash Course* de *Genspace*). En la práctica, este tipo de plataformas también han dado lugar a *start-ups* o pequeños núcleos de emprendimiento empresarial, como *Open-trons* o *Foldit*. *Open-trons* se encarga del desarrollo de diferentes proyectos como: *BK Bioreactor* para describir y estudiar la microbiota presente en el canal Gowanus de Nueva York o el proyecto *Stranger Visions*, en el que, a partir del ADN presente en chicles o cigarrillos encontrados en la calle, se reconstruye el aspecto facial de esa persona. *Foldit* por el contrario es una plataforma libre, creada como consorcio entre Mars, Thermo Fisher Scientific y diferentes entidades académicas, con el objetivo de que cualquiera pueda participar en la determinación de la forma óptima de plegamiento de diferentes proteínas, dando lugar a diferentes conformaciones estructurales para la misma enzima (Gruber, 2019).

No obstante, existen ciertas organizaciones o personas que trabajan al margen de estas plataformas que reciben el apoyo institucional. Estas plataformas han dado lugar a casos llamativos, como el de un aficionado que se aplicó a él mismo su propio tratamiento para la intolerancia a la lactosa mientras lo retransmitía en directo. En otras ocasiones, algunos de estos *biohackers*, han pretendido desarrollar tratamientos, sin éxito, para el herpes, el HIV o para incrementar su masa muscular (Gruber, 2019). Estos casos podrían generar diferentes problemas si las comunidades en las que se desarrollan promocionan este tipo de tratamientos o existen personas que pretenden emular estos trabajos.

A pesar de que debemos considerar las comunidades DiY más que como un riesgo, como una oportunidad para el avance científico y el aprovechamiento del potencial de todas las personas involucradas en ellas, se debe incrementar la vigilancia para evitar que el conocimiento compartido en estas plataformas pueda caer en malas manos, vigilar los proyectos de síntesis de ADN, así como la adquisición de aparatos y kits para la edición génica mediante las nuevas tecnologías disponibles (Gronvall, 2019; Gruber, 2019; Sarpong *et al.*, 2020; West y Gronvall, 2020). En este aspecto, los servicios de inteligencia de los países deben encontrar oportunidades para el aprendizaje continuo, incrementando y favoreciendo la colaboración, innovación e implantación

de nuevas herramientas analíticas. En Reino Unido, el jefe del MI6 se refirió al daño que puede causar el *pensamiento de grupo* y la necesidad de estimular el punto de vista contrario mediante el alineamiento del conocimiento y evidencia científica de la academia con el desarrollo de políticas, normativas y toma de decisiones adaptadas a la sociedad actual (Lentzos, 2020).

7. Bibliografía

- Ainscough, M. J. (2002). Next generation bioweapons: The technology of genetic engineering applied to biowarfare and bioterrorism. AIR UNIV MAXWELL AFB AL.
- Carter, S. R. y Warner, C.M. (2018). Trends in synthetic biology applications, tools, industry, and oversight and their security implications. *Health Secur.* 16, pp. 320–333. <https://doi.org/10.1089/hs.2018.0067>
- Creager, A. N. H. (2020). Recipes for recombining DNA: A history of Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *BJHS Themes.* 5, pp. 225–243. <https://doi.org/10.1017/bjt.2020.5>
- Dixon, T. (2019). Mapping the potential impact of synthetic biology on Australian foreign policy. *Australian Journal of International Affairs.* 73, pp. 270–288. <https://doi.org/10.1080/10357718.2019.1584154>
- Dixon, T.; Curach, N. y Pretorius, I. (2020). Bio-informational futures. *EMBO Rep* 21. <https://doi.org/10.15252/embr.202050036>
- Douglas, T. y Savulescu, J. (2010). Synthetic biology and the ethics of knowledge. *J Med Ethics.* 36, pp. 687–693. <https://doi.org/10.1136/jme.2010.038232>
- Dover, N., et al. (2014). Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *The Journal of infectious diseases.* 209(2), 192-202.
- Gauthier, J., et al. (2019). A brief history of bioinformatics. *Brief Bioinform.* 20, pp. 1981–1996. <https://doi.org/10.1093/bib/bby063>
- Gronvall, G. K. (2019). Synthetic Biology: Biosecurity and Biosafety Implications. Defense Against Biological Attacks. Pp. 225–232. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03053-7_11
- Gruber, K. (2019). Biohackers. *EMBO Rep* 20. <https://doi.org/10.15252/embr.201948397>

- Jefferson, C.; Lentzos, F. y Marris, C. (2014). Synthetic biology and biosecurity: Challenging the «myths». *Front Public Health*. 2, p. 115. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00115/xml/nlm>
- Kumar, A.; Flora, S. J. S. (2020). Genome information of BW agents and their application in biodefence. *Handbook on Biological Warfare Preparedness*. Pp. 257–271. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812026-2.00013-x>
- Leitenberg, M.; Zilinskas, R. A. y Kuhn, J. H. (2012). The Soviet biological weapons program. En: *The Soviet Biological Weapons Program*. Harvard University Press.
- Lentzos, F. (2020). How to protect the world from ultra-targeted biological weapons. *Bulletin of the Atomic Scientists*. 76, pp. 302–308. <https://doi.org/10.1080/00963402.2020.1846412>
- Lentzos, F.; Goodman, M. y National, J. W.-I. (2020). Health security intelligence: engaging across disciplines and sectors. *Taylor & Francis*. 35, pp. 465–476. <https://doi.org/10.1080/02684527.2020.1750166>
- Minogue, T. D. et al. (2019). Next-Generation Sequencing for Biodefense: Biothreat Detection, Forensics, and the Clinic. *Clin Chem*. 65, pp. 383–392. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.266536>
- Moodie, M., et al. (2008). *Good Bugs, Bad Bugs: A Modern Approach for Detecting Offensive Biological Weapons Research*.
- Ouagrham-Gormley, S. B. y Fye-Marnien, S. R. (2019). Is CRISPR a Security Threat? *Defense Against Biological Attacks*. Pp. 233–251. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03053-7_12
- Robiński, J. y Simon, J. (2009). Synthetic biology and biosecurity. From low levels of awareness to a comprehensive strategy. *EMBO Rep* 10, S23. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.119>
- Sarpong, D., et al. (2020). Do-it-yourself (DiY) science: The proliferation, relevance and concerns. *Technol Forecast Soc Change*. 158, p. 120127. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2020.120127>
- Sharma, A., et al. (2020). Next generation agents (synthetic agents): Emerging threats and challenges in detection, protection, and decontamination. *Handbook on Biological Warfare Preparedness*. Pp. 217–256. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812026-2.00012-8>

- Tröder, S. E. y Zevnik, B. (2022). History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. *Lab Anim.* 56, pp. 60–68. <https://doi.org/10.1177/0023677221994613>
- Trump, B. D., et al. (2020). Building biosecurity for synthetic biology. *Mol Syst Biol.* 16. <https://doi.org/10.15252/msb.20209723>
- Valdivia-Granda, W. A. (2010). Bioinformatics for biodefense: Challenges and opportunities. *Biosecurity and Bioterrorism.* 8, pp. 69–77. <https://doi.org/10.1089/bsp.2009.0024>
- Vogel, K. M. y Ouagrham-Gormley, S. B. (2018). Anticipating emerging biotechnology threats: A case study of CRISPR. *Politics and the Life Sciences.* 37, pp. 203–219. <https://doi.org/10.1017/pls.2018.21>
- Vuong, P., et al. (2022). Small investments with big returns: environmental genomic bioprospecting of microbial life. *Crit Rev Microbiol.* <https://doi.org/10.1080/1040841x.2021.2011833>
- West, R. y Gronvall, G. K. (2020). California shows the way for biosecurity in commercial gene synthesis. *Nature Biotechnology.* 2020 38:9 38, pp. 1021–1021. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0667-0>
- West, R. y Gronvall, G. K. (2020). CRISPR Cautions: Biosecurity Implications of Gene Editing. *Perspect Biol Med.* 63, pp. 73–92. <https://doi.org/10.1353/pbm.2020.0006>
- Zettler, P. J.; Guerrini, C. J. y Sherkow, J. S. (2019). Regulating genetic biohacking. *Science* (1979) 364, pp. 34–36. <https://doi.org/10.1126/science.aax3248>