



CRISPR-CAS9. EL MAYOR AVANCE EN TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÉTICA REQUIERE UNA REFLEXIÓN ÉTICA

CRISPR-CAS9. THE GREATEST ADVANCEMENT IN GENETIC EDITION TECHNIQUES REQUIRES AN ETHICAL REFLECTION

LUCÍA GÓMEZ-TATAY^{1, 2, 3}, JUSTO AZNAR¹

¹Instituto de Ciencias de la Vida. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. ²Grupo de Medicina Molecular y Mitocondrial, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. ³Escuela de Doctorado, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

Autor correspondiente: Justo Aznar

Observatorio de Bioética. Instituto de Ciencias de la Vida
Universidad Católica de Valencia

C/ Guillem de Castro 94

Email: justo.aznar@ucv.es

RESUMEN:

Palabras clave:

CRISPR, edición genética, ética, bioética

Recibido: 17/05/2018

Aceptado: 01/12/2018

La adaptación del sistema CRISPR como herramienta de edición genética ha supuesto una revolución en numerosos campos de aplicación, pues esta técnica resulta considerablemente más rápida, fácil de realizar y eficaz que las técnicas predecesoras. Sin embargo, algunas de estas aplicaciones suscitan objetivas cuestiones éticas que deben ser abordadas. En este trabajo discutimos, en base a los datos más recientes, las distintas cuestiones relacionadas con las aplicaciones de CRISPR sobre la línea germinal, su introducción en ensayos clínicos, la edición genética de animales y plantas para consumo humano y el novedoso gene drive.

ABSTRACT:

Keywords:

CRISPR, gene editing, ethics, bioethics.

The adaptation of the CRISPR system as a genetic editing tool has led to a revolution in many fields of application, as this technique is considerably faster, easier to perform and more efficient than predecessor techniques. However, some of these applications raise objective ethical issues that must be addressed. In this paper we discuss, based on the most recent data, the different issues related to CRISPR applications on the germ line, its introduction in clinical trials, the genetic edition of animals and plants for human consumption and the novel gene drive.

1. Introducción

La herramienta de edición genética CRISPR (por sus siglas en inglés: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) se considera el mayor avance en biología molecular desde el desarrollo de la PCR (por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*)¹. La importancia de esta técnica radica en la multitud de prometedoras aplicaciones en que puede derivar, que no se limitan solo al ámbito de la medicina, donde además de corregir genes alterados, puede utilizarse con otros fines, sino que puede aplicarse también en agricultura, ganadería, cuidado del medio ambiente y otras aplicaciones más peculiares, como la producción de mascotas a la carta. Pero CRISPR suscita importantes interrogantes éticos que vamos a tratar de evaluar en este artículo.

2. ¿Qué es CRISPR?

2.1. Aspectos técnicos

En primer lugar, es necesario mencionar que esta herramienta procede de un mecanismo natural de inmunidad adaptativa que se encuentra en aproximadamente el 50% de las bacterias y el 90% de las arqueas². El sistema funciona de tal manera que los fragmentos de ADN viral que se transfieren a las bacterias y arqueas quedan insertados en su genoma en el primer contacto de éstas con el patógeno, de forma que en un posible contacto posterior el microorganismo reconoce el ADN invasor y lo ataca.

Este sistema cuenta con un locus genómico llamado CRISPR *array*, flanqueado por los llamados genes *cas* (por *CRISPR-associated*), que codifican las proteínas *Cas*, necesarias para el funcionamiento del sistema. El CRISPR *array* contiene una primera secuencia "líder", rica en adenina y timina, seguida por una serie de repeticiones de 20 a 50 pares de bases (pb) separadas por espaciadores de longitud similar. Estos espaciadores se derivan de genomas virales y plásmidos conjugativos, constituyendo un registro de la infección que permite al huésped

reconocer el ADN invasor en un posterior contacto y atacarlo. El sistema CRISPR actúa en tres etapas³. La primera es la adaptación o adquisición de espaciadores. La infección por un nuevo fago conduce a la expansión del CRISPR *array* mediante la adición de nuevos espaciadores originarios del genoma de ese fago. Para permitir la discriminación entre la secuencia incorporada en el propio genoma y la misma secuencia en el genoma invasor, las secuencias objetivo (*protospacers*) se seleccionan sobre la base de un motivo de flanqueo, el PAM (por sus siglas en inglés: *protospacer-adjacent motif*), que no se copia en el locus CRISPR. En segundo lugar se produce la biogénesis del ARN CRISPR (crRNA). Si posteriormente el mismo fago ataca a la bacteria o arquea, el CRISPR *array* se transcribe, dando lugar primero a un pre-crRNA y seguidamente a los crRNA maduros, cada uno de los cuales contiene un único espaciador. En la última etapa, la interferencia, un complejo efector utiliza el crRNA para unirse por complementariedad al genoma del fago o plásmido invasor y destruirlo. La escisión del ADN objetivo solo se produce cuando la secuencia PAM está presente en el extremo 3'. Cuando hay complementariedad de pares de bases pero no secuencia PAM, significa que se trata del locus CRISPR, y la secuencia no se degrada⁴.

Los sistemas CRISPR-Cas presentan una rápida evolución y una gran variabilidad, lo que dificulta su clasificación. Actualmente estos sistemas se agrupan en dos clases distintas que se dividen en 3 tipos cada una; los tipos I, III y IV en la Clase 1 y los tipos II, V y VI, en la Clase 2, los cuales agrupan diferentes subtipos cada uno. Esta clasificación se deriva de un enfoque múltiple que tiene en cuenta diversos criterios: los genes *cas* "de firma", que son específicos para tipos individuales y subtipos de CRISPR-Cas, similitud de secuencia entre múltiples proteínas *Cas* compartidas, la filogenia de *Cas1* (la proteína *Cas* mejor conservada), la organización del gen en los loci CRISPR-*cas* y la estructura de los propios CRISPR⁵.

1 Navarro A. [Publicación en línea] «CRISPR». 2018. <<http://medicablogs.diariomedico.com/laboratorio/2018/01/23/crispr/>> [Consulta 27/04/2018]

2 Makarova, KS et al. «An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems». *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13(11): 722–736.

3 Wright, AV, Nuñez, JK, Doudna, JA. «Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering». *Cell*. 2016; 164(1-2): 29-44.

4 Marraffini, LA, Sontheimer, EJ. «Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity». *Nature*. 2010; 463(7280): 568–571.

5 Koonin, EV, Makarova, KS, Zhang, F. «Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems». *Current Opinion in Microbi-*

2.2. Aspectos históricos

El primer antecedente del sistema de edición genética CRISPR se remonta a 1987, cuando se publicó el primer artículo que mencionaba la existencia de secuencias repetidas en el genoma bacteriano, en concreto en *Escherchia coli*⁶. Inicialmente se consideró que estas secuencias carecían de función alguna.

Posteriormente, en el año 1993, el investigador español Francisco Martínez Mojica, describió secuencias de estructura similar en las arqueas *Haloferax mediterranei*⁷, que habitan exclusivamente en las salinas de Santa Pola, y en el año 1995 publicó otro artículo reportando su presencia también en *Haloferax volcanii*⁸. En este segundo artículo se describían dichas secuencias como fragmentos de 30 pb con simetría de díadas que se repetían en tándem, intercaladas con secuencias únicas de 33-39 pb y se las denominaba TREPs (por *tándem repeats*). Posteriormente pasaron a denominarse "repeticiones cortas regularmente espaciadas" (SRSRs por sus siglas en inglés: *short regularly spaced repeats*) y en el año 2000 Mojica ya había encontrado estas secuencias en 20 microorganismos diferentes⁹. Dos años más tarde, Ruud Jansen identificó unos genes que estaban asociados a estas secuencias, los genes *cas*, y, de común acuerdo con Mojica, decidieron utilizar en adelante el nombre que actualmente conocemos: CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas con regularidad)¹⁰. Fue en 2005 cuando tres laboratorios independientes, entre ellos el de Mojica, dilucidaron la función biológica del sistema CRISPR, al identificar similitudes entre los espaciadores asociados a CRISPR y el geno-

ma de ciertos virus que afectan a bacterias, deduciendo así que CRISPR podría ser un sistema de defensa frente a virus^{11, 12, 13}. Estos descubrimientos sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica de edición genética

3. CRISPR como herramienta de edición genética

Tras el descubrimiento de 2005, se sucedieron toda una serie de investigaciones que fueron esclareciendo y ratificando la función y el modo de acción de este sistema defensivo natural¹⁴. Finalmente, en el año 2012, Doudna y Charpentier utilizaron el sistema CRISPR para cortar ADN de forma dirigida in vitro y demostraron que los dos ARNs necesarios para la función de *cas9* (crRNA y tracrRNA) podían unirse en un único ARN guía (sgRNA)¹⁵. Su artículo fue el primero en el que se reconocía el potencial de CRISPR para ser utilizado en edición genética.

Posteriormente, ese mismo año, Feng Zhang, del "Broad Institute of Cambridge", Massachusetts, logró realizar el primer corte utilizando CRISPR/Cas9 sobre el genoma de una célula viva de mamífero¹⁶.

Así, el sistema natural CRISPR puede adaptarse con el objetivo de utilizarlo de forma dirigida para la edición genética de distintos organismos, incluido el ser humano. Además, la técnica es considerablemente más barata y fácil de usar que sus predecesoras, por lo que ha despertado un enorme interés entre los científicos y laboratorios de todo el mundo, iniciándose un gran número de proyectos de investigación con esta herramienta, lo que se refleja en el incremento exponencial de publicaciones sobre CRISPR en los últimos años (figura 1).

ology. 2017; 37: 67-78.

6 Ishino, Y et al. «Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product». *Journal of Bacteriology*. 1987; 169(12): 5429-5433.

7 Mojica, FJ, Juez, G, Rodríguez-Valera, F. «Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites». *Molecular Microbiology*. 1993; 9(3): 613-621.

8 Mojica, FJ et al. «Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning». *Molecular Microbiology*. 1995; 17(1): 85-93.

9 Mojica FJ, et al. «Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria». *Molecular Microbiology*. 2000; 36(1): 244-246.

10 Jansen, R et al. «Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes». *Molecular Microbiology*. 2002; 43(6): 1565-1575.

11 Mojica FJ et al. «Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements». *Journal of Molecular Evolution*. 2005; 60(2): p. 174-182.

12 Pourcel, C, Salvignol, G, Vergnaud, G. «CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies». *Microbiology*. 2005; 151(Pt 3): 653-663.

13 Bolotin, A et al. «Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin». *Microbiology*. 2005; 151(Pt 8): 2551-2561.

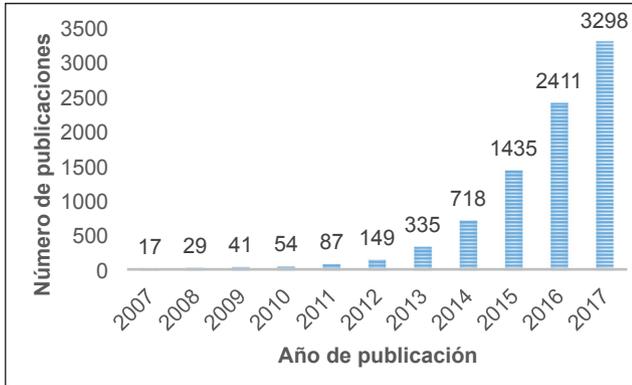
14 Lander, ES. «The Heroes of CRISPR». *Cell*. 2016; 164(1-2): 18-28.

15 Jinek, M et al. «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science*. 2012; 337(6096): 816-821.

16 Cong, L et al. «Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems». *Science*. 2013; 339(6121): 819-823.

Figura 1.

Distribución histórica de documentos sobre CRISPR disponibles en Pubmed. Fuente: elaboración propia.



En líneas generales, la técnica consiste en utilizar una secuencia de ARN guía, que por complementariedad de bases transporta a la enzima Cas (normalmente Cas9) a la secuencia de ADN que se pretende modificar. La enzima entonces produce un corte en la doble hebra de ADN y éste es reparado por uno de los dos mecanismos de reparación celulares: el mecanismo de unión de extremos no homólogos NHEJ (por sus siglas en inglés: *nonhomologous end-joining*); o el mecanismo de reparación dirigida por homología HDR (por sus siglas en inglés: *homology-directed repair*). En el primer caso, la reparación ocurre mediante la adición o eliminación aleatoria de nucleótidos, mientras que en la HDR el ADN se repara replicando una secuencia modelo. La utilidad de la reparación por vía NHEJ en edición genética se limita pues a la eliminación de algún gen o grupo de genes perjudiciales, mientras que la técnica HDR puede ser usada para la corrección de secuencias, esto es, la edición propiamente dicha. Así, el NHEJ no resulta de tanta utilidad a los efectos de la edición genética, ya que solo permite la construcción eficiente de alelos *knock-out*. Por ello, las estrategias se centran en el mecanismo HDR, que permite la inserción de la secuencia deseada en el genoma al añadir una secuencia modelo junto al ARN guía y la proteína Cas.

Sin embargo, la técnica ha sido adaptada para funcionar de distintos modos, de manera que su acción se

dirija a modificar una sola letra del ADN, cambiando la existente por otra^{17, 18}; a editar el ARN en lugar del ADN¹⁹ o modular la transcripción²⁰, activándola o reprimiéndola, lo que supone una ventaja en términos de seguridad, al no modificarse la secuencia genética; o simplemente a detectar secuencias para diagnosticar distintas enfermedades^{21, 22}.

Apenas se está empezando a vislumbrar el amplio abanico de posibilidades que ofrece esta nueva herramienta biotecnológica, además de las que tiene en terapia génica.

Para la investigación en biología, el poder modificar de esta manera el ADN va a permitir desentrañar la función de genes específicos y revelar cómo se organiza y utiliza el material genético dentro de la célula.

Por otro lado, la nucleasa Cas9 ha permitido la modificación eficiente y específica del genoma en muchas especies, lo que no se había conseguido hasta ahora utilizando técnicas tradicionales de manipulación genética. Ello ha permitido la generación rápida de modelos transgénicos, ampliando así la investigación biológica más allá de los organismos modelo tradicionales. Por ejemplo, al pasar por alto la etapa típica de manipulación de células madre embrionarias en la generación de líneas transgénicas, el tiempo de generación para ratones mutantes y ratas puede reducirse de más de un año a solo varias semanas²³. Pero las aplicaciones que más nos interesan aquí, por los interrogantes éticos que plantean, son las médicas y biotecnológicas.

17 Shevidi, S et al. «Single nucleotide editing without DNA cleavage using CRISPR/Cas9-deaminase in the sea urchin embryo». *Developmental Dynamics*. 2017; 246(12): 1036-1046.

18 Gaudelli, NM et al. «Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage». *Nature*. 2017; 551(7681): 464-471.

19 Cox, DBT et al. «RNA editing with CRISPR-Cas13». *Science*. 2017; 358(6366): 1019-1027.

20 Liao, HK et al. «In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation». *Cell*. 2017; 171(7): 1495-1507.

21 Chen, JS et al. «CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity». *Science*. 2018; pii: eaar6245.

22 Gootenberg, JS et al. «Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6». *Science*. 2018; pii: eaaq0179.

23 Hsu PD, Lander ES, Zhang F. «Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering». *Cell*. 2014; 157(6): 1262-1278.

4. Cuestiones éticas en distintas aplicaciones de CRISPR

4.1. Edición genética de la línea germinal

Entre las aplicaciones clínicas, sin duda la más controvertida es la posibilidad sin precedentes de editar la línea germinal humana, es decir, modificar el genoma de gametos y embriones. Los riesgos de estas modificaciones son impredecibles, lo que se agrava por el hecho de que los cambios serán transmisibles de generación en generación. Además, con ello se abre la puerta a la posibilidad de expandir el uso de CRISPR sobre la línea germinal, no solo para evitar la transmisión de enfermedades hereditarias, sino también para mejorar nuestras capacidades (transhumanismo y posthumanismo) o seleccionar los rasgos del futuro bebé (niños de diseño).

En cuanto a los riesgos de seguridad, los científicos son conscientes de los problemas del sistema, por lo que en su día se pidió una prohibición autoimpuesta de estos usos^{24, 25}. No obstante, en poco tiempo la tendencia ha cambiado, tendiendo a rechazar por el momento la edición genética germinal con vistas a desarrollar un embarazo, pero promoviendo su uso en investigaciones biomédicas, tanto sobre gametos como sobre embriones humanos. Así lo reflejan los recientes informes de consenso emitidos por distintos organismos internacionales.

En una importante cumbre internacional convocada por la Academia Nacional de Ciencias y la Academia Nacional de Medicina de los Estados Unidos, en diciembre de 2015, se debatieron estos temas y, a partir de las conclusiones allí alcanzadas, se elaboró un informe que fue publicado en junio de 2017²⁶. En él se constata esta opinión, y se declara que en un futuro la aplicación clínica de la edición genética germinal sí podría llegar a ser una opción realista. Posteriormente, en agosto de 2017, once organizaciones liderados por la Sociedad Americana

de Genética Humana (ASHG) publicaban un informe²⁷ en el que no se cierra la puerta a un posible uso futuro de la terapia génica germinal, pero se señala que a día de hoy las cuestiones éticas, científicas y políticas no resueltas hacen inapropiada la edición genética en embriones para posteriormente implantarlos. Sin embargo, sí aprueba, y de hecho recomienda estas experiencias con fines de investigación para favorecer una posible aplicación clínica en el futuro. Así mismo, el Hinxtion Group, un consorcio internacional de científicos, bioéticos y expertos en política, pidió la continuación de la investigación en embriones pero la no realización de cualquier aplicación reproductiva²⁸.

La misma tendencia se observa en Europa, donde se realizó, en marzo de 2016, una reunión en la que participaron representantes de más de 20 países europeos para reflexionar y fomentar la investigación responsable con CRISPR-Cas. Fruto de esta reunión, en julio de 2017 se publicó un documento de consenso en el que se reflejaba también esta visión²⁹ (28). Así mismo, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG) han manifestado que “tanto la investigación básica como la preclínica sobre edición genética de la línea germinal pueden estar justificadas, con condiciones. Además, aunque la edición genética clínica de la línea germinal sería totalmente prematura, podría convertirse en una intervención responsable en el futuro”³⁰. También el *Nuffield Council on Bioethics* ha publicado un importante informe a este respecto, en el que recomienda “que la investigación para establecer la seguridad clínica y la viabilidad de la edición del genoma se apoye en el interés público para informar el desarrollo de estándares basados en evidencia para el uso clínico”³¹. De manera

24 Baltimore, D et al. «A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification». *Science*. 2015; 348(6230): 36–38.

25 Lanhier, E et al. «Don't edit the human germline». *Nature*. 2015; 519(7544): 410–411.

26 National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. [Publicación en línea] «Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance». Washington, DC: The National Academies Press. 2017. <<https://doi.org/10.17226/24623>>.

27 Ormond, KE et al. «Human Germline Genome Editing». *The American Journal of Human Genetics*. 2017; 101(2): 167-176.

28 Chan, S et al. «Genome editing technologies and human germline genetic modification: The Hinxtion Group consensus statement». *The American Journal of Bioethics*. 2015; 15(12): 42–47.

29 Chneiweiss, H et al. «Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective». *Transgenic Research*. 2017; 26(5): 709–713.

30 de Wert, G et al. «Human germline gene editing: Recommendations of ESHG and ESHRE». *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26(4): 445-449

31 Nuffield Council on Bioethics. [Publicación en línea] «Genome editing and human reproduction: social and ethical issues».

similar, el *Public and Professional Policy Committee of the European Society of Human Genetics* recomienda “llevar a cabo una cuidadosa investigación científica para construir una base de evidencia”³².

Esta postura “trata de impedir la realización de investigaciones que produzcan efectos indeseados graves y, con ellos, una alarma social que bloquee durante mucho tiempo las investigaciones en un campo extraordinariamente prometedor. Ni los científicos, ni los Estados, ni las organizaciones internacionales pretenden construir cortafuegos que impidan la creación de seres humanos genéticamente modificados en el futuro. Más bien han establecido “controles de aduana” para que, en la medida de lo posible, el territorio de la investigación sea transitado por grupos responsables, en el sentido de que no pongan en riesgo la confianza del público en esas investigaciones”³³.

En lo que a nuestro conocimiento alcanza, ya se han publicado, al menos, 10 artículos en los que se usa CRISPR sobre la línea germinal humana^{34,35,36,37,38,39,40,41,42,43}. Los

2018, 136. <<http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Genome-editing-and-human-reproduction-FINAL-website.pdf>> [Consulta: 16/10/2018]

32 Howard, HC et al. «One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans». *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26(1):1-11.

33 Bellver Capella, V. «La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta». *Cuadernos de Bioética*. 2016; 27(90): 223-239.

34 Liang, P et al. «CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes». *Protein Cell*. 2015; 6(5): 363-372.

35 Kang, X et al. «Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016; 33(5): 581-588.

36 Vassena, R et al. «Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells». *Human Reproduction Update*. 2016; 22(4): 411-419.

37 Tang, L et al. «CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein». *Molecular Genetics and Genomics*. 2017; 292(3): 525-533.

38 Ma, H et al. «Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos». *Nature*. 2017; 548(7668): 413-419.

39 Fogarty, NME et al. «Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis». *Nature*. 2017; 550(7674): 67-73.

40 Li, G et al. «Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos». *Protein Cell*. 2017; 8(10): 776-779.

41 Zhou, C et al. «Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes». *Protein Cell*. 2017; 8(10): 772-775.

42 Liang, P et al. «Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos». *Protein Cell*. 2017; 8(11): 811-822.

43 Tang, L et al. «Highly efficient ssODN-mediated homology-directed repair of DSBs generated by CRISPR/Cas9 in human 3PN zygotes». *Molecular Reproduction & Development*. 2018; doi: 10.1002/mrd.22983.

primeros estudios se realizaron en China y sobre embriones no viables sobrantes de tratamientos de fecundación *in vitro*, lo que garantizaba que no podrían utilizarse para promover un embarazo. Sin embargo, muy pronto pasaron a utilizarse embriones viables y ya se han realizado este tipo de experiencias también en Inglaterra, Estados Unidos y Suecia⁴⁴. Como dato llamativo, en uno de los trabajos los embriones eran producidos mediante clonación, expresamente para utilizarlos en la investigación⁴⁵, lo que tiene implicaciones éticas adicionales, tanto por el hecho de producir seres humanos con el objetivo de investigar con ellos, como por el hecho mismo de la clonación humana.

En el debate bioético al respecto, la seguridad para el niño resultante y las futuras generaciones es la cuestión más debatida, ya que los riesgos para el futuro individuo son objetivos, lo que se ve agravado por el hecho de que los cambios genéticos serán heredables, de manera que se transmitirán de generación en generación. Por este motivo se debate sobre si la edición genética germinal podrá llegar a ser una opción aceptable algún día, aunque, como se ha mencionado, la tendencia es a pensar que los problemas de seguridad podrán subsanarse. A nuestro juicio, si en un futuro el balance riesgo-beneficio llegará a ser favorable hoy por hoy solo puede conjeturarse. Lo cierto es que actualmente no lo es, razón por la que todos los informes mencionados rechazan la posibilidad de implantar en una mujer los embriones modificados genéticamente para su desarrollo.

En relación con esto, serán las investigaciones que ya se están llevando a cabo las que aporten los datos de probabilidades al respecto. Pero al margen de la seguridad hay otras consideraciones a tener en cuenta. La primera de ellas es la gran cantidad de embriones humanos que se eliminan en estas experimentaciones, pues antes de llegar a perfilar la técnica hay que pasar por años de investigación con embriones humanos que son destruidos. Si se considera toda vida humana igual en dignidad esto es éticamente inaceptable.

44 Callaway E. «Gene-editing research in human embryos gains momentum». *Nature*. 2016; 532(7599): 289-290.

45 Liang et al (b), *op. cit.*

Otro aspecto a considerar es el hecho de que el embrión no pueda dar su consentimiento informado. A este respecto, basándonos en la práctica clínica actual, si el balance riesgo beneficio llegase a ser indudablemente favorable no parece que este argumento tenga mucho peso, pues también los padres o jueces deciden por los niños en otros tratamientos. No obstante, el hecho de intervenir sobre el genoma supone una práctica cualitativamente diferente, por lo que es necesaria una protección especial de los individuos que eventualmente se tratarían. A este respecto cabe mencionar la necesidad de un monitoreo intergeneracional, para realizar el seguimiento de las generaciones posteriores, lo que plantea inconvenientes éticos adicionales⁴⁶.

Otro interrogante es si esto puede llevar a una sociedad menos inclusiva y a situaciones de discriminación. "En primer lugar, existe el riesgo de que ciertas fuerzas sociales, económicas y políticas influyan en los que se consideran "no aptos" en un esfuerzo por presionarlos para que cambien su genética de manera que se ajusten mejor a ciertas normas o expectativas externas. En segundo lugar, existe el riesgo de que aquellos que se resistan a la presión para conformarse experimenten (más) opresión"⁴⁷. No solo la autonomía individual se vería vulnerada en este caso, sino que el uso de la edición genética con fines eugenésicos supondría también un desafío insalvable en la búsqueda de la equidad, ya que ya que podrían llegar establecerse dos grupos diferentes dentro de nuestra especie: los seres humanos imperfectos y los "mejorados" 48. Ciertamente son situaciones que podrían llegar a suceder, y es algo que debería preverse si algún día la edición genética germinal llega a la clínica, para anticiparse a estos escenarios y establecer las medidas adecuadas para evitarlas de antemano.

Por último, además de reparar las mutaciones subyacentes a los trastornos hereditarios, la edición del

genoma podría llegar a utilizarse para mejorar nuestras capacidades físicas y mentales, por ejemplo para adaptarnos al cambio climático⁴⁹. Aunque hoy por hoy esta es una posibilidad ampliamente rechazada⁵⁰, existe una creciente corriente de pensamiento que defiende esta posibilidad no solo como aceptable, sino que afirma que, cuando la técnica sea segura, existiría la obligación moral de dotar a las futuras generaciones de las mejores capacidades posibles^{51,52}. A nuestro juicio, esto agrava de tal manera todas las cuestiones anteriores que no es posible calificarlo como éticamente aceptable y mucho menos si se propone de forma obligatoria.

4.2. Edición genética somática

En cuanto a la edición genética somática, CRISPR ya se ha utilizado con un éxito considerable en diversos modelos animales y celulares de múltiples enfermedades, como el cáncer⁵³, el SIDA⁵⁴, la distrofia muscular de Duchenne⁵⁵, la epidermólisis bullosa⁵⁶, la inmunodeficiencia combinada severa⁵⁷, el glaucoma⁵⁸, o el síndrome X frágil⁵⁹.

49 Lehmann, LS. «Is Editing the Genome for Climate Change Adaptation Ethically Justifiable?». *AMA Journal of Ethics*. 2017; 19(12): 1186-1192.

50 Gaskell, G et al. «Public views on gene editing and its uses». *Nature Biotechnology*. 2017; 35(11): 1021-1023.

51 Bostrom, N. «A history of transhumanist thought». *Journal of Evolution and Technology*. 2005; 14(1): 1-25.

52 Savulescu, J. ¿Decisiones peligrosas? Una bioética desafiante. Tecnos, Madrid, 2012.

53 Zhen, S et al. «In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9». *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 450(4): 1422-1426.

54 Dufour, C et al. «Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1». *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191709.

55 Nelson, CE et al. «In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy». *Science*. 2016; 351(6271): 403-7.

56 Hainzl, S et al. «COL7A1 Editing via CRISPR/Cas9 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa». *Molecular Therapy*. 2017; 25(11): 2573-2584.

57 Schirolli, G et al. «Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1». *Science Translational Medicine*. 2017; 9(411): eaan0820.

58 Jain, A et al. «CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017; 114(42): 11199-11204.

59 Liu, XS et al. «Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene». *Cell*. 2018; 172(5): 979-992.

46 Cwik B. «Designing Ethical Trials of Germline Gene Editing». *The New England Journal of Medicine*. 2017; 377(20): 1911-1913.

47 Baylis F. «Counterpoint: The Potential Harms of Human Gene Editing Using CRISPR-Cas9». *Clinical Chemistry*. 2018; 64(3): 489-491.

48 De Miguel Beriain, I, Armaza Armaza, E. «Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRISPR-Cas9 a debate». *Anales de la Cátedra Francisco Suárez*. 2018; 52: 179-200.

Pero no fue hasta el año 2016 cuando CRISPR se utilizó en China por primera vez en humanos⁶⁰. En junio de ese mismo año se autorizó el primer ensayo clínico en EEUU⁶¹, pero este aún no ha sido llevado a cabo por cuestiones de seguridad, aunque se espera que comience muy pronto⁶². El estudio incluirá a 18 personas con distintos tipos de cáncer, como mieloma, sarcoma o melanoma. Los investigadores se proponen extraer células inmunitarias de los enfermos, cuyo genoma será modificado mediante CRISPR para que, una vez reinyectadas en el paciente, las células dirijan su acción de forma eficaz contra las células tumorales. El principal objetivo de este ensayo es evaluar la seguridad de la técnica.

Sin embargo, a fecha de hoy China lleva la delantera en el uso de CRISPR y ya se ha modificado en el país el ADN de al menos 86 personas en varios ensayos⁶³. En los mismos se extrajeron células de pacientes con cáncer de riñón, pulmón, hígado o garganta. A continuación fueron alteradas con CRISPR y devueltas a los cuerpos de los enfermos. Otros ensayos chinos han utilizado CRISPR para tratar el VIH, el cáncer de esófago y la leucemia.

En cuanto a la valoración ética de estas aplicaciones, aparecen diversas cuestiones respecto a la equidad en el acceso a las nuevas terapias, la protección de poblaciones vulnerables, el consentimiento informado, el establecimiento de marcos reguladores específicos (nacionales e internacionales), la posibilidad de un "turismo de salud", necesidad de adaptar los principios y protocolos de los ensayos clínicos, libertad de las empresas comerciales para ofrecer tratamientos de terapia génica directamente al consumidor, criterios de selección de enfermedades, etc.⁶⁴. No obstante, los principales problemas

que se plantean son de seguridad⁶⁵. Numerosos estudios han descrito la aparición de mutaciones *off-target* (fuera de objetivo) al utilizar CRISPR^{66,67,68,69}, lo que puede ser muy peligroso si ocurre en humanos, dada la naturaleza permanente de los cambios. Además, muy recientemente se han descubierto nuevos problemas de seguridad. En primer lugar, al analizar la sangre de 34 voluntarios se comprobó que la mayoría presentaba adaptaciones inmunitarias contra la proteína Cas9⁷⁰, efectora principal de la herramienta CRISPR, lo que supone que al realizar la edición genética el paciente puede desarrollar una respuesta inmune que no solo puede inactivar el tratamiento, sino que también puede ser peligrosa para el paciente, ya que las células T dirigidas a Cas9 podrían desencadenar un ataque generalizado en los propios tejidos del cuerpo⁷¹. En segundo lugar, dos artículos han señalado la inducción por CRISPR de un sistema de reparación del ADN mediado por p53, que revierte las modificaciones realizadas. Así, ediciones exitosas podrían deberse a una disfunción de este sistema de reparación, por lo que las células correctamente modificadas sería, sin embargo, proclives a desarrollar cáncer, suponiendo un peligro para el paciente^{72, 73}. Por último, se ha descubierto que CRISPR produce grandes deleciones y reordenamientos genéticos que hasta ahora se desconocían, pues no eran detectados por los procedimientos estándar de control⁷⁴.

65 Baylis, F, McLeod, M. «First-in-human Phase 1 CRISPR Gene Editing Cancer Trials: Are We Ready?». *Current Gene Therapy*. 2017; 17(4): 309–319.

66 Fu, Y et al. «High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells». *Nature Biotechnology*. 2013; 31(9): 822–826.

67 Hsu, PD et al. «DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases». *Nature Biotechnology*. 2013; 31(9): 827–832.

68 Zhang, XH et al. «Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering». *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2015; 4(11): e264.

69 Schaefer, KA et al. «Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo». *Nature Methods*. 2017; 14(6): 547–548.

70 Charlesworth, CT et al. «Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans». *bioRxiv*. 2018; 243345.

71 Ledford, H. «How the immune system could stymie some CRISPR gene therapies». *Nature News Explainer*. 2018.

72 Ihry, R et al. «p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells». *Nature Medicine*. 2018; 24(7): 939–946.

73 Haapaniemi, E et al. «CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response». *Nature Medicine*. 2018; 4(7): 927–930.

74 Kosicki, M, Tomberg, K, Bradley, A. «Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements». *Nature Biotechnology*. 2018; 36(8): 765–771.

60 Cyranoski D. «CRISPR gene-editing tested in a person for the first time». *Nature*. 2016; 539(7630): 479.

61 Reardon S. «First CRISPR clinical trial gets green light from US panel». *Nature*. 2016.

62 Brown, KV. [Publicación en línea] «The First US Human CRISPR Trials Could Start Any Day Now». 2018. < <https://gizmodo.com/the-first-us-human-crispr-trials-could-start-any-day-no-1822201067> > [Consulta: 27/04/2018]

63 Rana, P, Marcus, AD, Fan, W. [Publicación en línea] «China, Unhindered by Rules, Races Ahead in Gene-Editing Trials». 2018. < <https://www.wsj.com/articles/china-unhindered-by-rules-races-ahead-in-gene-editing-trials-1516562360> > [Consulta: 27/04/2018]

64 Howard, HC et al. «One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans». *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26(1): 1–11.

En este sentido es preocupante la rapidez con la que se están desarrollando los ensayos con CRISPR en China. Somos de la opinión que dichos ensayos deberían llevarse a cabo con más cautela, empezando por seleccionar las enfermedades más graves que no tengan ahora otro tratamiento posible, y en pacientes en los que el balance riesgo-beneficio sea claramente favorable.

Por otra parte, recientemente se ha propuesto la posibilidad de utilizar CRISPR para modular los niveles de proteínas, pero sin alterar la secuencia genética. Esto puede conseguirse de dos maneras, bien editando el ARN ya transcrito⁷⁵ o bien modulando la expresión de los genes mediante la activación o represión de la transcripción⁷⁶. Estos enfoques presentan una ventaja en cuanto a la seguridad, al no producir cambios permanentes en el genoma, por lo que, cuando puedan ser una opción efectiva, es una alternativa más deseable que la edición genética propiamente dicha.

4.3. Edición genética de animales y plantas

La herramienta de edición genética CRISPR también presenta multitud de útiles aplicaciones sobre animales y plantas. En ganadería, por ejemplo, se ha utilizado con éxito para generar cerdos inmunes a la devastadora enfermedad del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS por sus siglas en inglés: *Porcine reproductive and respiratory syndrome*), que ocasiona pérdidas millonarias en todo el mundo⁷⁷, así como para la producción de ganado lechero sin cuernos⁷⁸, que evitaría la necesidad de cortárselos a las vacas. También puede ser utilizada para generar modelos animales de enfermedades humanas, en animales tan interesantes como el mono⁷⁹, o para usos más peculiares como la obtención de mascotas con determinadas características, por ejemplo perros hípermusculados⁸⁰.

75 Cox et al, *op. cit.*

76 Liao et al, *op. cit.*

77 Whitworth, KM et al. «Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Nature Biotechnology*. 2016; 34(1): 20-22.

78 Carlson, DF ea. «Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines». *Nature Biotechnology*. 2016; 34(5): 479-481.

79 Wan, H et al. «One-step generation of p53 gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system». *Cell Research*. 2015; 25(2): 258-261.

80 Zou, Q et al. «Generation of gene-target dogs using CRISPR/

En cuanto a las plantas, CRISPR puede mejorar sus características para consumo o uso humano. Así, ya se han obtenido, por ejemplo, soja con tolerancia a la sequía y la sal, una hierba con retraso en el tiempo de floración o champiñones que no se ponen marrones⁸¹. También se han editado genéticamente múltiples plantas para hacerlas resistentes a enfermedades⁸² e incluso, muy recientemente, se ha conseguido modificar arroz para hacerlo resistente a la contaminación radioactiva⁸³, lo que supone una gran oportunidad para poder cultivarlo en las grandes extensiones de terreno agrícola que resultaron contaminadas por los accidentes en las centrales nucleares de Chernóbil y Fukushima.

Todas estas aplicaciones pueden resultar de una gran utilidad. Sin embargo, también suscitan objetivas cuestiones bioéticas que naturalmente deben ser consideradas. En primer lugar es necesario indicar la diferencia entre los organismos transgénicos y los editados con CRISPR u otras técnicas de edición genética, ya que importantes expertos en este campo están aludiendo a esta diferencia para defender el establecimiento de una regulación específica para el segundo caso⁸⁴. Los animales y cultivos modificados por ADN recombinante son los llamados Organismos Genéticamente Modificados (OGM) o transgénicos. Estos difieren de los modificados por edición genética en que los primeros contienen genes foráneos introducidos aleatoriamente en el genoma que producen proteínas nuevas en el organismo, otorgándole un rasgo beneficioso que antes no tenía. En cambio, los segundos contienen pequeñas alteraciones en genes ya existentes que le otorgan al organismo un rasgo beneficioso al modificar los niveles de una proteína que ya estaba en el organismo. Por ello, los científicos consideran que los organismos modificados por edición genética se asemejan más a los organismos modificados por métodos tradicionales, aceptados ampliamente en-

Cas9 system». *Journal of Molecular Cell Biology*. 2015; 7(6): 580-583.

81 Waltz, E. «With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time». *Nature Biotechnology*. 2018; 36(1): 6-7.

82 Arora, L, Narula, A. «Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System». *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8: 1932.

83 Nieves-Cordones, M et al. «Production of low-Cs+ rice plants by inactivation of the K+ transporter OshAK1 with the CRISPR-Cas system». *The Plant Journal*. 2017; 92(1): 43-56.

84 Doudna, J, Sternberg, S. *A crack in creation. The new power to control evolution*, The Bodley Head, Londres, 2017.

tre el público, como la sandía sin semillas que se obtiene por exposición a la colchicina, que a los transgénicos, por lo que no deberían ser tan estrictamente regulados.

De hecho, el *US Department of Agriculture* (USDA) que regula los cultivos biotecnológicos en EEUU, ya ha dado vía libre sin ningún tipo de requerimiento a al menos 50 cultivos modificados por edición genética, declarando que quedan fuera de su ámbito regulatorio⁸⁵.

Antes de considerar si esta diferente regulación es adecuada, cabe preguntarse si está justificada la estricta regulación a que están sujetos los transgénicos. Existe un consenso prácticamente unánime entre los científicos de que los transgénicos, una vez evaluados adecuadamente, son perfectamente seguros para consumo⁸⁶. Por ello, las estrictas normas que regulan su producción y distribución no estarían justificadas por criterios de salud pública⁸⁷.

Sin embargo, a día de hoy el público en general se muestra bastante reticente al uso de los transgénicos, por lo que es necesario un esfuerzo de comunicación desde el mundo de la ciencia para proporcionar información sobre los OGM de forma asequible a los ciudadanos. En este sentido, parece que sería más honesto por parte de los expertos esforzarse en hacer entender en qué consisten tanto los transgénicos como los organismos editados, que centrarse en las diferencias de los segundos con los primeros.

No obstante, aunque las estrictas normas que regulan la producción y distribución de transgénicos no están justificadas en base a criterios de salud pública, hay otras cuestiones que sí pueden justificar esta regulación. Una es el hecho de que la expansión libre de los organismos modificados por cualquiera de los dos métodos va a suponer seguramente la pérdida de las especies no mejoradas. A este respecto, somos de la opinión que la sociedad

en conjunto debe decidir, pero cabe mencionar que prácticamente todo con lo que nos alimentamos actualmente no es estrictamente natural. Otra es una cuestión de justicia distributiva. Estas tecnologías en principio ofrecen considerables ventajas medioambientales y económicas. Por ejemplo, plantando cultivos resistentes a distintos patógenos los agricultores pueden obtener un mayor rendimiento a la vez que reducen el uso de pesticidas y herbicidas químicos. Sin embargo, si estas tecnologías quedan en manos de unos pocos, va a suponer una ventaja económica solo para ellos, mientras que el pequeño agricultor o ganadero lo va a tener cada vez más difícil.

4.4. Gene drive

Por último, una novedosa aplicación de CRISPR es el llamado gene drive. Consiste en que un determinado gen no sigue la herencia mendeliana, sino que se propaga mucho más rápidamente en una población, sin necesidad de que confiera un rasgo ventajoso a los individuos. Esto se debe a que el gen en cuestión se copia al cromosoma del otro progenitor, por lo que la descendencia del individuo con el gen lo heredará en el 100% de los casos (en lugar del 50% habitual). Esto ocurre mediante la acción de una endonucleasa, que corta el genoma del otro progenitor y lo repara utilizando el del primer individuo como molde, copiándose el gen⁸⁸.

CRISPR puede utilizarse para gene drive, de manera que un gen editado se extienda rápidamente a través de una población. El trabajo está en una etapa temprana, pero esta técnica podría ser utilizada para acabar con los mosquitos portadores de enfermedades como el virus de la fiebre amarilla o el Zika, o extender la resistencia al parásito de la malaria en la población del mosquito portador, eliminar plantas invasoras o erradicar su resistencia a herbicidas. Recientemente se ha conseguido la erradicación de una población entera del mosquito transmisor de la malaria (*Anopheles gambiae*) en cautividad mediante esta estrategia⁸⁹. Tras introducir una mutación recesiva

85 Waltz, *op. cit.*

86 National Research Council (US) Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health. *Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects*, National Academies Press (US), Washington DC, 2004.

87 House of Commons Science and Technology Committee. [Publicación en línea] «Advanced genetic techniques for crop improvement: regulation, risk and precaution». 2015. < <https://publications.parliament.uk/pa/cm201415/cmselect/cmsctech/328/328.pdf> > [Consulta: 27/04/2018]

88 Godfray, HJ, North, A, Burt, A. «How driving endonuclease genes can be used to combat pests and disease vectors». *BMC Biology*. 2017; 15(1): 81.

89 Kyrou, K et al. «A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles*

que provoca esterilidad femenina en unos pocos individuos, se consiguió eliminar por completo la población en unas 10 generaciones. A pesar de lo prometedor de estos resultados, todavía son necesarios numerosos estudios para garantizar la eficacia y seguridad de la técnica en el ambiente natural. El paso inmediatamente posterior va a ser repetir el experimento en laboratorio bajo condiciones que emulen el ambiente natural de estos mosquitos, tal y como ha recomendado la *US National Academy of Sciences*⁹⁰. Aunque con resultados menos exitosos, también recientemente se ha conseguido utilizar *gene drive* en mamíferos, en concreto en ratones⁹¹.

Sin embargo, preocupa que la alteración de toda una población, o su completa eliminación, podría tener consecuencias drásticas y desconocidas para un ecosistema: por ejemplo, podría significar que otras plagas surgirán, o podría afectar a los depredadores más arriba en la cadena alimentaria.

Otra posibilidad preocupante es que el ARN guía mute con el tiempo, de tal manera que se dirija a una parte diferente del genoma. La nueva mutación podría entonces correr a través de la población, con efectos impredecibles⁹². Además, esta tecnología entra dentro de lo que se denominan tecnologías de doble uso, que pueden ser utilizadas para bien pero también para mal. Así, preocupa que pudiera usarse para atacar el microbioma humano o grandes fuentes de alimentación⁹³. Por todo ello, parece necesaria la puesta a punto de una regulación al respecto, no solo de las posibles aplicaciones de la técnica sino también de las investigaciones previas.

5. Conclusión

gambiae mosquitos». *Nature Biotechnology*. 2018; doi: 10.1038/nbt.4245.

90 National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. [Publicación en línea] «Gene Drives on the Horizon: Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values». Washington, DC: The National Academies Press. 2016. <<https://www.nap.edu/read/23405/chapter/1#ix>>.

91 Grunwald, H, et al. «Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR/Cas9 in the female mouse germline». *BioRxiv*. 2017; doi: <https://doi.org/10.1101/362558>.

92 Ledford, H. «CRISPR, the disruptor». *Nature*. 2015; 522(7554): 20-24.

93 ETC Group. [Publicación en línea] «Stop The Gene Bomb! ETC Group Comment on NAS Report on Gene Drives». 2016. <www.etcgroup.org/content/stop-gene-bomb-etc-group-comment-nas-report-gene-drives> [Consulta: 27/04/2018]

La herramienta CRISPR-Cas9 ha abierto la puerta a numerosas aplicaciones de edición genética hasta ahora impracticables. No obstante, algunas de ellas suscitan objetivas cuestiones éticas cuya discusión es urgente para garantizar un desarrollo justo, seguro y acorde con el respeto a la dignidad humana. En este sentido, una de las principales preocupaciones es la posibilidad de utilizar CRISPR para alterar el genoma humano en la línea germinal. Si bien esta posibilidad ya existía con técnicas anteriores, la simplicidad, efectividad y bajo coste de CRISPR han hecho que su llegada a la clínica parezca una posibilidad cada vez más factible.

Otras aplicaciones que plantean diversos interrogantes son la edición genética somática, cuya seguridad actualmente no puede garantizarse; la edición de animales y plantas para consumo humano, que plantea cuestiones de justicia distributiva, de regulación de los organismos modificados y respecto al mantenimiento de la biodiversidad actual; y la aplicación *gene drive*, cuya impredecibilidad, dificultad de control y carácter de doble uso urgen al establecimiento de estrictas medidas de seguridad y regulación de los experimentos.

Referencias

Arora, L, Narula, A. «Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System». *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8: 1932.

Baltimore, D et al. «A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification». *Science*. 2015; 348(6230): 36–38.

Baylis F. «Counterpoint: The Potential Harms of Human Gene Editing Using CRISPR-Cas9». *Clinical Chemistry*. 2018; 64(3): 489-491.

Baylis, F, McLeod, M. «First-in-human Phase 1 CRISPR Gene Editing Cancer Trials: Are We Ready?». *Current Gene Therapy*. 2017; 17(4): 309–319.

Bellver Capella, V. «La revolución de la edición genética mediante CRISPR-Cas9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta». *Cuadernos de Bioética*. 2016; 27(90): 223-239.

Bolotin, A et al. «Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra-

- chromosomal origin». *Microbiology*. 2005; 151(Pt 8): 2551-2561.
- Bostrom, N. «A history of transhumanist thought». *Journal of Evolution and Technology*. 2005; 14(1): 1-25.
- Brown, KV. [Publicación en línea] «The First US Human CRISPR Trials Could Start Any Day Now». 2018. <<https://gizmodo.com/the-first-us-human-crispr-trials-could-start-any-day-no-1822201067>> [Consulta: 27/04/2018]
- Callaway E. «Gene-editing research in human embryos gains momentum». *Nature*. 2016; 532(7599): 289–290.
- Carlson, DF ea. «Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines». *Nature Biotechnology*. 2016; 34(5): 479-481.
- Chan, S et al. «Genome editing technologies and human germline genetic modification: The Hinxton Group consensus statement». *The American Journal of Bioethics*. 2015; 15(12): 42–47.
- Charlesworth, CT et al. «Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans». *bioRxiv*. 2018; 243345.
- Chen, JS et al. «CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity». *Science*. 2018; pii: eaar6245.
- Chneiweiss, H et al. «Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective». *Transgenic Research*. 2017; 26(5): 709–713.
- Cong, L et al. «Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems». *Science*. 2013; 339(6121): 819-823.
- Cox, DBT et al. «RNA editing with CRISPR-Cas13». *Science*. 2017; 358(6366): 1019-1027.
- Cwik B. «Designing Ethical Trials of Germline Gene Editing». *The New England Journal of Medicine*. 2017; 377(20): 1911-1913.
- Cyranoski D. «CRISPR gene-editing tested in a person for the first time». *Nature*. 2016; 539(7630): 479.
- De Miguel Beriain, I, Armaza Armaza, E. «Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRISPR-Cas9 a debate». *Anales de la Cátedra Francisco Suárez*. 2018; 52: 179-200.
- De Wert, G et al. «Human germline gene editing: Recommendations of ESHG and ESHRE». *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26(4): 445-449.
- Doudna, J, Sternberg, S. *A crack in creation. The new power to control evolution*, The Bodley Head, Londres, 2017.
- Dufour, C et al. «Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1». *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191709.
- ETC Group. [Publicación en línea] «Stop The Gene Bomb! ETC Group Comment on NAS Report on Gene Drives». 2016. <www.etcgroup.org/content/stop-gene-bomb-etc-group-comment-nas-report-gene-drives> [Consulta: 27/04/2018]
- Fogarty, NME et al. «Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis». *Nature*. 2017; 550(7674): 67-73.
- Fu, Y et al. «High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells». *Nature Biotechnology*. 2013; 31(9): 822–826.
- Gaskell, G et al. «Public views on gene editing and its uses». *Nature Biotechnology*. 2017; 35(11): 1021-1023.
- Gaudelli, NM et al. «Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage». *Nature*. 2017; 551(7681): 464-471.
- Godfray, HCJ, North, A, Burt, A. «How driving endonuclease genes can be used to combat pests and disease vectors». *BMC Biology*. 2017; 15(1): 81.
- Gootenberg, JS et al. «Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6». *Science*. 2018; pii: eaaq0179.
- Grunwald, H, et al. «Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR/Cas9 in the female mouse germline». *BioRxiv*. 2017; doi: <https://doi.org/10.1101/362558>.
- Haapaniemi, E et al. «CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response». *Nature Medicine*. 2018; 4(7): 927-930.
- Hainzl, S et al. «COL7A1 Editing via CRISPR/Cas9 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa». *Molecular Therapy*. 2017; 25(11): 2573-2584.

- House of Commons Science and Technology Committee. [Publicación en línea] «Advanced genetic techniques for crop improvement: regulation, risk and precaution». 2015. < <https://publications.parliament.uk/pa/cm201415/cmselect/cmsctech/328/328.pdf>> [Consulta: 27/04/2018]
- Howard, HC et al. «One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans». *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26(1): 1-11.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. «Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering». *Cell*. 2014; 157(6): 1262-1278.
- Hsu, PD et al. «DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases». *Nature Biotechnology*. 2013; 31(9): 827-832.
- lhry, R et al. «p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells». *Nature Medicine*. 2018; 24(7): 939-946.
- Ishino, Y et al. «Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product». *Journal of Bacteriology*. 1987; 169(12): 5429-5433.
- Jain, A et al. «CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017; 114(42): 11199-11204.
- Jansen, R et al. «Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes». *Molecular Microbiology*. 2002; 43(6): 1565-1575.
- Jinek, M et al. «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science*. 2012; 337(6096): 816-821.
- Kang, X et al. «Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016; 33(5): 581-588.
- Koonin, EV, Makarova, KS, Zhang, F. «Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems». *Current Opinion in Microbiology*. 2017; 37: 67-78.
- Kosicki, M, Tomberg, K, Bradley, A. «Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements». *Nature Biotechnology*. 2018; 36(8): 765-771.
- Kyrou, K et al. «A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged Anopheles gambiae mosquitoes». *Nature Biotechnology*. 2018; doi: 10.1038/nbt.4245.
- Lander, ES. «The Heroes of CRISPR». *Cell*. 2016; 164(1-2): 18-28.
- Lanphier, E et al. «Don't edit the human germline». *Nature*. 2015; 519(7544): 410-411.
- Ledford, H. «CRISPR, the disruptor». *Nature*. 2015; 522(7554): 20-24.
- Ledford, H. «How the immune system could stymie some CRISPR gene therapies». *Nature News Explainer*. 2018.
- Lehmann, LS. «Is Editing the Genome for Climate Change Adaptation Ethically Justifiable?». *AMA Journal of Ethics*. 2017; 19(12): 1186-1192.
- Li, G et al. «Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos». *Protein Cell*. 2017; 8(10): 776-779.
- Liang, P et al. «Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos». *Protein Cell*. 2017; 8(11): 811-822.
- Liang, P et al. «CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes». *Protein Cell*. 2015; 6(5): 363-372.
- Liao, HK et al. «In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation». *Cell*. 2017; 171(7): 1495-1507.
- Liu, XS et al. «Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene». *Cell*. 2018; 172(5): 979-992.
- Ma, H et al. «Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos». *Nature*. 2017; 548(7668): 413-419.
- Makarova, KS et al. «An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems». *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13(11): 722-736.

- Marraffini, LA, Sontheimer, EJ. «Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity». *Nature*. 2010; 463(7280): 568–571.
- Mojica FJ et al. «Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements». *Journal of Molecular Evolution*. 2005; 60(2): p. 174-182.
- Mojica FJ, et al. «Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria». *Molecular Microbiology*. 2000; 36(1): 244-246.
- Mojica, FJ et al. «Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning». *Molecular Microbiology*. 1995; 17(1): 85-93.
- Mojica, FJ, Juez, G, Rodríguez-Valera, F. «Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites». *Molecular Microbiology*. 1993; 9(3): 613-621.
- National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. [Publicación en línea] «Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance». Washington, DC: The National Academies Press. 2017. <<https://doi.org/10.17226/24623>>.
- National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. [Publicación en línea] «Gene Drives on the Horizon: Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values». Washington, DC: The National Academies Press. 2016. <<https://www.nap.edu/read/23405/chapter/1#ix>>.
- National Research Council (US) Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health. *Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects*, National Academies Press (US), Washington DC, 2004.
- Navarro A. [Publicación en línea] «CRISPR». 2018. <<http://medicablogs.diariomedico.com/laboratorio/2018/01/23/crispr/>> [Consulta 27/04/2018]
- Nelson, CE et al. «In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy». *Science*. 2016; 351(6271): 403-7.
- Nieves-Cordones, M et al. «Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system». *The Plant Journal*. 2017; 92(1): 43-56.
- Nuffield Council on Bioethics. [Publicación en línea] «Genome editing and human reproduction: social and ethical issues». 2018, 136. <<http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Genome-editing-and-human-reproduction-FINAL-website.pdf>> [Consulta: 16/10/2018]
- Ormond, KE et al. «Human Germline Genome Editing». *The American Journal of Human Genetics*. 2017; 101(2): 167-176.
- Pourcel, C, Salvignol, G, Vergnaud, G. «CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies». *Microbiology*. 2005; 151(Pt 3): 653-663.
- Rana, P, Marcus, AD, Fan, W. [Publicación en línea] «China, Unhampered by Rules, Races Ahead in Gene-Editing Trials». 2018. <<https://www.wsj.com/articles/china-unhampered-by-rules-races-ahead-in-gene-editing-trials-1516562360>> [Consulta: 27/04/2018]
- Reardon S. «First CRISPR clinical trial gets green light from US panel». *Nature*. 2016.
- Savulescu, J. ¿Decisiones peligrosas? Una bioética desafiante, Tecnos, Madrid, 2012.
- Schaefer, KA et al. «Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo». *Nature Methods*. 2017; 14(6): 547-548.
- Schirolli, G et al. «Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1». *Science Translational Medicine*. 2017; 9(411): eaan0820.
- Shevidi, S et al. «Single nucleotide editing without DNA cleavage using CRISPR/Cas9-deaminase in the sea urchin embryo». *Developmental Dynamics*. 2017; 246(12): 1036-1046.

- Tang, L et al. «CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein». *Molecular Genetics and Genomics*. 2017; 292(3): 525–533.
- Tang, L et al. «Highly efficient ssODN-mediated homology-directed repair of DSBs generated by CRISPR/Cas9 in human 3PN zygotes». *Molecular Reproduction & Development*. 2018; doi: 10.1002/mrd.22983.
- Vassena, R et al. «Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells». *Human Reproduction Update*. 2016; 22(4): 411-419.
- Waltz, E. «With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time». *Nature Biotechnology*. 2018; 36(1): 6-7.
- Wan, H et al. «One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system». *Cell Research*. 2015; 25(2): 258–261.
- Whitworth, KM et al. «Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Nature Biotechnology*. 2016; 34(1): 20-22.
- Wright, AV, Nuñez, JK, Doudna, JA. «Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering». *Cell*. 2016; 164(1-2): 29-44.
- Zhang, XH et al. «Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering». *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2015; 4(11): e264.
- Zhen, S et al. «In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9». *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 450(4): 1422-1426.
- Zhou, C et al. «Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes». *Protein Cell*. 2017; 8(10): 772-775.
- Zou, Q et al. «Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system». *Journal of Molecular Cell Biology*. 2015; 7(6): 580-583.