

La edición genética hoy. Su valoración bioética

por OBSERVATORIO DE BIOETICA UCV

“Con el descubrimiento de CRISPR/Cas9, la edición genética ha llegado para quedarse”

Pocos avances científicos son tan trascendentes como el descubrimiento de la técnica CRISPR/Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) como herramienta de edición genética. CRISPR/Cas es un sistema natural que dota a las bacterias de respuesta adaptativa frente a virus. En 2012 Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron un estudio en el cual se detalla cómo este sistema puede ser utilizado para realizar la edición genética programada en distintos tipos celulares(1). Anteriormente se habían descubierto otras técnicas de edición genética, como TALENs (*transcription activator like effector nucleases*) o ZFNs (*zinc finger nucleases*). No obstante, su complejidad de uso, su alto coste, y su eficacia escasa o moderada impidieron que su uso se generalizara, a pesar de que en algunos casos se han obtenido buenos resultados de su aplicación. La técnica CRISPR/Cas9 solventa estos tres escollos, por lo que se ha extendido en muy poco tiempo a los laboratorios de todo el mundo, relegando a un segundo plano a las técnicas antecesoras. Así, el número de publicaciones en este campo aumenta rápidamente. Parece acertado afirmar que, con el descubrimiento de CRISPR/Cas9, la edición genética ha llegado para quedarse.

Historia

En 1987 se publica el primer artículo que habla de secuencias repetidas en el genoma de las bacterias, en concreto en *Escherchia coli* (2). En un primer momento se consideró que estas secuencias repetidas carecían de función alguna.

En el año 1993, el español Francisco Martínez Mojica, describió esa misma secuencia en otro tipo de bacterias, las *Haloferax mediterranei*, cuyo hábitat se encuentra única y exclusivamente en las salinas de Santa Pola (3). En el 2000, Martínez Mojica describe esta misma secuencia en otro grupo de bacterias, y las denominó *short regularly spaced repeats* (SRSRs) (4). Dos años más tarde, Ruud Jansen identifica unos genes asociados a estas secuencias repetidas y, con el beneplácito de Martínez Mojica, rebautiza las secuencias repetidas, que pasan a denominarse *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) (5). En el año 2005, Martínez Mojica identifica similitudes entre los espaciadores asociados a CRISPR descritos por Ruud Jansen y el material genético de ciertos virus que afectan a bacterias. Es entonces cuando se identifica el sistema CRISPR como un sistema de defensa de las bacterias frente a virus, siendo este sistema heredable a las sucesivas generaciones de bacterias (6). Los descubrimientos de Mojica sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica de edición genética lo que le ha valido una nominación al Premio Nobel de Medicina de 2016, que finalmente no ha ganado.

En el año 2012, el equipo liderado por Doudna y Charpentier realizó el primer “corte” con el sistema CRISPR/Cas9 en un tubo de ensayo, e intuyeron que esto mismo se podría realizar en otro tipo de células, como las eucariotas, y que se podría usar para la edición genética. Por ello, ambas investigadoras fueron galardonadas con el premio princesa de Asturias de investigación científica y técnica 2015.

Posteriormente, ese mismo año, Feng Zhang logró realizar el primer corte utilizando CRISPR/Cas9 sobre el genoma de una célula viva de mamífero (7). Zhang logró inscribir este hallazgo en el registro de patentes de los Estados Unidos. Actualmente, dicho registro se encuentra en un litigio legal con las investigadoras Doudna y Charpentier.

Cómo funciona CRISPR/Cas

Las bacterias son células procariotas, lo que significa que su ADN no se encuentra protegido en un núcleo celular, sino suelto en el citoplasma. De ello se deriva la necesidad de un sistema defensivo, el sistema CRISPR/Cas, que ha demostrado ser de gran importancia para la supervivencia bacteriana, pues si se eliminan las secuencias CRISPR las bacterias mueren (6).

En el medio natural, cuando una bacteria detecta la entrada de un ADN viral, envía una secuencia de ARN capaz de “copiar” hasta 20 nucleótidos del ADN del virus. Entonces la secuencia copia se une a la proteína de corte Cas. Una vez unido en un único complejo, el ARN con los 20 nucleótidos copiados localizan el lugar de encaje en el ADN viral, se une, y la proteína Cas9 realiza un corte en el ADN invasor.

Usos de las técnicas de edición genética

Solo se está empezando a vislumbrar la enorme cantidad de posibilidades que ofrece esta nueva herramienta biotecnológica, que además de multitud de aplicaciones en el campo de la medicina, tiene aplicaciones ambientales, agrícolas y ganaderas, cuyos aspectos éticos son tratados en nuestro Observatorio.

Las aplicaciones sanitarias son las que más interés despiertan, por su impacto directo sobre la vida de las personas, y a la vez las más controvertidas, principalmente en lo que se refiere a la modificación genética de la línea germinal (gametos y embriones).

Se están realizando cientos de estudios en este aspecto, con múltiples y diversos objetivos, que van desde el diseño de nuevos métodos para combatir enfermedades de difícil tratamiento, como el VIH o diversos tipos de cáncer, hasta la posibilidad de tratar patologías genéticas. En este sentido, *recientemente se aprobó el primer ensayo sobre seres humanos en los Estados Unidos*. En dicho ensayo, se seleccionarán 18 sujetos con diferentes tipos de melanoma, mieloma y carcinoma que no respondan a los tratamientos habituales. Las expectativas depositadas en este ensayo son enormes, ya que plantea la posibilidad de combatir el cáncer de una forma eficiente y muy poco invasiva, prescindiendo de los tratamientos actuales basados en cirugía, quimioterapia y radioterapia (8).

A pesar de las importantes reticencias existentes entre la comunidad científica (9), (10), ya se han realizado dos estudios sobre embriones (11), (12), ambos en China. En los dos se utilizaron embriones no viables.

Si bien es verdad que la comunidad científica está de acuerdo de forma prácticamente unánime en la negativa del uso de la edición genética para usos no terapéuticos (por ejemplo la selección del color de los ojos), o dicho de otra forma, para el “mejoramiento” genético, por no ser éticamente aceptable, también es verdad que actualmente se encuentra dividida en dos grandes grupos, los que rechazan esta tecnología por los problemas éticos que implica la terapia germinal, y los que opinan que puede tener un uso legítimo para evitar enfermedades genéticas. Dicha división solo se referiría al uso de la edición genética sobre la línea germinal, ya que existe un amplio consenso a favor sobre su uso en células somáticas.

No obstante, parece que la tendencia es aceptar la investigación sobre embriones pero impedir su implantación en el útero de una mujer. De hecho, en Inglaterra ya se han autorizado estudios de este tipo. Desde nuestro punto de vista, esto es moralmente inaceptable, ya que el embrión humano tiene una dignidad igual a la de la persona ya nacida. Puede consultar una reflexión sobre la modificación genética de embriones humanos para tratar enfermedades.

Existe un estudio realizado sobre 39 países para intentar esclarecer cuál es la situación legal actual al respecto de la edición genética sobre células germinales (13). Este trabajo revela lo siguiente sobre estos 39 países:

- 25 lo prohíben por ley. En este grupo se encuentran Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Bulgaria, Canadá, Costa Rica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Israel, Italia, Lituania, Méjico, Nueva Zelanda, Singapur, Corea del Sur, Suecia, Suiza, República Checa, Noruega, Reino Unido, Portugal y España. Este es el grupo más amplio, y engloba a la mayoría de los países de nuestro entorno.
- 4 lo prohíben mediante directrices, las cuales son menos restrictivas que una ley, y pueden estar sujetas a modificaciones con mayor facilidad que una ley. Este es el caso de China, Japón, India e Irlanda.
- 9 son ambiguos en sus leyes. En este grupo se encuentran Argentina, Chile, Colombia, Grecia, Islandia, Perú, Rusia, Eslovaquia y Sudáfrica.
- Es restrictivo. Este es el interesante caso de Estados Unidos. Existen dos agencias estatales implicadas. La FDA (Food and Drug Administration) regula los ensayos clínicos, mientras que el NIH (National Institutes of Health) restringe su aplicación práctica sobre seres humanos.

El panorama de *la regulación internacional actual* a este respecto sugiere que la modificación genética de la línea germinal humana no está totalmente prohibida, ya que existen espacios para la investigación en los países catalogados como “ambiguos” en su regulación. En el caso de China y del Reino Unido, se han autorizado estudios en este sentido, incluso a pesar de su regulación. Igualmente, los cuatro países nombrados anteriormente con prohibiciones a través de directrices, podrían levantar dichas prohibiciones cuando mejorara la seguridad de la corrección de genes sobre la línea germinal.

El informe del [Nuffield Council on Bioethics](#) sobre edición genética, publicado en septiembre de 2016 (14), señala que, además de la medicina reproductiva, otra área de vital importancia a tratar es la aplicación de estas técnicas en agricultura.

También cabe la posibilidad de modificar los ecosistemas. Este es el caso de los mosquitos, grandes vectores transmisores de múltiples enfermedades de difícil control. Se especula con la posibilidad de alterar genéticamente a una serie de individuos modificados y liberarlos al medio natural para que interactúen con sus respectivas poblaciones y así poder extender la modificación genética deseada. En este sentido, se ha propuesto combinar CRISPR con *gene drive*, lo que permitiría alterar casi cualquier gen en cualquier especie con reproducción sexual y propagar las alteraciones producidas a través de las poblaciones silvestres. No obstante, las consecuencias de la modificación de toda una población son desconocidas y preocupantes ver [AQUÍ](#)). Así, la [National Academy of Sciences](#) de los EEUU lanzó una guía de pautas a seguir para una conducta responsable de la investigación en relación con *gene drive*.

Con el objetivo de discutir las implicaciones científicas, médicas, legales y éticas de estos avances, Doudna promovió una reunión con especialistas en diversos ámbitos científicos en enero de 2015 en Napa (California), identificando una serie de pasos a seguir (9).

Valoración bioética

En el caso de los usos de la edición genética en la industria primaria, agricultura y ganadería, no cabe sino estar a favor de todos aquellos usos que impliquen un beneficio para la humanidad. Sería necesario un análisis caso a caso, descartando aquellos usos en los que el beneficio buscado sea menor al riesgo potencial de la manipulación genética. Por ejemplo, la manipulación de las especies vegetales para que sean resistentes a diversos tipos de plagas presenta un amplio beneficio para la humanidad, como puede ser evitar el uso de plaguicidas y otros productos químicos para la protección de la cosecha, ya que estos pueden dispersarse por el aire llegando a núcleos poblados o filtrarse a acuíferos subterráneos. Resaltar que, en ocasiones, el problema puede no ser de seguridad, sino de justicia. Debe garantizarse que cualquier avance en este campo no

va a conllevar una forma de explotación. Por otra parte, deberá regularse la información al consumidor final mediante el etiquetado del origen del producto.

Con la intervención sobre los ecosistemas se debería ser más más cauteloso si cabe, ya que cualquier alteración puede conllevar problemas incalculables y de extrema gravedad a escala incluso mundial, puesto que el medio natural no responde a las fronteras políticas.

En cuanto a las aplicaciones médicas, el uso de las técnicas de edición genética sobre seres humanos más cercano en el tiempo sería sobre las células somáticas. De hecho, ya se ha autorizado el primer estudio de este tipo. Aunque enormemente prometedor, los estudios en este campo todavía tienen mucho camino por recorrer. Los científicos tienen grandes expectativas a este respecto, y se están realizando multitud de estudios y enormes inversiones de recursos. Para que el uso de esta técnica fuese aceptable, debe aumentarse la seguridad y debería usarse solamente en aquellas patologías donde actualmente no exista tratamientos efectivos, o en patologías en los que los tratamientos actuales conllevasen importantes efectos secundarios, y su tasa de éxito y la posibilidad de efectos secundarios debería ser equivalente a la de los tratamientos actuales.

Pero si hay un uso de esta técnica que genera más controversia, es su *uso sobre las células germinales*. La controversia viene dada sobre todo por la heredabilidad de los cambios ejecutados en el ADN de estas células. La historia de la genética es relativamente reciente, y aún existen muchas lagunas. Al tratarse de la *línea germinal y de modificaciones heredables*, no deberíamos albergar duda alguna sobre cualquier mecanismo implicado. Si en la edición genética de las células somáticas cabe exigir una eficacia y seguridad iguales o superiores a las de los medicamentos tradicionales o a las vacunas, en la modificación de la línea germinal deberían ser del 100%.

Por otro lado, para aplicar esta técnica sería necesario hacer uso de la fecundación *in vitro*, con las dificultades éticas que ello conlleva. Además, en la aplicación de estas técnicas ya se incluye el diagnóstico genético preimplantacional, lo que implica que la edición genética en este caso podría no ser de utilidad.

Aunque los beneficios potenciales son muchos, el número de personas a beneficiar es reducido y los riesgos a asumir son incalculables, afectando a toda la especie de manera irreversible. La edición genética sobre la línea germinal resulta éticamente inasumible.

Limitaciones de CRISPR-Cas9 y alternativas

A pesar del gran potencial de la técnica CRISPR-Cas9, también presenta sus limitaciones, frente a las cuales se han propuesto diversas alternativas (15).

Los componentes del sistema CRISPR-Cas9 (la enzima llamada Cas9 y la hebra de ARN que dirige esta enzima a la secuencia deseada del ADN) son demasiado grandes para introducirse en el genoma del virus utilizado más comúnmente en terapia génica para transportar material genético extraño al interior de células humanas. Una solución se presenta en forma de un mini-Cas9, que fue obtenido de la bacteria *Staphylococcus aureus* (16). Esta enzima es lo suficientemente pequeña como para caber en el virus. El diciembre pasado, dos grupos utilizaron el mini-Cas9 en ratones para corregir el gen responsable de la distrofia muscular de Duchenne (17), (18).

La enzima Cas9 no siempre corta donde se pretende -una determinada secuencia de ADN debe estar cerca para que eso ocurra-. Esta demanda se cumple fácilmente en muchos genomas, pero puede ser una limitación en algunos experimentos. Los investigadores están buscando en microbios para obtener enzimas con diferentes requisitos de secuencia para ampliar el

número de secuencias que se puedan modificar. Una de estas enzimas, llamada Cpf1, puede llegar a ser una alternativa atractiva. Más pequeño que Cas9, tiene diferentes requisitos de secuencia y es altamente específico (19), (20). Otra enzima, llamada C2c2, se dirige a ARN en lugar de a ADN, característica por la cual tiene un gran potencial para estudiar el ARN y luchar contra virus con genomas de ARN (21).

Muchos laboratorios utilizan CRISPR-Cas9 sólo para eliminar las secciones en un gen, aboliendo así su función. Aquellos que quieren intercambiar una secuencia por otra se enfrentan a una tarea más difícil. Cuando Cas9 corta el ADN, la célula comete errores al juntar los extremos sueltos, obteniéndose así las deleciones deseadas. Pero los investigadores que quieren reescribir una secuencia de ADN se basan en una vía de reparación diferente que puede insertar una nueva secuencia – un proceso que ocurre a una frecuencia mucho más baja. Pero en los últimos meses investigadores anunciaron que habían inutilizado Cas9 y atado a ella una enzima que convierte una letra de ADN en otra. El Cas9 inutilizado todavía dirige la secuencia dictada por su ARN guía, pero no corta: en su lugar, la enzima unida cambia las letras de ADN, en última instancia, produciendo una T, donde una vez hubo un C (22). Un artículo publicado en *Science* recientemente informa de un resultado similar (23).

En mayo, un artículo en *Nature Biotechnology* (24) dio a conocer un nuevo sistema de edición genética. Los investigadores afirmaron que podían usar una proteína llamada NgAgo para cortar el ADN en un sitio predeterminado sin necesidad de una guía de ARN o una secuencia vecina específica de genoma. En su lugar, la proteína – de origen bacteriano – se programa usando una secuencia corta de ADN que corresponde a la zona objetivo. Sin embargo, los laboratorios han fracasado hasta el momento en reproducir los resultados, por lo que no puede afirmarse la eficacia de esta técnica. Aun así, todavía hay esperanza de que las proteínas de la familia a la que pertenece NgAgo – Ago o *Argonautes* – realizadas por otras bacterias podrían funcionar.

También hay otros sistemas de edición genética, algunos de los cuales existen desde hace años. Para un amplio proyecto que tenía como objetivo modificar genes en bacterias, el laboratorio de Church no utilizó CRISPR. En lugar de ello, el equipo se basó en gran medida de un sistema llamado lambda Red, que se puede programar para alterar secuencias de ADN sin necesidad de un ARN guía. Pero a pesar de 13 años de estudio en el laboratorio de Church, lambda Red funciona solo en bacterias.

Church y Feng Zhang, bioingeniero en el Instituto Broad del MIT y Harvard en Cambridge, Massachusetts, dicen que sus laboratorios también están trabajando en el desarrollo de enzimas llamadas integrasas y recombinasas para su uso como editores de genes.

Referencias

1. Doudna J, Charpentier E, Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. 2012 Agosto 17; 337(6096): p. 816-821.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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 Diciembre; 169(12).
3. Matinez Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*. 1993 Agosto; 9(3).
4. Martinez Mojica FJ, Diez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*. 2000 Abril; 36(1).

5. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*. 2002 Marzo; 43(6).
6. Martinez Mojica F, Diez-Villaseñor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Molecular Evolution*. 2005 Febrero; 60(2).
7. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. 2013 Febrero 15; 339(6121): p. 819-823.
8. Kaiser J. First proposed human test of CRISPR passes initial safety review. 2016. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/news/2016/06/human-crispr-trial-proposed>.
9. Baltimore, D., et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. 348, 36-38.
10. Lanphier, E., Urnov, F., Haecker, S. E., Werner, M. & Smolenski, J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015. 519, 410-411.
11. Liang, P. et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015. 6, 363-372.
12. Kang, X., et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*. 2016 May;33(5):581-8. doi: 10.1007/s10815-016-0710-8. Epub 2016 Apr 6.
13. Araki M, Ishii T. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive biology and endocrinology*. 2014 Noviembre; 12(108).
14. <http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Genome-editing-an-ethical-review.pdf>
15. Ledford, H. Beyond CRISPR: A guide to the many other ways to edit a genome. *Nature*. 2016 Aug 8;536(7615):136-7. doi: 10.1038/536136b.
16. Ran, F. A. et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015. 520, 186–191.
17. Nelson, C. E. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016. 351, 403–407.
18. Tabebordbar, M. et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2016. 351, 407–411.
19. Kim, D. et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnol*. 2016. doi: 10.1038/nbt.3609.
20. Kleinstiver, B. P. et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnol*. 2016. doi: 10.1038/nbt.3620.
21. Abudayyeh, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. 2016. 353, aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573.
22. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016. 533, 420–424.
23. Nishida, K. et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*. 2016 Sep 16;353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729.

24. Gao, F. et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nature Biotechnol.* 2016. 34, 768–773.