

La modificación del código genético

Modification of the genetic code

Lluís Montoliu

La tecnología del ADN recombinante

El conocimiento de nuestro genoma es un tema que ha fascinado desde siempre, aunque el primer borrador del genoma humano no se obtuvo hasta el año 2001, con sendas publicaciones en las revistas *Nature* y *Science*, tras haber lanzado el proyecto a finales de los años 80. Finalmente, el genoma humano completo se conoció en 2003 y entonces constatamos que apenas tenemos unos 20.000 genes que son los que parecen ser necesarios para ser lo que somos. El genoma ha seguido completándose y revisándose. El genoma de referencia actual es de 2013.

De forma paralela a la voluntad de conocer nuestro genoma ha estado siempre presente la posibilidad de alterarlo, de modificarlo. Y esta posibilidad, la mayoría de las veces a nivel teórico, ha surgido numerosas veces en la historia reciente, desde la primera reunión para evaluar los peligros del ADN recombinante, celebrada en Asilomar (California) en 1975, hasta el nacimiento de los primeros seres humanos cuyo genoma había sido editado en fase embrionaria, que desafortunadamente conocimos en 2018.

Lo primero que hay que indicar es que el genoma humano no es inmutable ni único. Cada uno de nosotros tenemos un genoma distinto. El genoma de dos personas cualquiera se parece en un 99,9%, no muy lejos de nuestras diferencias con la especie más próxima a nosotros, el chimpancé, con quien compartimos el 99% del genoma, y algo más lejos de una de las especies modelo más utilizadas en biología, el ratón, con un 90% aproximadamente de conservación en la zona que codifica para proteínas.

Desde que la humanidad fue consciente, en la década de los años 70 del siglo XX, que era posible aplicar las innovaciones y desarrollos del recién creado campo de la ingeniería genética para combinar y modificar cualquier fragmento de ADN, surgieron las discusiones y ciertamente la posibilidad, inicialmente teórica y a la postre hecha realidad, de modificar el genoma humano. Sin embargo, hay que decir que aquella posibilidad se antojaba en principio lejana y técnicamente inalcanzable.

Con el paso del tiempo han ido apareciendo numerosas técnicas experimentales que han transformado ese deseo inicial en una realidad, permitiendo que cristalizara la posibilidad de aplicar métodos de modificación genética. Y todo ello ha ido acercando el temor generalizado a la alteración de algo nuestro, íntimo, nuestro genoma, a la realidad. La aparición de los revolucionarios métodos de edición genética asociados a las herramientas CRISPR ha hecho posible lo que hasta hace muy poco tiempo no era más que una idea, muchas veces comentada, pero difícilmente realizable.

Desafortunadamente, como todos recordamos, ya ha habido quien logró llevar esas ideas a la práctica, saltándose todos los preceptos legales, éticos y morales. Ya nacieron los primeros seres humanos con su genoma editado. En concreto tres niñas en China, unos hechos que conocimos entre 2018 y 2019. En estos momentos, apenas nos queda reflexionar con detenimiento e intentar regular estos usos, para maximizar los posibles beneficios y reducir los riesgos al mínimo.

La modificación del genoma humano lleva muchos años en el imaginario colectivo. En 1953, James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura del ADN, y gracias a ese avance crucial se logró entender cómo se almacenaba, replicaba y transmitía la información genética, es decir, se desentrañó el mecanismo básico de la herencia. Tras el descubrimiento de la doble hebra complementaria y antiparalela de Watson y Crick, quienes compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1962 con Maurice Wilkins, en los años posteriores de esa década, gracias, entre otros, a las investigaciones de Severo Ochoa, Matthew Meselson, Frank Stahl, la humanidad empezó a vislumbrar la capacidad de alterar a voluntad nuestro genoma, esa molécula de ADN de más de tres mil millones de pares de bases, que acaba determinando lo que somos y cómo nos desarrollamos. La que nos dice lo que compartimos y en la que subyacen pequeñas diferencias que son las que nos hacen únicos.

Las primeras pistas encaminadas a posibilitar nuestra capacidad de interactuar con el material genético no llegaron hasta los años 70 del siglo XX, en un momento de explosión y creación de una disciplina, la biología molecular, y un conjunto de técnicas englobadas bajo el epígrafe de la ingeniería genética, que estaban llamadas a convertir muchos sueños en realidad. Fue precisamente por esas mismas fechas cuando se descubrieron unas proteínas singulares de procariotas, los primeros enzimas de restricción. Se descubrió que estas proteínas forman parte del arsenal de defensas que usan bacterias y arqueas para defenderse de ácidos nucleicos invasores. Los enzimas de restricción reconocen secuencias cortas de ADN determinadas y pueden digerirlas, cortarlas, de una forma predecible. Los enzimas de restricción son, junto a los sistemas CRISPR, que algunos años más tarde revolucionarían la biología, uno más de los sistemas de defensa ancestrales inventados por los procariotas. La detección de una determinada secuencia de ADN (p.e. GAATTC, y su cadena complementaria CTTAAG) era suficiente para que una de las primeras enzimas de restricción conocidas, *Eco* RI (*Eco* de *Escherichia coli*), cortara entre la G y la A en ambas cadenas, promoviendo la degradación de las moléculas de ADN así expuestas por parte de otras exonucleasas de la célula. Por su parte, la propia bacteria se protegía de que la enzima *Eco* RI cortara esas mismas secuencias en su propio genoma marcándolas, mediante una sencilla modificación química, mediante una metilación. La posibilidad de manipular (o modificar) las moléculas de ADN surgió al constatar que dos de estas secuencias cortas de ADN idénticas dentro de moléculas distintas, digeridas con el mismo enzima de restricción, poseían extremos complementarios (en el ejemplo anterior exponían la secuencia AATT en ambas cadenas). Y entonces era posible volver a juntarlas, a engancharlas, aprovechando dicha complementariedad de secuencias, y sellar las uniones con la correspondiente participación de enzimas ligasas de ADN. Esa innovación técnica, por aquel entonces igualmente revolucionaria, se convirtió en rutina y se popularizó en todos los laboratorios de biología molecular de todo el mundo, pues permitía cortar y empalmar fragmentos de ADN de orígenes distintos, incluso aquellos que no estaban situados consecutivamente en un genoma, para crear moléculas híbridas, pero perfectamente continuas. Las técnicas de ingeniería genética permitían también combinar en una misma molécula de ADN, por ejemplo, en un plásmido (unas moléculas de ADN circular que se encuentran en el interior de las bacterias y suelen aportar funciones esenciales para la supervivencia o resistencia a antibióticos) segmentos de ADN de orígenes muy diferentes, incluso derivados de seres vivos distintos.

Había nacido la ingeniería genética, las técnicas que conocemos como del “ADN recombinante”. En ese nombre estaba incluida la capacidad de combinar fragmentos de ADN distintos en uno solo. Paul Berg fue uno de los investigadores que contribuyó a su desarrollo y quien planteó el reto de digerir el genoma de un virus que es capaz de causar cáncer, llamado SV40, y el de otro virus que infecta a las bacterias, el bacteriófago lambda, con una misma enzima de

restricción, para reunirlos juntos en un mismo plásmido en una bacteria. Este es un experimento hoy habitual, rutinario, perfectamente realizable por cualquier estudiante de un laboratorio de biología molecular, pero ese simple experimento suscitó muchas discusiones y expuso unos riesgos hasta entonces no contemplados. Por primera vez en la historia de la humanidad el ser humano había sido capaz de ensamblar a voluntad fragmentos de ADN de orígenes distintos, de crear secuencias de ADN que la evolución nunca hubiera podido obtener. Esa situación singular que se creó, junto a las múltiples discusiones que afloraron por doquier, provocaron que se planteara la conferencia en Asilomar (California), en 1975, en la que se acordó hablar de todos estos aspectos, de las nuevas técnicas de manipulación genética. Se planteó incluso una posible moratoria, aplicando el principio de precaución, mientras se estudiaban en detalle los posibles peligros asociados a esos nuevos métodos. En Asilomar se acordó seguir investigando, bajo supervisión y estrictos controles, al concienciarse todos los asistentes a aquella reunión de la relevancia de aquellos experimentos pioneros (Berg, 2008). No todo fue negativo. Hay que recordar que una de las primeras aplicaciones de la ingeniería genética en biotecnología fue la obtención de una bacteria capaz de producir insulina humana, tras haberle insertado en un plásmido bacteriano el gen humano que codifica esta hormona. Esta primera bacteria transgénica fue aprobada en 1983 por la FDA y se convirtió en el primer producto terapéutico obtenido gracias al ADN recombinante, derivado de un organismo transgénico. A nadie se le escapaba que una cosa era modificar en el laboratorio unas bacterias para que produjeran insulina, y, otra cosa muy distinta era modificar el ADN de un organismo mucho más complejo, como el de un animal, o el de una persona.

Los primeros animales transgénicos

La modificación genética en animales había empezado igualmente en los años 70, algo frecuentemente olvidado en los libros de texto, gracias al trabajo de un embriólogo alemán emigrado a EE.UU., al laboratorio de Beatrice Mintz en Filadelfia (Jaenisch et al., 1974). Jaenisch fue sin duda el primero en microinyectar embriones de ratón, en el estadio de blastocisto, con ADN del virus SV40, para encontrarlo luego en los tejidos de los animales nacidos tras la gestación de los embriones inyectados. Al año siguiente Jaenisch abordó un experimento similar, infectando embriones de 4 y 8 células de ratón con otro virus, el de la leucemia murina, que también luego encontró en los tejidos de los animales que nacieron de aquellos embriones (Jaenisch et al., 1975). Y finalmente en 1976 constató que este virus, que debe integrarse en el genoma de las células de ratón para perpetuarse, se transmitía a través de la línea germinal, que era capaz de crear estirpes de ratones transgénicos (Jaenisch, 1976). Estos fueron los primeros seres vivos nacidos con su genoma modificado artificialmente.

Lo que los libros de biología suelen recoger es el papel que jugaron dos investigadores norteamericanos, Gordon y Ruddle, en la generación de los primeros animales transgénicos. Sin duda ellos publicaron un trabajo pionero en el que relataban que era posible introducir ADN directamente, mediante microinyección, en embriones de 1 célula de ratón (Gordon et al., 1980). Estos investigadores comprobaron cómo el ADN así introducido era capaz de integrarse en el genoma del ratón, dando lugar a un animal modificado genéticamente, un animal al que denominamos transgénico. Aunque tanto los ratones de Gordon y Ruddle de 1980 como los de Jaenisch de 1976 eran transgénicos, este término no se usaría por vez primera hasta 1982 (Gordon et al., 1982). Ese año contiene uno de los hitos más conocidos de la transgénesis, al que probablemente muchos asocian con los orígenes de la técnica en ratones. Ese fue el año que conocimos unos ratones transgénicos con un tamaño más del doble que el de sus hermanos de camada, que no habían sido modificados genéticamente. La razón estaba en haber incorporado un transgén, con un gen extra de la hormona del crecimiento. Ese experimento se lo debemos a la fructífera colaboración entre un embriólogo, Ralph Brinster, y un biólogo molecular, Richard Palmiter, que fueron quienes desarrollaron, con todo detalle, y describieron todos los pasos de las técnicas de transgénesis en el ratón durante la década de los 80 (Palmiter et al., 1982). Ese ratón más grande de

lo habitual fue elegido para ser portada de la revista *Nature* que publicó aquellos resultados tan sorprendentes. Probablemente esa portada hizo mucho más para dar a conocer las técnicas de transgénesis que cualquier otra publicación realizada hasta entonces en el campo. La visión de dos ratones, hermanos, con tamaños tan dispares resultó muy evidente, para todos. Quedó patente que era posible modificar el genoma de seres vivos y que esa modificación genética conllevara consecuencias funcionales en el animal resultante. Y también volvió a desatar la caja de Pandora, la de los sueños que imaginaban la posibilidad de modificar nuestro genoma. Parecía muy sencillo, prácticamente al alcance de la mano. Si era posible microinyectar ADN en embriones de ratón, un animal mamífero, como los seres humanos, debería ser posible hacer lo propio con embriones humanos. Si era posible obtener un ratón transgénico, debería ser posible obtener un ser humano transgénico.

Sin embargo, en biología pocas veces los resultados corresponden a las expectativas y, en general, cualquier proyecto suele ser mucho más complicado de lo que se anticipa inicialmente. Estos aspectos de la historia de la modificación genética en animales lo he desarrollado en mi libro sobre la historia de las herramientas de edición genética CRISPR (Montoliu, 2021). Hacía falta tener en cuenta la eficiencia del proceso de microinyección de los embriones, estimar cuántos de los embriones inyectados acababan dando lugar a ratones transgénicos. Lo que sabíamos entonces (y sigue siendo cierto hoy en día) es que en un laboratorio experto en estas técnicas, los ratones transgénicos se podían generar con una eficiencia de aproximadamente del 5% (Palmiter et al., 1986). De cada 100 embriones de ratón microinyectados solamente 5 incorporaban con éxito el ADN microinyectado y eran reconocidos como transgénicos al nacer y analizarlos. Esta es una eficiencia muy baja, que imposibilita su traslado científico para un experimento análogo en seres humanos. Sería éticamente impensable trasladar estas eficiencias de ratones a humanos, suponiendo que las eficiencias se mantuvieran en valores similares con embriones de otras especies. Lo cual, como ya sabemos, no es del todo cierto. En vacas, también mamíferos, la eficiencia de obtención de vacas transgénicas mediante microinyección es diez veces inferior, del 0.5%. Con esta eficiencia paupérrima apenas se puede esperar obtener 1 vaca transgénica de cada 200 embriones microinyectados.

Los desarrollos tecnológicos e innovaciones que se describen en una especie no necesariamente pueden implementarse de la misma manera en otras especies. Este es el caso, por ejemplo, de la transgénesis mediante microinyección en embriones. De las sospechas, temores o esperanzas, según las opiniones de cada cual, de poder trasladar los éxitos en ratones a los humanos da buena cuenta el recordar que pasaron más de 20 años para que aquellos experimentos pioneros realizados en ratón se pudieran repetir en especies bastante más parecidas a nosotros. El primer primate no humano transgénico nacido mediante microinyección de embriones no se reportó hasta el año 2001, con una eficiencia inferior a la descrita para ratones, del 2.5% (Chan et al., 2001). Y, que se sepa, este experimento nunca se ha planteado en seres humanos, afortunadamente. Sería altamente irresponsable, a la par que éticamente cuestionable, el abordar un experimento similar en humanos con tal eficiencia, dejando aparte los riesgos asociados a la técnica (por ejemplo, de mutagénesis por inserción del transgén) y los inherentes dilemas éticos que suscitaría tal experimento.

A principios de los años 80, a la par que se describían las técnicas básicas de modificación genética en ratones, también se aislaron por primera vez las células embrionarias pluripotentes en blastocistos de ratón, las mal llamadas en español "células madre" embrionarias y conocidas universalmente como células ES (del inglés *embryonic stem cells*) (Evans et al., 1981). Las dos características fundamentales de la troncalidad de estas células ES son: (1) su capacidad de duplicarse y mantenerse indefinidamente sin perder sus rasgos de células troncales, y (2) su capacidad para convertirse, mediante un proceso de diferenciación celular, a cualquiera de los más de doscientos tipos celulares que existen en el cuerpo de un mamífero. Fue gracias, a la participación de estas células ES, combinada con los conocimientos de recombinación homóloga y la perspicacia de unos investigadores, genetistas con talento, como se logró producir en 1987 los primeros ratones mutantes (universalmente conocidos por su nombre en inglés, *knockout*), con mutaciones específicas, con un

gen seleccionado e inactivado a voluntad (Doetschman et al., 1987). Este fue probablemente uno de los avances más espectaculares e influyentes, durante los siguientes 25 años, para la obtención de miles de ratones *knockout* de prácticamente todos los genes de su genoma. Este hito tecnológico llevó a Martin Evans, Mario Capecchi y Oliver Smithies, los tres investigadores detrás de la tecnología de obtención de ratones *knockout* a través de las células ES, a ganar, muy merecidamente, el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 20 años después, en 2007.

La clonación de animales

Tuvieron que pasar muchos años hasta que estas células troncales embrionarias pluripotentes, análogas a las aisladas de embriones de ratón, se describieran en humanos. Esto ocurrió en 1998 (Thomson et al., 1998), apenas un año después de que conociéramos la oveja Dolly, el primer mamífero clonado a partir de células adultas (Wilmut et al., 1997). La fusión de estas dos nuevas técnicas (células troncales humanas y clonación) encendió muchas expectativas terapéuticas y catapultó el lanzamiento de una nueva disciplina: la medicina regenerativa, de la cual, pasados los años, no se han obtenido los réditos que se anticipaban.

De nuevo los sueños y la imaginación. Si era posible clonar una oveja, debería ser posible clonar un ser humano. Tan solo haría falta vaciar de material genético un óvulo humano e introducirle un núcleo de cualquier célula somática de la persona que se deseara clonar para, tras implantar ese embrión manipulado, que naciera esa persona clonada, como Dolly. Además, la imaginación, que todo lo puede, servía para especular sobre la posibilidad de introducir modificaciones genéticas durante el proceso, como por ejemplo si el núcleo de las células somáticas utilizadas fuera el de un cultivo de células ya previamente modificadas genéticamente. También se especuló sobremanera sobre la posibilidad de clonar embriones humanos a partir de células de pacientes, afectados de alguna enfermedad de base genética, para que sus mutaciones en el genoma pudieran ser corregidas en el laboratorio, y posteriormente convertidas (diferenciadas) al tejido que debiera ser reparado (músculo, neuronas, retina, páncreas, etc.) antes de ser eventualmente utilizadas para substituir las células afectadas en el paciente original. Era la llamada clonación terapéutica, una nueva posibilidad, teórica por lo menos, para modificar el genoma humano.

Sin embargo, hay que decir claramente que nada de todo eso sucedió. Las dificultades científicas y técnicas del método de transferencia nuclear, y los innegables dilemas éticos que planteaba la utilización (y por lo tanto la destrucción) de embriones humanos fueron obstáculos insuperables y las propuestas de clonación humana, o de clonación terapéutica en humanos, fueron paulatinamente desapareciendo de los titulares de prensa hasta prácticamente desaparecer hoy en día. Un ejemplo que ilustra la complejidad técnica que supone saltar de la oveja a los seres humanos lo descubrimos 21 años después de descubrir a Dolly, cuando se aplicó, con éxito, la misma técnica de clonación en primates no humanos. La excitación que produjo descubrir el nacimiento de los primeros macacos clonados quedaba nuevamente desinflada al constatar que la eficiencia de obtención de esos macacos clonados apenas había variado de la que se observó al obtener a Dolly, aproximadamente un 1,5%. Este era un valor académicamente asumible para modelos animales, pero imposible de transferir a los seres humanos, por los consiguientes retos tecnológicos y desafíos éticos que suscitaba el experimento (Liu et al., 2018).

Diez años después del nacimiento de Dolly (la oveja Dolly nació en 1996, aunque sus resultados no se publicaron hasta febrero de 1997) unos investigadores japoneses describieron un nuevo tipo de células troncales pluripotentes, inducibles, (denominadas iPS, del inglés *induced Pluripotent Stem cells*), que sorprendentemente podían obtenerse a partir de cualquier célula somática mediante una simple reprogramación nuclear, promoviendo la expresión de apenas cuatro genes, y sin necesidad de usar ni destruir ningún embrión humano. Obviamente estas células resultaron muy atractivas en medicina regenerativa, y el campo floreció durante unos cuantos años más. Sin embargo, hay que aceptar

que las células iPS nunca confirmaron las expectativas terapéuticas que se había anunciado, aunque sí acabaron convirtiéndose en un sofisticado pero muy útil sistema de generación de modelos celulares para investigar enfermedades (Takahashi et al., 2006). En 2012, Shinya Yamanaka, el descubridor de las células iPS, y John Gurdon, embriólogo británico quien primero había clonado ranas en los años 60, recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por sus descubrimientos en la tecnología de reprogramación celular. Significativamente, el equipo escocés que generó la oveja Dolly se quedó fuera del premio, aunque el cúmulo de circunstancias negativas que rodearon el nacimiento de Dolly y los acontecimientos de los años posteriores en el Instituto Roslin de Edimburgo seguramente tuvieron mucho que ver en todo ello (Montoliu, 2017).

Las limitaciones técnicas, fundamentalmente, y, en menor medida, las restricciones éticas hicieron que los temores expresados desde Asilomar en 1975 no se convirtieran en realidad. Eran esencialmente especulaciones y discusiones de salón difícilmente transportables a la práctica, en seres humanos. Eran científicamente inabordables y éticamente injustificables. La modificación genética de seres humanos, que había aparecido desde los albores de la tecnología de ADN recombinante, seguía siendo territorio de la ciencia ficción, más que de la realidad.

La revolución de las herramientas de edición genética CRISPR

En el verano del año 2012 el panorama cambió diametralmente. Una publicación aparecida en la revista científica *Science* resultado de la colaboración entre dos laboratorios dirigidos por dos investigadoras, la microbióloga francesa Emmanuelle Charpentier y la bioquímica norteamericana Jennifer Doudna, propuso un nuevo método para modificar el genoma de cualquier organismo, un método disruptivo que cambió irreversiblemente el devenir de la biología y de las disciplinas relacionadas (Jinek et al., 2012). Estas investigadoras propusieron usar el sistema CRISPR-Cas (Mojica et al., 2016) (CRISPR es el acrónimo en inglés de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, y Cas es el acrónimo en inglés de *CRISPR-associated proteins*) para editar genes, el mismo sistema que usan los procariotas para defenderse de los virus que los infectan, y que había sido descrito originalmente por Francis Mojica, un microbiólogo español de la Universidad de Alicante (Mojica et al., 2005).

La publicación de Charpentier y Doudna en *Science* de 2012 describió los componentes de uno de estos sistemas de defensa de bacterias CRISPR-Cas, derivado de la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*. El sistema era muy sencillo, y a la vez extraordinariamente versátil. Estaba formado por esencialmente una nucleasa, Cas9, capaz de digerir las dos cadenas del ADN, y una pequeña molécula de ARN que actuaba como guía para dirigir el corte de la nucleasa en el gen de cualquier organismo, incluido el genoma humano, que se deseara modificar.

La propuesta rompedora de Charpentier y Doudna no se llevó a la práctica hasta unos meses después. En enero de 2013 aparecieron sendos estudios de los laboratorios dirigidos por Feng Zhang y George Church, demostrando que era posible editar genes en células de mamífero, humanas y de ratón, en cultivo (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). La perspicacia de Charpentier y Doudna, al anticipar la potencialidad y versatilidad de los sistemas CRISPR-Cas como método para promover la edición genómica, les valió obtener, mercedamente, el Premio Nobel de Química en 2020.

A nadie se le escapó que estos estudios de Zhang y Church eran los primeros en los cuales se demostraba, fehacientemente, y por vez primera, la modificación a voluntad del genoma humano. La alteración del genoma humano había dejado de ser una quimera, abandonando los espacios especulativos de la ciencia ficción para convertirse en una realidad. Podemos decir, sin temor a equivocarnos, que entre 1975 y 2012 la modificación del genoma humano estuvo en el terreno de lo especulativo, de la imaginación de los investigadores. Sin embargo, el cambio substancial se produjo en 2013, dando paso a una nueva era en la cual ya es posible modificar el genoma de cualquier ser vivo, incluidos los seres humanos.

La edición genética promovida por las herramientas CRISPR suscita la reparación del ADN cortado por la nucleasa Cas9, a través de los mecanismos endógenos celulares. Y es precisamente durante esa reparación del corte cuando se establecen las alteraciones genéticas, bien producto de la reparación de emergencia que ocurre por defecto en todas nuestras células, añadiendo y quitando nucleótidos al azar (INDEL), y que suele incorporar errores en el proceso, bien promoviendo la reparación a partir de un ADN molde que se aporta al sistema para dictar la secuencia que se pretende obtener. Con los sistemas CRISPR se puede mutar, corregir, editar, eliminar, añadir, substituir, marcar, activar o silenciar un gen, de cualquier organismo vivo.

Desde 2013 estas herramientas CRISPR ya son una realidad en los laboratorios, donde su uso se ha extendido universalmente. También es habitual ya su uso en aplicaciones en biología y biotecnología, en plantas y animales editados genéticamente. Sin embargo, su traslación a la clínica no ha seguido el mismo éxito, por diversas razones, relacionadas con las limitaciones que también tienen estos sistemas CRISPR (Doudna, 2020). La posibilidad de cortar secuencias parecidas y parcialmente complementarias a la guía de ARN suscita los riesgos de acabar editando, y por lo tanto modificando, genes no deseados. Son los llamados efectos *off-target*, que pueden combatirse con mejores algoritmos bioinformáticos en el diseño y selección de las guías ARN. Por otro lado, la indeterminación en la resolución del corte, al repararlo de muchas posibles maneras genera incertidumbre, ruido genético. Este inconveniente y fuente de variación adicional puede gestionarse bien en entornos académicos, seleccionando y amplificando (por ejemplo, mediante cruces sucesivos) lo que nos interesa, incluso si aparece con una eficiencia muy baja, y descartando lo que no nos interesa (Seruggia et al., 2015). Pero estas situaciones no son prudentes ni éticamente abordables cuando pensamos en pacientes humanos.

La modificación genética de embriones humanos

El año 2013 fue el de la explosión de primeras veces en las que se aplicaban las herramientas CRISPR-Cas para la edición genética en muchas especies habituales de laboratorio (ratones, ratas, peces cebras...) (Seruggia et al., 2014), y comenzó a sospecharse que su aplicación en la especie humana, más concretamente en embriones humanos, sería cuestión de tiempo. Y así fue como llegó el primer uso conocido de estas herramientas CRISPR-Cas en embriones humanos en 2015, por parte de unos investigadores chinos de Guangzhou, que utilizaron embriones tripnucleares (con tres pronúcleos, una anomalía relativamente habitual en fecundaciones in vitro, producto de una fecundación doble por dos espermatozoides sobre un solo óvulo), que son inservibles y normalmente se descartan, pues no logran progresar ni implantarse (Liang et al., 2015). Precisamente el haber seleccionado estos embriones humanos triploides sugería una reflexión ética por parte de los investigadores, pues con ello alejaban cualquier tentación de implantación de los embriones editados y, por lo tanto, cualquier posible nacimiento de bebés editados. Sin embargo, y a pesar de todas las precauciones y permisos éticos que obtuvieron aquellos investigadores chinos el experimento desató una enorme polémica. *Sensu stricto* era la primera vez que se lograba modificar el genoma de un embrión humano. Por mi parte creo que ese artículo científico fue tratado injustamente, en realidad fue una aportación necesaria para ampliar nuestro conocimiento de las posibilidades y limitaciones de las herramientas CRISPR-Cas sobre seres humanos.

En cierta manera lo que descubrieron estos investigadores pioneros de la edición genética en embriones humanos fue lo que otros habíamos encontrado al usar las herramientas CRISPR-Cas en embriones de otras especies de mamíferos, como por ejemplo los ratones. Es decir, el mosaicismo genético antes comentado, producto de la incertidumbre en la resolución de los cortes propiciados por la nucleasa Cas9, y posibles modificaciones en otras secuencias similares del genoma, debido a la relativa falta de especificidad tanto de la guía ARN como de la nucleasa. No iban a ser distintos los embriones humanos frente a los de otras especies. Pero por la misma razón, la variabilidad e inespecificidad de los resultados que podían gestionarse bien en el mundo académico suponían de nuevo un problema insalvable en

embriones humanos, si lo que se pretendía es su uso en terapias génicas avanzadas. En conjunto, estos primeros resultados, y los que siguieron a continuación de otros laboratorios en China, recomendaban nuevamente prudencia y cautela antes de plantear la utilización terapéutica de estas técnicas CRISPR en embriones humanos.

Más allá de los problemas científico-técnicos y éticos estos experimentos de edición genética sobre embriones humanos suscitaban problemas legales en países como España, signatarios del Convenio de Asturias de 1997, donde quedaba prohibida la modificación del genoma de la descendencia. Aunque en nuestro país la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, permiten, en determinadas condiciones, la experimentación con embriones humanos procedentes de fecundación *in vitro* que hayan sido destinados a investigación, con la aprobación de los progenitores y la autorización de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA), siempre y cuando no se destinen a fines reproductivos. Es decir, siempre y cuando no se implanten para su gestación.

La utilidad de los experimentos de edición genética *in vitro* con embriones humanos quedó demostrada por un equipo británico dirigido por la investigadora Kathy Niakan, del Centro Crick de Londres, al encontrar diferencias significativas en la fase de desarrollo preimplantacional, al inactivar un mismo gen en embriones de ratón o humanos (Fogarty et al., 2017). Experimentos similares a los descritos por Niakan han sido autorizados recientemente en España, por parte de los investigadores Anna Veiga, Angel Raya y Montse Boada, del Instituto IDIBELL y la clínica Dexeus Dona, de Barcelona.

Los defensores de estas tecnologías planteaban que, con la edición genética sobre embriones humanos con fines terapéuticos, sería posible corregir mutaciones asociadas a enfermedades congénitas graves que afectarían a los bebés y a lo largo de su vida. Pero los contrarios al uso de las técnicas señalaban las incertidumbres técnicas, los dilemas éticos e impedimentos legales que tales estrategias suscitaban. Conviene recordar que la utilización de métodos alternativos (como el diagnóstico genético preimplantacional, DGP) puede, en la mayoría de los casos, servir para seleccionar embriones no portadores de las mutaciones que se quieren evitar, que son finalmente implantados para su gestación. Y este procedimiento, que no está exento de riesgos, sigue siendo mucho más seguro, actualmente, que cualquier intento de corregir una mutación genética mediante CRISPR-Cas en embriones humanos.

En agosto de 2017 se publicó un nuevo artículo con edición genética en embriones humanos usando las herramientas CRISPR-Cas. El experimento, realizado en EE.UU y en Corea del Sur, generó embriones humanos con fines de investigación (algo prohibido en nuestra legislación) usando esperma de un varón portador de una mutación dominante en un gen que causa cardiomiopatía congénita, y lo usaron *in vitro* para fecundar óvulos obtenidos de mujeres sanas (Ma et al., 2017). Los embriones obtenidos se editaron genéticamente con CRISPR-Cas y, tras ser analizados (ningún embrión fue implantado, todos fueron destruidos para ser analizados), los autores encontraron un porcentaje significativo de correcciones génicas. Aquellos resultados fueron muy polémicos, en particular porque diversos grupos encontraron que tras el corte producido por Cas9 podían producirse deleciones que afectaban a centenares o miles de nucleótidos en ambas direcciones desde el corte (Kosicki et al., 2018). Es decir, podían desaparecer secuencias que dejaban de ser detectadas por el test analítico (una simple PCR) y solamente amplificaban el genoma materno, derivado de mujeres sanas y, por lo tanto, sin la mutación, sugiriendo un éxito de terapia génica que, muy probablemente nunca ocurrió.

Existen por lo menos dos tipos de aplicaciones de las herramientas CRISPR-Cas sobre seres humanos: las que tienen que ver con la salud, para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad, globalmente denominadas como usos "terapéuticos", y las que tienen que ver con la adquisición o modificación de capacidades físicas o psíquicas, que generalmente consideramos como aplicaciones de "mejora" (un eufemismo de la eugenesia que ocultan estas propuestas). Para las primeras hay un acuerdo muy mayoritario en desarrollarlas, mientras que las segundas son las

que suscitan más temores, dudas y rechazos entre la comunidad científica.

Si nos fijamos en las aplicaciones terapéuticas, la técnica más solicitada es la terapia génica, de la cual de nuevo puede producirse de dos maneras: germinal y somática. La primera involucra a gametos o embriones de un individuo no nacido, suscita dilemas éticos y está prohibida en todos aquellos países que firmaron el Convenio de Asturias de 1997. La segunda, habitualmente aceptada en prácticamente todos los países, se aplica sobre las células de la persona afectada a través de dos estrategias: in vivo y ex vivo, según la intervención terapéutica se realice directamente sobre el paciente o sobre células previamente extraídas del paciente, para ser modificadas en el laboratorio y posteriormente ser retornadas al mismo paciente, respectivamente.

A pesar del rechazo que generan las aplicaciones de mejora (genética) existe un debate abierto en la sociedad, especialmente motivado por los seguidores de la corriente filosófica del transhumanismo (Diéguez, 2017). Este movimiento cultural e intelectual internacional persigue transformar la condición humana mediante la aplicación de las tecnologías más novedosas, con objeto de mejorar las capacidades humanas, tanto físicas como psicológicas. Adicionalmente, promueve el uso de estas nuevas tecnologías, con independencia de que se obtengan o no los permisos de parte de las autoridades. Hay investigadores como George Church, de la Universidad de Harvard, pionero en el uso de CRISPR en células humanas, que mantiene en la página web de su laboratorio un listado de alteraciones genéticas que permitirían a las personas adquirir o mejorar capacidades. Por ejemplo, la mutación en el gen de la miostatina (MSTN), un represor de la proliferación muscular, provocaría un aumento en el desarrollo de la masa muscular (como de hecho ya se observa en la naturaleza, en muchas especies animales, en las que aparece esta mutación espontáneamente generando animales hipermusculados, cuya carne es muy apreciada). O como por ejemplo la mutación en el gen CCR5 que codifica una proteína de membrana que usa el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, causante del SIDA) para entrar en los linfocitos de la sangre. Una mutación en este gen supuestamente prevendría la infección vírica, como de hecho ya sucede en algunas personas que espontáneamente tienen una mutación en este gen.

El problema fundamental de todas estas propuestas de mejora es su simplificación, al asumir que cada gen solamente realiza una función, cuando en realidad sabemos que cada uno de nuestros genes es capaz de involucrarse en múltiples procesos, y eso es una ventaja evolutiva que conocemos como pleiotropía. Naturalmente, esto quiere decir que al mutar un gen no solamente vamos a alterar la función que nosotros queremos modificar, sino muchas otras, habitualmente desconocidas, de consecuencias imprevisibles. Las mutaciones en el gen CCR5 no solo bloquean la entrada del VIH en nuestros glóbulos blancos, sino que pueden potenciar la infección por otros virus, como el de la gripe o el virus del Nilo, que se tornarán más peligrosos para nosotros. La función del receptor CCR5 no es la de ser puerta de entrada del virus VIH en los linfocitos. Es el virus VIH el que ha evolucionado para aprovechar un receptor preexistente en la célula para usarlo como rampa de acceso. Lo mismo ocurre con el coronavirus SARS-CoV-2, causante de la pandemia COVID-19, que accede al interior de las células epiteliales del pulmón a través del receptor ACE2, cuyas funciones tienen que ver con la regulación de la presión sanguínea, entre otros parámetros.

Es por lo tanto imprudente y peligroso promover la mutación de genes específicos en seres humanos esperando que solamente las características deseables sean las que se manifiesten. Por eso son temerarios los movimientos transhumanistas radicales, como son los promovidos por biopiratas (*biohackers*), que reclaman poder utilizar las herramientas de edición genética CRISPR-Cas sobre sí mismos (algo que no está regulado por la ley, mientras no resulten afectados terceros ni suscite un problema de salud pública, pero algo que está abiertamente desaconsejado y alertado por las autoridades) o sobre terceros (algo que sí está regulado por la ley, y, por lo tanto, cualquier intento de administrar un medicamento o tratamiento no autorizado será perseguido por la justicia).

El debate sobre terapia o mejora sobre embriones humanos llegó a su punto álgido en noviembre de 2018, cuando

descubrimos que un investigador chino, He Jiankui, había editado genéticamente embriones humanos con las herramientas CRISPR-Cas, para incorporar mutaciones en el gen CCR5 y generar niños insensibles a la infección por el virus VIH. Dichos embriones habían sido implantados en al menos dos mujeres y habían dado lugar, primero a dos gemelas, y posteriormente a otra niña. Un total de tres niñas, los primeros tres seres humanos con su genoma editado. Los primeros seres humanos con alteraciones adicionales en otros genes y modificaciones no esperadas en el gen diana, como se pudo comprobar analizando los datos de este experimento irresponsable que nunca debió ocurrir.

Este experimento que tantas veces había sido anticipado y temido finalmente había sucedido gracias a la tecnología CRISPR. Se había modificado el genoma humano de forma irreversible. Muchos debates y discusiones siguieron a la noticia de los experimentos de He Jiankui. Incluso se debatió sobre la oportunidad de publicar o no dicho estudio, por rechazable que fuera, habida cuenta que ya se había realizado. La opinión general de la comunidad investigadora fue no publicarlo, al tratarse de un estudio con graves deficiencias metodológicas, con fuertes sospechas de que los permisos éticos habían sido manipulados, y claramente realizado fuera de la legislación vigente, también en China (Baylis, 2020).

El investigador He Jiankui y dos de sus colaboradores fueron finalmente condenados a finales de 2019, con penas económicas, de cárcel e inhabilitados profesionalmente de por vida. Se les condenó por ejercer como médicos sin serlo, lo único que se les pudo aplicar, al carecer el código penal chino entonces de artículos que regularan la modificación genética de descendientes, algo que solamente estaba en forma de recomendaciones médicas. Hoy en día el código penal chino ya contempla los delitos de modificación genética de la descendencia, que ha quedado prohibida, como ya existen en los códigos penales de diversos países, como España.

Es inquietante también señalar que el experimento propuesto por He Jiankui no era una aplicación terapéutica de CRISPR-Cas, puesto que los embriones estaban sanos, sino una aplicación de mejora genética, para trasladar a estos niños cualidades adicionales, pretendidamente protectoras frente a la infección por el virus VIH.

Estudios posteriores realizados nuevamente sobre embriones humanos derivados de clínicas de reproducción asistida confirmaron la gran cantidad de anomalías y alteraciones genómicas no deseadas que se acumulan tras exponer dichos embriones a las herramientas CRISPR-Cas: inserciones, deleciones, inversiones, traslocaciones, etc., que pueden llegar a involucrar otras regiones genómicas distintas del sitio planeado de corte por la nucleasa Cas9 (Ledford et al., 2020). Estos resultados, y otros parecidos, nuevamente apuntan a que la tecnología CRISPR todavía no está lista para su uso sobre embriones humanos y está abiertamente desaconsejada, al ser imprudente e imprevisible, además de éticamente cuestionable e ilegal en muchos países.

En septiembre de 2020, la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU., junto con la Academia Nacional de Medicina de EE.UU. y la *Royal Society* británica, lanzaron un nuevo informe sobre la edición genética germinal en humanos, actualizando los contenidos de un informe anterior, de 2017. Estos informes especifican bajo qué supuestos y en que estrictas condiciones podría plantearse el uso de las herramientas CRISPR-Cas de edición genética en embriones con fines terapéuticos. La lista de condiciones es obviamente muy extensa, lo que hace actualmente imposible y abiertamente desaconsejable intentar abordar tales experimentos. También se discute la posibilidad de usar estas técnicas con fines no terapéuticos, de mejora, siempre y cuando sus consecuencias no aumenten la desigualdad entre los seres humanos, una puerta abierta en mi opinión demasiado peligrosa a la luz de las limitaciones científico-técnicas, además de éticas y legales, que todavía subsisten en la actualidad (Angrist et al., 2020).

La edición genética en biomedicina: situación actual y perspectivas clínicas

Más allá de los problemas suscitados por un experimento irresponsable de mejora genética germinal lo cierto es que

las herramientas CRISPR-Cas de edición génica han ido progresivamente tomando posiciones entre los ensayos clínicos sobre voluntarios humanos, para el tratamiento de diversas patologías. En la actualidad (agosto de 2021) hay aproximadamente 47 ensayos de este tipo en marcha, en su gran mayoría *ex vivo*, explorando los usos de estas nuevas técnicas en inmunoterapia del cáncer o en el tratamiento experimental de algunas enfermedades graves de la sangre, como la anemia falciforme o la beta-talasemia, cuyos pacientes requieren de transfusiones constantes para sobrevivir. Mayoritariamente estos ensayos son *ex vivo* dado que permiten seleccionar el material celular que va a retornarse al paciente, ofreciendo algún control al investigador. Por el contrario, los ensayos *in vivo*, que los hay, aunque muchos menos, son más arriesgados. Al administrar los reactivos CRISPR-Cas a los pacientes se pierde prácticamente el control de lo que pueda suceder.

Dos de los ensayos clínicos *in vivo* más avanzados con CRISPR están diseñados para tratar un tipo de ceguera progresiva y una enfermedad rara por deposición de proteína de consecuencias fatales. La primera estrategia, lanzada en diciembre de 2018, plantea eliminar una mutación en el gen *CEP290* que causa su procesamiento anómalo y causa una ceguera degenerativa, progresiva, llamada amaurosis congénita de Leber de tipo 10. En este caso, a pesar de ser una estrategia de terapia génica *in vivo*, la aproximación terapéutica aprovecha las características singulares del ojo. Como proyección cerebral, el ojo es un órgano aislado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica e inmunológicamente privilegiado. Por eso las inyecciones intraoculares y subretinales para depositar los vectores virales (virus adeno-asociados, AAV) que portan los reactivos CRISPR-Cas no conlleva peligro de que salgan al resto del cuerpo. Se trata igualmente de un uso compasivo, dado que estos pacientes van a perder la visión indefectiblemente. Las inyecciones se realizan unilateralmente, solo en uno de los ojos. Estos experimentos en pacientes, promovidos por las empresas Editas Medicine y Allergan, están sustentados por los buenos resultados preclínicos obtenidos con edición génica usando herramientas CRISPR-Cas previamente en modelos celulares (Ruan et al., 2017) y en modelos animales, usando ratones portadores de mutaciones equivalentes en el gen *Cep290* (Maeder et al., 2019).

El segundo ensayo clínico de edición génica, promovido por las empresas Intellia Therapeutics y Regeneron, está encaminado a tratar personas afectadas por la enfermedad rara llamada amiloidosis transtiretina (ATTR), producida por la acumulación anómala de la proteína TTR, encargada del transporte de la hormona tiroxina y la vitamina A. La propuesta en este caso es una administración sistémica (a través de la sangre) de los reactivos CRISPR-Cas, en forma de ARN, usando nanopartículas lipídicas (muy similares a las usadas por las empresas Moderna y Pfizer/BioNtech para sus respectivas vacunas contra la COVID-19) que ya han sido probadas con éxito previamente en modelos animales (ratones) de la misma enfermedad, en los que se constató que una sola dosis era suficiente para revertir la patología (Finn et al., 2018). En este caso, los reactivos CRISPR van encaminados a inactivar la expresión del gen *TTR*, para evitar la acumulación de la proteína codificada. Los resultados preliminares recientemente publicados, con primates no humanos (macacos) y con un número limitado de pacientes confirman que una única administración es capaz de reducir la acumulación de la proteína TTR (Gillmore et al., 2021).

En cuanto a los experimentos de terapia génica con herramientas CRISPR-Cas *ex vivo* en su mayoría van encaminados a tratamientos de inmunoterapia del cáncer, en especial para tratar cánceres refractarios, agresivos, resistentes a quimioterapia y radioterapia, en pacientes desahuciados de melanoma, mieloma o sarcoma. En febrero de 2020 se publicaron los primeros resultados de la fase I de un ensayo clínico, realizado sobre un número limitado de pacientes, en los que se evaluó la seguridad del proceso, inactivando mediante CRISPR-Cas el gen *PD1* en linfocitos T de estos pacientes, un represor de la respuesta inmunitaria, entre otras modificaciones genéticas (Stadtmauer et al., 2020).

El mayor éxito clínico, hasta el momento, de las terapias génicas con CRISPR-Cas se ha conseguido en el tratamiento de dos enfermedades graves de la sangre: anemia falciforme y beta-talasemia. En ambos casos la molécula afectada es la hemoglobina, formada por dos cadenas, alfa y beta, codificadas por genes distintos. Habitualmente el gen beta es el que acumula las mutaciones y esto revierte en una hemoglobina con menor capacidad de transportar oxígeno desde el

pulmón al resto del cuerpo. El laboratorio de Stuart Orkin, en el Boston's Children Research Hospital, descubrió hace años que el gen fetal (gamma) de la globina, normalmente inactivo en la vida adulta, se mantiene silenciado debido a la existencia de un represor, BCL11A (Sankaran et al., 2008). Se hipotetizó que la inactivación del represor BCL11A podría reactivar la expresión del gen fetal de la globina en adultos, supliendo la función deficiente del gen beta-globina mutado. Sin embargo, la inactivación completa del gen BCL11A no era posible, al ser necesario para otras funciones en el desarrollo de los linajes hematopoyéticos (un ejemplo de pleiotropía génica).

Diez años después el mismo laboratorio demostró que la eliminación de una secuencia reguladora del promotor del gen *BCL11A* reducía significativamente su expresión, sin eliminarla del todo, suficiente para que la acción represora sobre el gen gamma globina dejara de ser efectiva (Liu et al., 2018). Ante estas evidencias preclínicas se lanzó un ensayo clínico en 2019 y una de las primeras pacientes tratadas, afectada de anemia falciforme, fue tratada con CRISPR-Cas9 para reducir la expresión del gen *BCL11A* y reactivar la expresión de la globina fetal. El experimento fue un éxito y, un año y medio después se han publicado resultados que demuestran como la expresión de gamma globina, intacta, ha substituido progresivamente a la beta globina mutada. El éxito permite a estos pacientes vivir sin estar pendientes de las transfusiones de sangre periódicas que necesitaban para sobrevivir (Frangoul et al., 2021).

Es importante darse cuenta de que las aplicaciones actuales de las herramientas CRISPR-Cas que han triunfado, de momento, en la clínica no son las que se proyectaban y exponían inicialmente, las que generaban mayores expectativas. Todos imaginábamos el uso de CRISPR-Cas para promover el reemplazo de las secuencias incorrectas (mutadas) de un gen por sus correspondientes secuencias intactas, de referencia. Sin embargo, estas estrategias requieren de recombinación homóloga y este es un procedimiento que controlamos muy poco y propenso a fallar, con eficiencias incompatibles con su uso clínico.

Por el contrario, las herramientas CRISPR-Cas son muy útiles para inactivar genes, puesto que esta es su función ancestral, cortar el genoma de los virus invasores. Y, para ello, no se necesitan otras proteínas celulares (como sí es el caso para la recombinación homóloga). Esto quizás explique por qué la inmensa mayoría de aplicaciones CRISPR biomédicas proyectadas y en estudio tengan por objeto inactivar genes, para beneficiarse de sus consecuencias terapéuticas. Adicionalmente esta aproximación tiene sus ventajas, dado que la incertidumbre asociada no afecta al resultado del proyecto, dado que se pretende silenciar el gen, de una manera u otra. Controlando y reduciendo al mínimo los efectos *off-target* es probable que los primeros tratamientos CRISPR-Cas sean de inactivación génica.

¿Qué hay entonces de la posibilidad de substituir secuencias si la vía mediante recombinación homóloga no parece demasiado prometedora? La respuesta está en unas nuevas variantes de las herramientas CRISPR-Cas, los llamados editores de bases, desarrollados por David Liu, del Instituto BROAD de Boston. En este caso se usa una variante Cas9 llamada nikasa que puede cortar una, pero no las dos hebras del ADN, asociada a una actividad deaminasa, capaz de promover el cambio químico de las bases nitrogenadas de los nucleótidos de A a G y de C a T (dos deaminasas diferentes). Se han generado muchas versiones de los editores de bases, cada vez más específicos y menos propensos a actividades *off-target* (Anzalone et al., 2020). En el año 2021 ya hemos conocido resultados espectaculares en experimentos pre-clínicos realizados sobre modelos animales (ratones y macacos), tratados con editores de bases, para el tratamiento de la progeria (Koblan et al., 2021) y de la hipercolesterolemia (Musunuru et al., 2021). Los buenos resultados obtenidos auguran el salto próximo de los editores de bases a los *ensayos clínicos con voluntarios*.

La modificación genética del genoma humano, imaginada desde los años 70 del siglo pasado, finalmente se ha conseguido gracias a la revolución tecnológica propiciada por las herramientas CRISPR-Cas de edición genética, cuya aplicación en células humanas empezó en 2013. Queda mucho todavía por aprender, investigar y hacer. En particular queda mejorar la eficiencia e incertidumbre aún asociadas a la edición genética con las herramientas CRISPR-Cas para seguir explorando su uso potencial para corregir secuencias genéticas. Y, por supuesto, queda todo para desarrollar

normativas que regulen todas estas aplicaciones de edición genética, y que impidan que otros investigadores realicen experimentos irresponsables tales como los realizados por He Jiankui en cualquier lugar del mundo, sin ningún tipo de control, aprobación y monitorización. El universo CRISPR-Cas es un sistema en continua optimización, lo que es cierto hoy puede ya no serlo mañana. La que se presenta como nueva o última variante CRISPR rápidamente se convierte en obsoleta y deja paso a nuevas variantes. Es importante mantenerse al día en este campo tan voluble, y a la vez tan apasionante.

Bibliografía

- ANGRIST, M., BARRANGOU, R., BAYLIS, F., BROKOWSKI, C., BURGIO, G., CAPLAN, A., CHAPMAN, C.R., CHURCH, G.M., COOK-DEEGAN, R., Cwik, B., DOUDNA, J.A., EVANS, J.H., GREELY, H.T., HERCHER, L., HURLBUT, J.B., HYNES, R.O., ISHII, T., KIANI, S., LEE, L.H., ... DAVIES, K. (2020). Reactions to the National Academies/Royal Society Report on Heritable Human Genome Editing. *The CRISPR Journal*, 3(5), 332–349.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2020.29106.man>
- ANZALONE, A.V., KOBLAN, L.W. Y LIU, D.R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 38(7), 824–844.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>
- BAYLIS, F. (2020) To publish or not to publish. *Nat Biotechno*, 38(3), 271.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0435-1>
- BERG, P. (2008). Asilomar 1975: DNA modification secured. *Nature*, 455, 290–291.
<https://doi.org/10.1038/455290a>
- CHAN, A.W.S., CHONG, K.Y., MARTINOVICH, C., SIMERLY, C. Y SCHATTEN, G. (2001). Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 291(5502), 309–312.
<https://doi.org/10.1126/science.291.5502.309>
- CONG, L., RAN, F.A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P.D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L.A. Y ZHANG, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823.
<https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- DIÉGUEZ, A. (2017). *Transhumanismo. La búsqueda tecnológica del mejoramiento humano*. Herder Editorial.
- DOETSCHMAN, T., GREGG, R.G., MAEDA, N., HOOPER, M.L., MELTON, D.W., THOMPSON, S. Y SMITHIES, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 330(6148), 576–578.
<https://doi.org/10.1038/330576a0>
- DOUDNA, J.A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 578(7794), 229–236.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
- EVANS, M.J. Y KAUFMAN, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.
<https://doi.org/10.1038/292154a0>
- FINN, J.D., SMITH, A.R., PATEL, M.C., SHAW, L., YOUNISS, M.R., VAN HETEREN, J., DIRSTINE, T., CIULLO, C., LESCARBEAU, R., SEITZER, J., SHAH, R.R., SHAH, A., LING, D., GROWE, J., PINK, M., ROHDE, E., WOOD, K.M., SALOMON, W.E., HARRINGTON, W.F., ... MORRISSEY, D.V. (2018). A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.*, 22(9), 2227–2235.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.014>
- FOGARTY, N.M.E., MCCARTHY, A., SNIJDERS, K.E., POWELL, B.E., KUBIKOVA, N., BLAKELEY, P., LEA, R., ELDER, K., WAMAITHA, S.E., KIM, D., MACIULYTE, V., KLEINJUNG, J., KIM, J., WELLS, D., VALLIER, L., BERTERO, A., TURNER, J.M.A., Y NIAKAN, K.K. (2017). Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550(7674), 67–73.
<https://doi.org/10.1038/nature24033>

- FRANGOUL, H., ALTSHULER, D., CAPPELLINI, D., CHEN, Y., DOMM, J., EUSTACE, B.K., FOELL, J., DE LA FUENTE, J., GRUPP, S., HANDGRETINGER, R., HO, T.W., KATTAMIS, A., KERNYTSKY, A., LEKSTROM-HIMES, J., LI, A.M., LOCATELLI, F., MAPARA, M.Y., DE MONTALEMBERT, M., RONDELLI, D., ... CORBACIOGLU, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England Journal of Medicine*, 384(3), 252–260.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- GILLMORE, J.D., GANE, E., TAUBEL, J., KAO, J., FONTANA, M., MAITLAND, M.L., SEITZER, J., O'CONNELL, D., WALSH, K.R., WOOD, K., PHILLIPS, J., XU, Y., AMARAL, A., BOYD, A.P., CEHELKY, J.E., MCKEE, M.D., SCHIERMEIER, A., HARARI, O. MURPHY, A., ... LEBWOHL, D. (2021). CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, 385(6), 493–502.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>
- GORDON, J.W. Y RUDDLE, F.H. (1982). Germ line transmission in transgenic mice. *Progress in Clinical and Biological Research*, 85(Pt B), 111–124.
- GORDON, J.W., SCANGOS, G.A., PLOTKIN, D.J., BARBOSA, J.A. Y RUDDLE, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7380–7384.
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
- JAENISCH, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4), 1260–1264.
<https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1260>
- JAENISCH, R., FAN, H. Y CROKER, B. (1975). Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(10), 4008–4012.
<https://doi.org/10.1073/pnas.72.10.4008>
- JAENISCH, R. Y MINTZ, B. (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1250–1254.
<https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1250>
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A. Y CHARPENTIER, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- KOBLAN, L.W., ERDOS, M.R., WILSON, C., CABRAL, W.A., LEVY, J.M., XIONG, Z.M., TAVAREZ, U.L., DAVISON, L.M., GETE, Y.G., MAO, X., NEWBY, G.A., DOHERTY, S.P., NARISU, N., SHENG, Q., KRILLOW, C., LIN, C.Y., GORDON, L.B., CAO, K., COLLINS, F.S., ... LIU, D.R. (2021). In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature*, 589(7843), 608–614.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03086-7>
- KOSICKI, M., TOMBERG, K. Y BRADLEY, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology*, 36(8), 765–771.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4192>
- LEDFOURD, H. (2020). CRISPR gene editing in human embryos wreaks chromosomal mayhem. *Nature*, 583(7814), 17–18.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-01906-4>

- LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, C., HUANG, R., ZHANG, Z., LV, J., XIE, X., CHEN, Y., LI, Y., SUN, Y., BAI, Y., SONGYANG, Z., MA, W., ZHOU, C. Y HUANG, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6(5), 363–372.
<https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
- LIU, N., HARGREAVES, V.V., ZHU, Q., KURLAND, J.V., HONG, J., KIM, W., SHER, F., MACIAS-TREVINO, C., ROGERS, J.M., KURITA, R., NAKAMURA, Y., YUAN, G.C., BAUER, D.E., XU, J., BULYK, M.L. Y ORKIN, S.H. (2018). Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch. *Cell*, 173(2), 430–442.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.016>
- LIU, Z., CAI, Y., WANG, Y., NIE, Y., ZHANG, C., XU, Y., ZHANG, X., LU, Y., WANG, Z., POO, M. Y SUN, Q. (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, 174(1), 245.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.036>
- MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, S.W., WU, J., LEE, Y., SUZUKI, K., KOSKI, A., JI, D., HAYAMA, T., AHMED, R., DARBY, H., VAN DYKEN, C., LI, Y., KANG, E., PARK, A.R., KIM, D., KIM, S.T., GONG, J., GU, Y., ... MITALIPOV, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668), 413–419.
<https://doi.org/10.1038/nature23305>
- MAEDER, M.L., STEFANIDAKIS, M., WILSON, C.J., BARAL, R., BARRERA, L.A., BOUNOUTAS, G.S., BUMCROT, D., CHAO, H., CIULLA, D.M., DASILVA, J.A., DASS, A., DHANAPAL, V., FENNELL, T.J., FRIEDLAND, A.E., GIANNOUKOS, G., GLOSKOWSKI, S.W., GLUCKSMANN, A., GOTTA, G.M., JAYARAM, H., ... JIANG, H. (2019). Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine*, 25(2), 229–233.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>
- MALI, P., YANG, L., ESVELT, K.M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J.E., NORVILLE, J.E. Y CHURCH, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826.
<https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- MOJICA, F.J.M. Y MONTOLIU, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*, 24(10), 811–820.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>
- MOJICA, F.J.M., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. Y SORIA, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182.
<https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- MONTOLIU, L. (7 de noviembre de 2017). La otra cara de Dolly. *Blog Genética, en Naukas*:
<https://montoliu.naukas.com/2017/11/07/la-otra-cara-de-dolly/>
- MONTOLIU, L. (2021). *Editando genes: recorta, pega y colorea. Las maravillosas herramientas CRISPR* (3ª edición). NextDoor Publishers.
- MUSUNURU, K., CHADWICK, A.C., MIZOGUCHI, T., GARCIA, S.P., DENIZIO, J.E., REISS, C.W., WANG, K., IYER, S., DUTTA, C., CLENDANIEL, V., AMAONYE, M., BEACH, A., BERTH, K., BISWAS, S., BRAUN, M.C., CHEN, H.M., COLACE, T.V., GANEY, J.D., GANGOPADHYAY, S.A., ... KATHIRESAN, S. (2021). In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature*, 593(7859), 429–434.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>
- PALMITER, R.D. Y BRINSTER, R.L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annual Review of Genetics*, 20, 465–499.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.002341>

- PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBAUER, M.E., ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C. Y EVANS, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300(5893), 611–615.
<https://doi.org/10.1038/300611a0>
- RUAN, G.X., BARRY, E., YU, D., LUKASON, M., CHENG, S.H. Y SCARIA, A. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Molecular Therapy*, 25(2), 331–341.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.006>
- SANKARAN, V.G., MENNE, T.F., XU, J., AKIE, T.E., LETTRE, G., VAN HANDEL, B., MIKKOLA, H.K., HIRSCHHORN, J.N., CANTOR, A.B. Y ORKIN, S.H. (2008). Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*, 322(5909), 1839–1842.
<https://doi.org/10.1126/science.1165409>
- SERUGGIA, D., Y MONTOLIU, L. (2014). The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic research*, 23(5), 707–716.
<https://doi.org/10.1007/s11248-014-9823-y>
- SERUGGIA, D., FERNÁNDEZ, A., CANTERO, M., PELCZAR, P. Y MONTOLIU, L. (2015). Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 43(10), 4855–4867.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv375>
- STADTMAUER, E.A., FRAIETTA, J.A., DAVIS, M.M., COHEN, A.D., WEBER, K.L., LANCASTER, E., MANGAN, P.A., KULIKOVSKAYA, I., GUPTA, M., CHEN, F., TIAN, L., GONZALEZ, V.E., XU, J., JUNG, I.Y., MELENHORST, J.J., PLESA, G., SHEA, J., MATLAWSKI, T., CERVINI, A., ... JUNE, C.H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 367(6481), 7365.
<https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- TAKAHASHI, K. Y YAMANAKA, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S. Y JONES, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J. Y CAMPBELL, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813.
<https://doi.org/10.1038/385810a0>

Resumen. _____

La modificación del genoma humano a voluntad es una idea que ronda a los investigadores desde los años 70 del siglo pasado. Tras la aparición de las primeras técnicas de ingeniería genética y los sucesivos métodos de transgénesis que fueron desarrollándose posteriormente siempre estuvo presente el anhelo o temor de poder modificar el ADN humano. Sin embargo esto no se pudo constatar hasta 2013, con la aparición de las herramientas de edición genética CRISPR-Cas, que facilitaron y universalizaron los procedimientos de alteración genética dirigida, sobre genes específicos.

Palabras clave. Modificación genética; ADN recombinante; Transgénesis; Edición genética; CRISPR-Cas.

Abstract. _____

The modification of the human genome at will is an idea that has been around researchers since the 70s of the last century. After the appearance of the first genetic engineering techniques and the successive methods of transgenesis that were developed later, the desire or fear of being able to modify human DNA was always present. However, this could not be verified until 2013, with the appearance of the CRISPR-Cas gene editing tools, which facilitated and universalized the procedures of targeted genetic alteration, on specific genes.

Key-words. Genetic modification; Recombinant DNA; Transgenesis; Gene editing; CRISPR-Cas.

Lluís Montoliu

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII)

montoliu@cnb.csic.es