

# Universitat Politècnica de València

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Grado en Biotecnología

TRABAJO FINAL DE GRADO

## MANIPULACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES: LÍMITES LEGALES EN LA CURACIÓN DE TRASTORNOS GENÉTICOS.

**Alumno/a:** Iván Margaix Villora

**Tutor/a:** Dra. Francisca Ramón Fernández

**Curso académico:** 2017/2018

Valencia, 31 de mayo de 2018

## **MANIPULACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES: LÍMITES LEGALES EN LA CURACIÓN DE TRASTORNOS GENÉTICOS.**

### **Resumen**

Durante estos últimos 2 años se han producido las primeras investigaciones que han logrado modificar genéticamente embriones humanos para corregir errores y así curar trastornos genéticos. El éxito de estas líneas de investigación ha revolucionado el mundo de la biotecnología, logrado eliminar el trastorno genético que acaecían con una precisión y eficiencia ejemplar. Esto ha sido posible gracias al avance y a la aparición de nuevas técnicas de alteración genética que han permitido la creación de novedosas estrategias terapéuticas. Puesto que la legislación vigente sobre la modificación genética embrionaria está influenciada por las altas tasas de fallo de la modificación genética y la incertidumbre de la misma, el avance de la técnica lleva a nuevas definiciones y aspectos ético-legales, incluso llevando a expertos de todo el mundo a indicar la necesidad de definir nuevos marcos y supuestos legales para la modificación genética terapéutica en humanos. El presente trabajo detalla los límites técnicos de la modificación genética en embriones humanos, así como los actuales marcos legales, tanto nacionales como internacionales, presentando un análisis en profundidad de la situación actual y presentando los últimos casos reales de modificación genética terapéutica sobre embriones humanos y los posibles supuestos futuros, así como los márgenes de la legislación vigente en el caso de la cura de enfermedades genéticas.

### **Abstract**

During the last 2 years the first investigations that have managed to genetically modify human embryos to correct errors and cure genetic disorders have been carried out. The success of these research lines has been a revolution in biotechnology, eliminating the genetic disorders of the embryos with exemplary precision and efficiency. This has been possible thanks to the advance and appearance of new techniques of genetic engineering that have allowed the creation of novel therapeutic strategies. Since the legislation on the embryonic genetic modification is influenced by the high failure rates of the genetic modification and the uncertainty of it, the advance of the technique requires new ethical-legal aspects, and experts from all the world have started to indicate the need to define new legal frameworks and assumptions for genetic modification applied in humans. The present work details the technical limits of genetic modification in human embryos, as well as current legal frameworks, both national and international, presenting an in-depth analysis of the current situation and presenting the last real cases of genetic modification related to human embryos and the possible future assumptions, as well as the margins of the legislation in force in the case of the cure of genetic diseases.

### **Palabras clave**

Embriones, Enfermedades genéticas, Ingeniería genética, Línea Germinal, Marco Legal, Ley, Terapia génica, Convenio de Oviedo, Gametos, iPSC, España, Internacional.

### **Keywords**

Embryos, Genetic diseases, Genetic engineering, Germinal line, Legal framework, Law, Gene therapy, Oviedo Convention, Gametes, iPSC, Spain, International.

**Autor:** Iván Margaix Villora

Valencia, 31 de mayo de 2018

**Tutora Académica:** Dra. Francisca Ramón Fernández

*A mis padres, por permitirme estudiar y demostrarme con su ejemplo la importancia del esfuerzo y ser constante en lo que uno quiere.*

*A Francisca, por acogerme cuando muchos se negaron y por hacer este trabajo posible gracias a sus consejos.*

*Y por último, a todas las personas que me han dado una oportunidad en la vida y me han permitido encontrar lo que me hace feliz.*

## ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>2</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>IV. LAS NUEVAS TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA</b> .....	<b>4</b>
1. Nucleasas con dedos de zinc (ZFNs) .....	5
2. TAL-Efactor Nucleasas .....	6
3. CRISPR-Cas .....	8
<b>IV. ESTRATEGIAS BIOMÉDICAS Y ENSAYOS CLÍNICOS RECIENTES MEDIANTE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS HUMANAS</b> .....	<b>11</b>
1. Ingeniería genética sobre la línea somática .....	12
1.1. Terapia genética in vivo .....	12
1.2. Transplantes de células y tejidos modificados genéticamente ex vivo .....	14
2. Ingeniería genética sobre la línea germinal .....	15
2.1. Gametos .....	15
2.2. Investigación sobre pre-embryones .....	17
<b>VI. LEGISLACIÓN VIGENTE</b> .....	<b>21</b>
1. Tratados internacionales .....	21
1.1. La Declaración de Helsinki y el Consentimiento Informado (CI).....	22
1.2. El Convenio de Oviedo .....	23
2. Marco legal español de la terapia génica sobre embriones para la cura de enfermedades .....	27
3. Situación actual de otros países .....	30
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>34</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>

### Índice de figuras

- Figura 1.** Estructura de una ZFN estándar
- Figura 2.** Estructura 3D del dominio Transcription Activator-Like
- Figura 3.** Estructura y sistema de funcionamiento general del complejo CRISPR/Cas.
- Figura 4.** Esquema básico del proceso de transferencia mitocondrial ideado por el Dr. Grifo
- Figura 5.** Países firmantes del Convenio de Oviedo
- Figura 6.** Clasificación de las diferentes regulaciones nacionales sobre la modificación genética de la línea germinal.

## ABREVIATURAS

---

- **AEAF:** Administración Estatal de Alimentos y Fármacos (China)
- **AMM:** Asamblea Medica Mundial
- **BOE:** Boletín Oficial del Estado
- **Cas:** CRISPR proteína asociada
- **CdO:** Convenio de Oviedo
- **CI:** Consentimiento Informado
- **CIEGH:** Cumbre Internacional sobre la Edición Genética Humana
- **CNRHA:** Comisión Nacional De Reproducción Humana Asistida
- **CRISPR:** Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Interespaciadas (Siglas del inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
- **DNA:** Acido Desoxirribonucleico (Siglas del inglés DeoxyRibonucleic Acid)
- **DSB:** Corte de la cadena doble (Siglas del inglés Double Strand Break)
- **EE.UU:** Estados Unidos de América
- **EMA:** Agencia Europea de Medicina (Siglas del inglés European Medicines Agency)
- **FDA:** Food and Drug Administration (EE.UU.)
- **FokI:** endonucleasa de restricción I de *Flavobacterium okeanoikoites*
- **GFP:** Proteína Fluorescente Verde (Siglas del inglés Green Fluorescent Protein)
- **gRNA:** Ácido ribonucleico guía (Siglas del inglés guide RNA)
- **HDR:** Reparación Dirigida por Homología (Siglas del inglés Homology-Directed Repair)
- **iPSCs:** Células Pluripotentes Inducidas (Siglas del inglés induced Pluripotent Stem Cells)
- **mtDNA:** Acido Desoxirribonucleico mitocondrial (Siglas del inglés mitochondrial DNA)
- **NEHJ:** Unión No-homologa de los Extremos (Siglas del inglés Non-Homologous End Joining)
- **NIH:** National Institute of Health (EE.UU.)
- **OGM:** Organismos Genéticamente Modificados
- **RNA:** Acido ribonucleico (Siglas del inglés RiboNucleic Acid)
- **TAL:** Transcriptor tipo Activador (Siglas del inglés Trascription Activator-Like)
- **TALENs:** Nucleasas TAL-Efectoras (Siglas del inglés Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
- **TRA:** Tratamientos de Reproducción Asistida
- **UE:** Unión Europea
- **VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- **ZFN:** Nucleasa con Dedos de Zinc (Siglas del inglés Zinc-Finger Nuclease)

## I. INTRODUCCIÓN

---

La aparición y desarrollo de nuevas herramientas y técnicas en el campo de la ingeniería genética ha permitido un avance sin precedentes en la biotecnología estos últimos años. La precisión, efectividad y sencillez de las mismas han permitido la proliferación de exitosas líneas de investigación en ámbitos muy diversos que se consideraban técnica o prácticamente imposibles, fuera por la ineficacia de la edición o por el coste desmesurado que conllevan los proyectos ambiciosos.

Mientras la comunidad científica observa una revolución técnica, la sociedad ha quedado fracturada y en discusión permanente entre los que ven estos avances en la ingeniería genética como una oportunidad, y los que la ven como una amenaza, hasta el punto de llamar a estas técnicas armas de destrucción masiva. La biomedicina en concreto es una vez más el foco de la controversia al tratar su experimentación directamente con el funcionamiento del cuerpo humano y, por tanto, con la vida humana.

No obstante, la mayoría de estas amenazas nacen del uso que pueda dársele a la tecnología y la ciencia, y más si se considera que el tiempo y los elementos necesarios para generar cambios en el genoma se están viendo reducidos constantemente. Por ello, desde los primeros descubrimientos de la ingeniería genética varios organismos se han encargado de regular estas modificaciones, para evitar su uso malintencionado o indebido.

Estas regulaciones han evolucionado invariablemente desde su creación para reflejar los progresos científicos y tecnológicos, así como para adaptarse a las situaciones sociales cambiantes. Desde las regulaciones en el ámbito de la mejora vegetal, las medidas para evitar la creación de microorganismos patógenos o los reglamentos de experimentación con tejidos animales, estas normativas han sido generadas por comités de expertos y legislaciones nacionales, generalmente en conjunto.

Por tanto, a lo largo de 35 años se ha producido una gran actividad legislativa y han aparecido multitud de indicaciones en continuo cambio y con una delimitación en el espacio y las fronteras, lo que ha significado una disparidad geográfica en el ámbito de la ciencia, puesto que investigaciones o técnicas que se permiten en un lugar han sido prohibidas en otro.

Esto ha permitido a países adoptar y desarrollar tecnologías de una manera mucho más eficiente que otros que han esperado con cautela a comprobar la seguridad de estos procedimientos. Con el avance del tiempo y la globalización, esta disparidad ha culminado en la firma de tratados internacionales, en un intento de permitir un desarrollo homólogo y equitativo de la ciencia.

No obstante, estos tratados engloban conceptos generalistas y su firma depende de la realidad social de cada país suscriptor, por lo que no es de extrañar que existan países que opten por no firmar estos acuerdos, o países que, aunque adhiriéndose a estos tratados, permitan en su territorio investigaciones que en otros firmantes se consideran prohibidas.

En el ámbito de la ingeniería genética en humanos, no es de extrañar que estas regulaciones se remontan al descubrimiento de las primeras técnicas de edición genética o de reproducción asistida, ya que la modificación de las características del cuerpo humano es un tema recurrente no solo en la ciencia ficción, si no en el avance de la medicina moderna, y la modificación del material genético es actualmente la técnica más potente a la hora de generar cambios en un organismo vivo.

Por ello, desde finales de los años ochenta han aparecido diversos códigos de tipo ético-médicos que han culminado en la creación y firma del Convenio de Oviedo el 4 de abril de 1997 por 29 países. En este convenio se acepta la modificación del genoma humano con objetivos terapéuticos y sin embargo no se había reportado ninguna investigación que tratara de erradicar una enfermedad genética sobre un humano modificando su genoma hasta hace el año 2015, cuando un equipo investigador chino modificó genéticamente embriones afectados de una enfermedad genética con éxito obteniéndose individuos sanos.

Desde entonces, han surgido multitud de líneas de investigación con el mismo objetivo. A lo largo del presente trabajo se presenta una descripción detallada de estos últimos avances en modificación genética que las legislaciones y tratados actuales permiten, así como una exposición de los conceptos que engloban y los límites de las mismas, exponiendo los diferentes resultados de líneas de investigación cuyos resultados han cambiado irrevocablemente el futuro de la biomedicina.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

La realización de este trabajo se basa principalmente en la búsqueda de recursos bibliográficos, tanto en aspectos técnicos y científicos, como jurídicos, sociales y éticos.

Para la recopilación y elaboración del contenido científico, se han realizado búsquedas en las principales bases de datos, revistas y repositorios de artículos científicos, como son NCBI, PubMed o Nature, además de consultar organismos y webs especializados en la materia tratada.

En cuanto al estudio de la legislación española, se ha acudido a las publicaciones online del Boletín Oficial del Estado, así como otras páginas y bases de datos jurídicas en las que se encuentra reunidas normativas de distinta índole.

En lo que se refiere al estudio de la normativa en los distintos países que han sido analizados, se han recurrido a las fuentes oficiales de cada uno en los que se publican, de forma actualizada, las leyes vigentes disponibles en el momento. Para los tratados internacionales se han consultado los textos íntegros de cada uno en su última versión. La traducción de los documentos se ha realizado gracias a la comprensión propia en el caso de estar disponibles en inglés, y en el caso de no estarlo se han utilizado programas de traducción o consultas a personas cuya lengua materna fuera el idioma en cuestión.

Por último, en lo referente a los aspectos sociales y éticos, se ha recurrido a diversos artículos de opinión, encuestas y noticias realizadas por diversos comités de expertos, así como portales de noticias de prestigio tanto nacional como internacional.

La consulta exhaustiva de estas metodologías ha permitido una recopilación completa de la materia tratada y de todos sus aspectos, dando como resultado el presente trabajo.

### III. OBJETIVOS

---

El objetivo principal del presente trabajo es realizar un análisis en profundidad de la situación actual en la que se encuentra la ingeniería genética para la cura de enfermedades en embriones humanos, como respuesta a los últimos avances tanto técnicos como sociales que los últimos años han supuesto para la biotecnología tanto a nivel nacional como a nivel internacional.

Con este objetivo principal se describen los diversos aspectos técnicos que permiten estas modificaciones, describiendo en profundidad las novedosas herramientas utilizadas en la actualidad, y catalogando los diferentes tipos de modificaciones genéticas en células humanas que su utilización posibilita, así como las últimas líneas de investigación que han permitido llevar a cabo.

De igual manera, en el presente trabajo pretende analizar la evolución y últimos avances sobre la erradicación de enfermedades genéticas hereditarias, describiendo la situación de las últimas propuestas de investigación y exponiendo los distintos conflictos éticos o legales que puedan establecerse en el futuro inmediato.

Por último, este análisis en profundidad examinará las diferentes regulaciones y legislaciones nacionales, así como los tratados internacionales en esta materia, presentando la diversidad de conceptos que estas heterogéneas normativas engloban y que han permitido o prohibido estas investigaciones, así como su evolución en el tiempo con el fin de adaptarse a los cambios científicos y sociales, con el objetivo de presentar una visión global del estado actual por la que se rigen estas investigaciones.

Es por tanto que el lector del presente trabajo podrá comprender de una forma siempre objetiva los avances pasados sobre la modificación genética en humanos que han sido posibles tanto por la técnica como por la legislación, así como entender la situación en la que se encuentran las diversas líneas de investigación actuales, y crear una opinión propia sobre los diferentes problemas y beneficios que supone la ingeniería genética en embriones humanos, demostrando como la modificación genética completa de seres humanos ha dejado de considerarse territorio ciencia ficción para convertirse en una realidad.

#### IV. LAS NUEVAS TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

---

El DNA como biomolécula puede ser alterado mediante muchas metodologías para generar mutaciones o alterar su contenido. Estas técnicas abarcan desde primitivas y aleatorias técnicas físicas de mutagénesis mediante radiación hasta la más sofisticada maquinaria enzimática artificial utilizada en la actualidad. A continuación, se describen las tres últimas herramientas de edición genética que, por su efectividad, se han convertido en poco tiempo en las técnicas más populares para la ingeniería de DNA, exponiendo las principales ventajas y desventajas de su uso tanto entre ellas como respecto al resto de herramientas usadas con anterioridad.

Estos procedimientos tienen como principal atributo su capacidad para manipular sistemáticamente cualquier gen contenido en líneas celulares muy diversas, tanto in vitro como in vivo, y se basan en el uso de nucleasas ligadas a dominios de unión al DNA de secuencia específica.

Básicamente están compuestas de un dominio nucleasa que actúa cortando el DNA de una forma ordenada y predecible, ya que por su conformación este dominio se encuentra inhibido y únicamente cataliza el corte cuando el dominio de unión al DNA reconoce las secuencias de nucleótidos y la conformación en el espacio del complejo cambia, lo que permite controlar el sitio de corte dependiendo de la secuencia contenida en el dominio guía. Una vez detectada la secuencia, estas herramientas cortan la cadena en el sitio específico de corte generando un corte de cadena doble (DSB en sus siglas del inglés Double Strand Break).

Una vez efectuado el corte, la maquinaria celular puede reparar el mismo mediante unión no-homóloga de los extremos resultantes del corte (NHEJ, de sus siglas en inglés Non Homologous End Joining) o mediante reparación dirigida por homología de las secuencias (HDR de sus siglas en inglés Homology-Directed Repair).

Generalmente las células utilizan este primer método, ya que la HDR requiere de una cadena hermana para usar como plantilla y por tanto es una herramienta de reparación que solo está disponible en células que se encuentran en la fase G o en la fase S tardía.

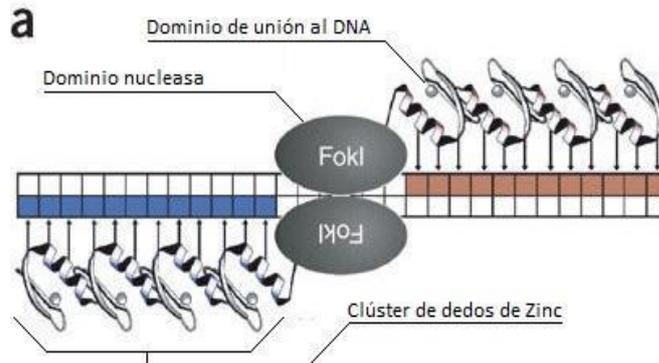
No obstante, en la actualidad la elevada proporción de fallos de la reparación NHEJ solo permite prácticamente el apagado de genes mediante knock-out causado, ya que debido a la naturaleza de esta maquinaria las actuaciones más específicas suelen generar productos con un alto porcentaje de deleciones o inserciones que generan secuencias sin sentido. Por ello, para inducir cambios específicos en el genoma se ha desarrollado la técnica de forma que se aprovecha la reparación HDR junto a la introducción de una secuencia plantilla con la mutación deseada, que es implantada en el genoma.

En esta modularidad y sencillez reside su eficacia, ya que estas herramientas pueden cortar la cadena de DNA a lo largo del genoma de manera metódica en aquellas bases cercanas a la secuencia que empareja con la secuencia de nucleótidos usada con estas herramientas, y esta secuencia del dominio guía puede ser manipulada cambiando su contenido.

Asimismo, en el presente apartado se describen los últimos desarrollos y modificaciones de estas herramientas, así como sus usos más recientes en la investigación de alteraciones génicas en células madre embrionarias de mamíferos, sin describir su proceso de creación o funcionamiento.

## 1. NUCLEASAS CON DEDOS DE ZINC (ZFNs)

Las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, siglas del inglés Zinc Finger Nuclease) son las primeras de estas nuevas técnicas en orden cronológico (Kim *et al.*, 1996) y en la actualidad están siendo utilizadas para varios usos académicos e industriales como la generación de modelos animales (Cui *et al.*, 2011) o la mejora vegetal (Petolino *et al.*, 2015). Consisten en enzimas de restricción creadas mediante la fusión artificial de un dominio de unión a DNA específicos del sitio unidos al dominio de endonucleasa inespecífica de la enzima de restricción bacteriana FokI (Figura 1), que al producirse la unión con el DNA cambia su conformación y se activa (Vaamee *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Estructura de una ZFN estándar (Fuente: modificado por el autor a partir de <https://www.nature.com/articles/nbt1319> consultado el 8/05/2018)

Los dominios de unión al DNA de los ZFNs están formados por entre dos a seis dedos de zinc basado en la estructura de dedos de zinc natural de factores de transcripción, o adaptada de las mismas. Cada dedo de zinc es capaz de reconocer unas -3 o -4 pares de bases y el dominio de unión al DNA de las ZFNs contienen unos tres dominios de media agrupados en clúster, aunque el número de dominios puede variar, y por lo tanto otorga una especificidad cercana a los 18 pares de bases, longitud suficiente para considerar la secuencia como única en un genoma generado aleatoriamente (Moore *et al.*, 2001).

Esta técnica ha sido utilizada para generar o corregir de manera exitosa mutaciones genéticas inducidas por ZFNs a organismos tanto animales como vegetales mediante diversos métodos como la inyección sobre embriones de rana *Xenopus tropicalis* (Young *et al.*, 2011), usando vectores virales de entrega en plantas de tabaco (Marton *et al.*, 2010). Igualmente, se ha logrado la transformación exitosa de cultivos celulares de mamíferos superiores como el cerdo (Watanabe *et al.*, 2010) o el ratón (Carbery *et al.*, 2010). Sin embargo, varios estudios también han demostrado que las principales limitaciones del uso ZFNs consisten en la dificultad para introducir efectivamente el material genético que sirve como plantilla sin que este degrade (Inder M. y Nikunj, 1997), así como la aparición de cortes fuera de la secuencia deseada debido a la unión de los dedos de zinc a secuencias similares con afinidad suficiente para ligar con el complejo (Gabriel *et al.*, 2011). En una investigación realizada sobre células tumorales, se reveló la presencia de una gran cantidad de potenciales cortes realizados fuera de la secuencia objetivo (Piganeau *et al.*, 2013).

Para combatir esta baja especificidad de los dedos de zinc se ha propuesto la creación de ZFNs con suficientes dedos de zinc que incrementen su especificidad y eviten la aparición de cortes no deseados, aunque la creación de nuevas estructuras de dedos de zinc o la creación de un dominio de unión al DNA con un gran número de dedos de zinc son procesos experimentales muy costosos económica y temporalmente e ineficientes.

Asimismo se han generado bases de datos como la Zinc Fingers Data Base (ZiFDB) con 716 entradas, aunque la aparición de otras técnicas más sencillas y eficientes han resultado en un abandono de esta base, que en la actualidad no tiene mantenimiento y sus actualizaciones son muy escasas.

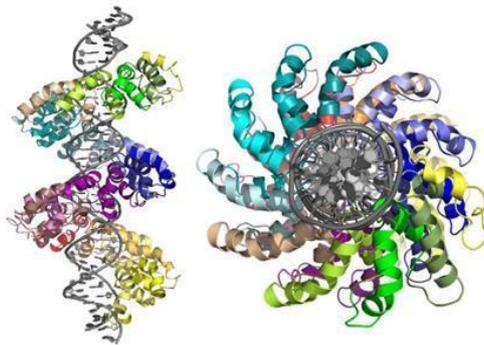
Varios estudios han resultado en el desarrollo de ZFNs con mayor actividad (Gupta *et al.*, 2011) y la aparición de protocolos de uso optimizados (Doyon *et al.*, 2010), pero otros estudios también han demostrado que la principal limitación tecnológica de este ensamblaje modular reside en la pérdida de la especificidad de la partes, debido a que varios módulos pueden solaparse en sus secuencias reconocidas o puede verse afectada por los cambios en la conformación del módulo, que depende de las características de los otros que lo rodean (Christian *et al.*, 2010).

La mayoría de las patentes clave de ZFNs caducarán en los próximos 4 años, lo que facilitará a muchos equipos de investigación trabajar con las mismas y desarrollar esta herramienta de una manera más libre y extensa, aunque la aparición de otras herramientas ha relevado a las ZFNs del ámbito biomédico a día de hoy, aunque existen algunas líneas de investigación exitosas sobre su uso para la mejora de la salud humana, como el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante terapia génica usando ZFNs (Pérez *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2013).

## 2. TAL-EFECTOR NUCLEASAS

Las nucleasas TAL-Efactor (TALENs en sus siglas en inglés Transcription Activator-Like Effector Nucleases) son enzimas de restricción que han sido manipuladas para cortar el DNA en sitios específicos.

Se elaboran al fusionar un dominio nucleasa con un dominio que reconoce el DNA. Este dominio está formado por efectores TAL (Figura 2), proteínas de secreción que las bacterias *Xanthomonas* secretan al infectar plantas, ya que estas proteínas TAL emulan a activadores de transcripción que activan la expresión de varios genes vegetales que facilitan la infección bacteriana.



**Figura 2.** Estructura 3D del dominio Transcription Activator-Like (Fuente: <https://iagrcn.org/optimized-talen-application-and-screening-in-drosophila-melanogaster/> consultado el 04/05/2018)

Este dominio TAL es capaz de reconocer secuencias de DNA gracias a un dominio central consistente en varias repeticiones de unos 34 aminoácidos cada una. Puede contener de 1.3 a 34 repeticiones y su especificidad para reconocer una u otra secuencia depende tanto del número de repeticiones como del contenido de las mismas, ya que estos 34 aminoácidos tienen regiones muy variables (Boch *et al.*, 2009).

Es muy importante señalar que, de todas las nuevas técnicas desarrolladas y comentadas en este trabajo, esta es la única cuya región de unión al DNA no depende de una secuencia de nucleótidos si no de aminoácidos, cuyo código está siendo descifrado en la actualidad. A día de hoy, varios estudios han demostrado que el reconocimiento de cada par de bases por cada repetición está determinado por la combinación de solo un par de los 34 aminoácidos.

Por tanto, se conoce que el número de repeticiones del dominio central afecta a la longitud de la secuencia reconocible y el contenido de estas repeticiones al par de bases a los que estas se unen. Estos descubrimientos han permitido en los últimos 5 años el desarrollo de regiones TAL artificiales en las que estas repeticiones son alteradas para reconocer secuencias específicas (Li *et al.*, 2012). Sin embargo, el dominio de unión TAL tiene una desventaja crítica frente a otras herramientas de edición genética: necesita una base Timina en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos (Boch *et al.*, 2009).

Al igual que con las ZFNs esta región capaz de reconocer DNA es fusionada al dominio catalítico de la nucleasa no específica FokI, que se mantiene desactivada a no ser que la TALEN cambie su conformación al ligar con la cadena de DNA y genera un DSB, cuya reparación está mediada como con las ZFNs (Mahfouz *et al.*, 2011). En comparación con las ZFNs el diseño de TALEN ha sido mucho más flexible y menos costoso debido a los conocimientos y herramientas altamente especializados que se requieren para diseñar ZFN funcionales (Choi *et al.*, 2013).

Actualmente, varios equipos de investigación han sido capaces de modificar las propiedades de estas herramientas para aumentar la eficacia de la actividad nucleasa, intentar eludir el requerimiento de reconocer solo secuencias con Timina en 5' y permitir el ataque directo a DNA metilado. Por ejemplo, a partir del descubrimiento de una región TAL capaz de ligar DNA metilado por Deng *et al.*, en 2012, se han desarrollado varias TALENs capaces de generar cortes únicamente en este tipo de DNA.

Estos desarrollos en la elaboración de las TALENs junto al desciframiento del código de reconocimiento de DNA han permitido una manipulación genética sin precedentes en un extenso grupo de organismos. Asimismo, se han elaborado librerías de secuencias TAL capaces de reconocer genes o secuencias codificantes de proteínas. En humanos, el equipo liderado por Yongsu K. generó una librería de TALENs capaz de cubrir todo el genoma en 2012, y en total se han catalogado cerca de 18.800 secuencias diferentes capaces de unirse a la región TAL.

Las TALENs han sido usadas con efectividad para generar organismos transgénicos por introducción de mutaciones o knock-out, así como para interrogar la función de elementos genéticos complejos en enfermedades. En el ámbito biomédico, las TALENs se han usado con éxito sobre células *in vitro* para corregir mediante recombinación homóloga la mutación que actúa como la base molecular de la anemia de células falciformes (Sun *et al.*, 2012), la Distrofia muscular de Duchenne (Ousterout *et al.*, 2013), la deficiencia de alfa-1 antitripsina (Choi *et al.*, 2013), y la epidermólisis ampollar (Osborn *et al.*, 2013), entre otros.

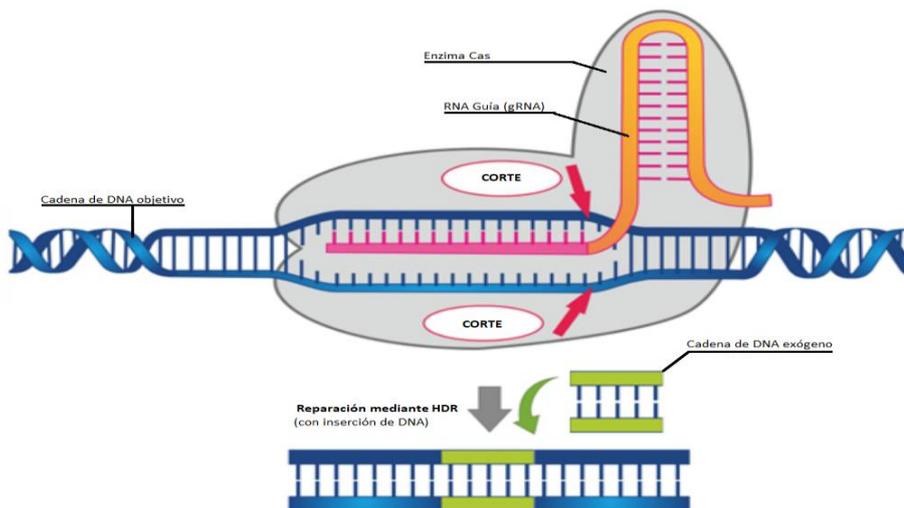
De igual manera, las TALENs han permitido avanzar en la lucha contra enfermedades mitocondriales mediante la delección de secuencias sin sentido del DNA mitocondrial (mtDNA) contenido en el interior de las mitocondrias (Bacman *et al.*, 2013).

### 3. CRISPR-CAS

El mecanismo CRISPR-Cas puede ser resumido como un sistema inmune procariota frente a infecciones de virus que ataca directamente a la secuencia de DNA vírica (Horvath & Barrangou, 2010). Desde su aparición como herramienta de edición genética (Mali *et al.*, 2013), se ha convertido rápidamente en la técnica por excelencia, al ser más eficiente y tener más rango de edición que el resto de las técnicas, así como presentar un uso más sencillo y versátil en su utilización y desarrollo. Dependiendo de su uso, el sistema CRISPR/Cas permite tanto la generación de inserciones de material genético exógeno, como las deleciones y la mutagénesis.

Sus siglas referencian a su estructura (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas de RNA (Figura 3). Estas secuencias repetidas son cortas (28 a 37 bp) y palindrómicas (la secuencia es la misma en ambas direcciones), y en la naturaleza están separadas por pequeños fragmentos de DNA foráneo a la bacteria de longitud variable, de 21 a 72 bp.

Contiene una parte constante, que forma la unión de las nucleasas Cas, y una parte en 5' de 20-nt complementaria a la secuencia de DNA diana, que puede ser diseñada para ligar a diferentes secuencias, el denominado RNA guía (gRNA). Por tanto, de todas las herramientas descritas, CRISPR ofrece el dominio de reconocimiento de DNA más manipulable y además, permite realizar múltiples cambios en un solo uso ya que varios gRNAs pueden ser usados al mismo tiempo (Jao *et al.*, 2013). Existen varias proteínas cas con actividad nucleasa que pueden asociarse a CRISPR. La más usada actualmente es la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que genera cortes DSB exactos en la secuencia objetivo. Además, se han caracterizado ortólogos alternativos a Cas9 o se ha modificado con tecnología recombinante este dominio nucleasa generando diversos sistemas CRISPR-Cas con prestaciones muy variadas, como la mitoCas9a, que al introducirse en una célula solo afecta al DNA mitocondrial. (Jo *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Estructura y sistema de funcionamiento general del complejo CRISPR/Cas. (Fuente: modificado por el autor a partir de <https://labiotech.eu/crispr-cas9-review-gene-editing-tool/> consultado el 7/05/2018)

El hecho de que esta herramienta exista cifrada en el genoma procariota permite actualmente la identificación de nuevos sistemas CRISPR a partir de microorganismos no cultivados, y su simplicidad también ha permitido agregar nuevas funcionalidades a los sistemas existentes.

Así, han aparecido modificaciones del sistema CRISPR-Cas que mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos o las proteínas asociadas a esta son capaces de regular la metilación del DNA (Lei *et al.*, 2017) así como su desmetilación (Liu *et al.*, 2016), la acetilación y desacetilación de histonas (Kwon *et al.*, 2017) o la activación y desactivación de la transcripción (Long *et al.*, 2015, Gilbert *et al.*, 2014). Esta versatilidad de uso ha derivado en la creación de una larga lista de librerías combinadas de CRISPR disponibles comercialmente, así como la aparición de herramientas bioinformáticas de diseño o predicción de la eficacia de las secuencias guía (Liu *et al.*, 2015).

El último avance reportado consiste en un sistema llamado "Base Editor" (abreviado como BE), que fusiona la citidina desaminasa con una variante de Cas9 asociada a CRISPR para convertir la citosina (C) en uracilo (U), una base presente en el RNA y que en el DNA es naturalmente metilada a timina (T) para aumentar la estabilidad de la cadena de nucleótidos (Scannell *et al.*, 1954).

Por tanto, mediante este novedoso sistema BE se pueden generar cambios Citosina → Timina en el DNA o, debido a la complementariedad de las bases, cambios Guanina → Adenina (Komor *et al.*, 2016). Esta herramienta modifica molecularmente las bases sin provocar cortes y por tanto no depende de los mecanismos de reparación NHEJ o HDR. Este método es muy experimental y se espera que aumente la eficiencia de las terapias de enfermedades genéticas en las cuales una sola mutación de un gen es la causante de la patología, como es la  $\beta$ -talasemia o el síndrome de Huntington.

Pese a que en comparación con otras técnicas es la más precisa, el mecanismo CRISPR-Cas puede generar mutaciones aleatorias en secuencias similares a la secuencia guía, y varios equipos de investigación trabajan para reducir estos eventos. Asimismo, los vectores de entrega del sistema son muy diversos y se encuentran en continuo desarrollo, desde la utilización de sistemas víricos (Sanjana *et al.*, 2014) a la electroporación (Hashimoto & Takemoto 2015). Los últimos avances en la tecnología CRISPR han permitido desarrollar screenings funcionales a lo largo de todo el genoma, que ya han dado lugar a grandes avances en el descubrimiento de fármacos y la ciencia básica (Shalem *et al.*, 2014, Konermann *et al.*, 2015).

Además, uno de los problemas principales a la hora de modificar genéticamente un individuo es una edición incompleta de todas sus células, un suceso denominado mosaicismo, que provoca la presencia de dos o más poblaciones de células con genomas diferentes existiendo al mismo tiempo dentro de un mismo individuo. Como demuestran los estudios de mejora genética vegetal realizados por varios investigadores agrícolas (Mao *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013), el sistema CRISPR/Cas permite alcanzar los índices más bajos de individuos con mosaicismo obtenidos actualmente.

En cuanto a su uso terapéutico, la CRISPR ha permitido generar con exactitud modelos *in vitro* celulares de enfermedades genéticas, que a su mismo tiempo han sido utilizadas para demostrar que las mutaciones identificadas son las responsables directas del fenotipo enfermo, y que su transformación a un genotipo normal depende de un simple cambio. Esto se ha reflejado en novedosas estrategias terapéuticas que serán comentadas en el siguiente capítulo, y ya existen varias compañías que usan ingeniería genética basada en CRISPR siendo actualmente las tres principales Editas Medicine (Editas medicine, 2018), Intellia Therapeutics (Intellia Therapeutics, 2018), y CRISPR Therapeutics (CRISPR Therapeutics, 2018).

Es evidente que las tres técnicas permiten generar cambios en el DNA con una precisión nunca vista, y que sin su aparición la actual agitación actual del mundo de las biotecnologías no se hubiera producido con tal intensidad. Sin embargo, aunque el número de experimentos y nuevas estrategias de uso ha aumentado exponencialmente -así como bajado su precio- exponencialmente, la sociedad científica ha favorecido el uso de la CRISPR sobre el resto.

Esta fijación es justificable si consideramos las mejores prestaciones y menor precio que el sistema CRISPR ofrece frente al resto. Observando los resultados de varios estudios usando estas técnicas sobre células embrionarias de mamíferos (Hashimoto *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Mizuno *et al.*, 2014), podemos discernir que la actividad de la CRISPR es superior frente a las TALENs y ZFNs, obteniendo con la CRISPR/Cas9 mayor precisión con menor número de cortes aleatorios, o resultando en transformaciones más eficientes con transformaciones más homogéneas en todas las células del tejido afectado. Un estudio comparativo ha demostrado que la CRISPR/Cas9 inserta efectivamente el 88% del DNA total mientras que con ZFNs solo se inserta en el sitio correcto el 45% de los intentos (Sabzehei *et al.*, 2017).

Asimismo, la CRISPR presenta una mayor sencillez no sólo en su uso sino también en su desarrollo y evolución. Una prueba de esto la aporta la editorial Elsevier: en esta revista el número de artículos científicos publicados relacionados con la CRISPR triplica el número de artículos relacionado con TALENs o con ZFNs, en conjunto en los últimos 5 años. Esto puede relacionarse con las restricciones intrínsecas de las TALENs debido a su sistema de interacción con el DNA y con la base de datos de ZFNs desatendida por la comunidad científica. El hecho de poder usar varios RNA guía (gRNA) en una misma operación ofrece más versatilidad, además de que la generación de estos gRNA es mucho más sencilla que la creación de dedos de zinc.

Para realizar comparativas directas entre las distintas técnicas se ha desarrollado un sistema que utiliza la expresión proteica de la proteína fluorescente verde (GFP del inglés Green Fluorescent Protein) de forma que permite comprobar la actividad y efectividad de las herramientas de edición génica (Sabzehei *et al.*, 2017). Estos estudios comparativos han demostrado que la técnica CRISPR presenta una actividad *in vivo* más elevada que el resto de técnicas actuales.

Sin embargo, pese a sus menores prestaciones tanto TALENs como ZFNs son metodologías lícitas para modificar DNA y actualmente se encuentran también en continuo desarrollo, además de haber permitido varias estrategias terapéuticas.

Diversas TALENs han sido desarrolladas para generar pequeñas inserciones y deleciones específicas para modificar exitosamente la mutación causante de la Distrofia Muscular de Duchenne, corrigiendo la base molecular de la enfermedad en el gen de la distrofia y se ha establecido como una estrategia terapéutica válida (Li *et al.*, 2015). Asimismo, el uso de ZFNs ha sido ampliamente evaluado en oncología para combatir el melanoma metastásico (Beane *et al.*, 2015)

#### **IV. ESTRATEGIAS BIOMÉDICAS Y ENSAYOS CLÍNICOS RECIENTES MEDIANTE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS HUMANAS**

---

Pese a que la manipulación del material genético humano se remonta a los años 80 con el descubrimiento de la PCR (Mullis *et al.*, 1983) su modificación minuciosa usando precisas herramientas moleculares para corregir errores en el código genético se reservaba como un concepto solo posible en la imaginación de cineastas y escritores. Sin embargo, la aparición de las herramientas descritas anteriormente, así como de los avances en materia de cultivos y desarrollo de modelos celulares, han permitido recrear esta ficción en los laboratorios con una exactitud nunca antes vista.

La preocupación por regular estos cambios culminó en la Cumbre Internacional sobre la Edición Genética Humana (CIEGH), organizada en USA en 2015. En esta cumbre, comités multidisciplinares de expertos internacionales no solo discutieron sobre las implicaciones técnicas y científicas de esta nueva realidad, sino que también se sopesaron los enfoques éticos y legislativos asociados a estas investigaciones.

Como resultado de esta cumbre se generó una declaración sobre la modificación genética humana que se postula como un asesoramiento tanto a equipos de investigación como a legisladores de este campo. Pese a mantener una opinión favorable de estas investigaciones y su potencial beneficio en el futuro, su principal recomendación fue que las células sobre las que se efectúan modificaciones genéticas pueden formar parte de un individuo completo, pero no deberían ser capaces de formar un individuo por sí mismas.

Es por ello que antes de comenzar con la descripción de los últimos avances en esta materia, así como para comprender su escenario regulatorio y la declaración de la cumbre internacional, es importante distinguir y clasificar los tipos de modificaciones genéticas que pueden ser realizadas según el tipo de células sobre el que se realiza, ya que dependiendo del material biológico humano sobre el que se altera el DNA se establecen diferentes problemas técnicos y éticos que afectan a las normativas sobre su regulación.

Las células de un individuo sometido a ingeniería genética se catalogan en dos grupos dependiendo de si estos cambios en el genoma desaparecen con la muerte del individuo alterado o si estos cambios se mantienen en su progenie. Estos dos grupos son las células de la línea somática y las células de la línea germinal.

La diferencia entre ambos grupos reside en que los cambios en el genoma de un individuo son heredables por su descendencia si se efectúan en células de la línea germinal, y no se transmiten si se realizan en la línea somática. Existe un tercer grupo celular compuesto por células madre pluripotentes, que son células capaces de diferenciarse y formar cualquiera de los tejidos del ser humano. Este último grupo de células se ha obtenido tradicionalmente de embriones, lo que históricamente ha sido una línea de investigación controvertida debido a que implicaba la destrucción de los mismos.

No obstante, desde que el equipo de S. Yamanaka describiera en 2007 que la introducción de 4 genes relacionados con factores de transcripción en células ya desarrolladas puede provocar su inducción a células pluripotentes (denominadas iPSCs, del inglés induced Pluripotent Stem Cells), estas han sido extensamente usadas para la investigación en medicina. Debido a esta pluripotencia, las modificaciones genéticas sobre iPSCs son tratadas como modificaciones de la línea germinal o la línea somática dependiendo del tipo de células en las que se diferencien.

## 1. INGENIERÍA GENÉTICA SOBRE LA LÍNEA SOMÁTICA

La línea somática está compuesta por las células ya diferenciadas que se originan a partir de células madre embrionarias, conformando los tejidos y órganos con funciones específicas y diferentes de un individuo. Esta especificidad viene dada por el patrón de expresión del genoma, ya que estas células contienen la misma información genética. Su función puede ser reducida de una manera simplificada a asegurar el funcionamiento del sistema al que pertenece, por lo que cuando su vida se agota son reemplazadas y no son capaces de generar nuevas células distintas a ellas.

Cuando una mutación ocurre en las células somáticas, esta puede llegar a afectar gravemente al individuo como es el caso del cáncer (Kan *et al.*, 2010), pero esta mutación no se transmite a su descendencia. Asimismo, la mayoría de las enfermedades genéticas afectan a las células de línea somática, por lo que la investigación y los tratamientos se basan en la edición genética terapéutica directa sobre las células o tejidos afectados, y por tanto es un área de la medicina moderna que no está sujeta a las mismas implicaciones éticas que los cambios genéticos realizados sobre un embrión.

Por ello, se han aprobado e implementado como protocolos médicos varias modificaciones y terapias genéticas sobre la línea somática desde principios de los noventa (Blaese *et al.*, 1995) y según datos del Centro de Investigación Nacional del Genoma Humano estadounidense (NCFHGR), se han realizado desde entonces cerca de 1900 ensayos clínicos de terapia génica por todo el mundo, cuyos resultados positivos han supuesto un aumento de los conocimientos y posibilidades biomédicas.

En contraste, las complicaciones, imprevistos y resultados negativos de estos ensayos han constatado la preocupación de la sociedad sobre la modificación genética responsable, siendo el mejor ejemplo la muerte de Jesse Gelsinger en un ensayo clínico debido a una respuesta inmune contra el vector vírico usado (Marshall, 1999). A continuación, se analizan brevemente los principales avances en ingeniería genética para tratar enfermedades genéticas sobre la línea somática:

### 1.1. Terapia genética in vivo

La terapia genética es un concepto generalista que engloba diversas intervenciones, pero la definición más común es la introducción terapéutica de DNA a las células afectadas del paciente, que con su maquinaria celular generan las enzimas necesarias a partir de la información codificada entregada, o apagan genes mediante deleciones en las secuencias equivalentes a la introducida.

El cáncer es la enfermedad más comúnmente tratada mediante estas terapias, y en la actualidad consiste el 60% de los ensayos internacionales, seguidos por enfermedades monogénicas debido a la sencillez de su causa al comparar con enfermedades genéticas complejas que dependen de diversos genes mutados (Naldini, 2015).

El DNA se introduce en las células mediante vectores virales recombinantes o complejos de DNA introducidos como plásmidos o incluso con el uso de electroporación, nanopartículas. El uso de estos últimos demuestra que la terapia génica en células somáticas no siempre implica la incorporación al genoma nuclear de la secuencia de nucleótidos terapéutica (Truong *et al.*, 2015; Lambrecht *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2018).

Así, las principales formas de terapia génica actuales consisten en la introducción de copias “sana” del gen o genes en cuestión en las células afectadas y en el apagado o knock-out de los genes problemáticos (especialmente contra tumores).

China fue el primer país en aprobar terapia génica cuando en 2003 permitió el uso clínico de Gendicine™, un vector adenoviral capaz de reemplazar el gen E1 por el DNA complementario

p53 humano para tratar carcinomas escamosos (Pearson *et al.*, 2004), aunque se demostró que se había aprobado sin realizar el ensayo clínico en fase III.

Asimismo, varios ensayos clínicos de terapia genética han resultado exitosos para el tratamiento de desórdenes genéticos como la  $\beta$ -talasemia (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010; Jessup *et al.*, 2011), inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2010) hemofilia B (Jessup *et al.*, 2011) y el síndrome de Wiskott-Aldrich (Boztug *et al.*, 2010), entre otros.

Nueve años más tarde, la Agencia Europea de Medicina (EMA) aprobó por primera vez el uso de un producto terapia genética terapéutica en el territorio de la UE tras una presión intensa tanto de lobbies como política, aceptando que el beneficio derivado a los pacientes por el uso de estas terapias era mayor que los riesgos conocidos. Según la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular, actualmente en España se están llevando a cabo tres ensayos de terapia genética sobre enfermedades hereditarias y cinco ensayos oncológicos, expuestos a continuación:

- Enfermedades hereditarias:

1. Ensayo clínico Fase I/II para evaluar la seguridad y eficacia de la infusión de células CD34+ autólogas transducidas con un vector lentiviral portador del gen FANCA (medicamento huérfano) para pacientes con Anemia de Fanconi del Subtipo A. Juan Bueren (Madrid).
2. “Fase I/II de seguridad, tolerabilidad y estudio de eficacia inicial del vector viral adenoasociado serotipo 9 que contiene el gen de Sulfamidasa humana después de la administración intracerebroventricular a pacientes con Mucopolisacaridosis IIIA (síndrome de Sanfilippo A).” Fátima Bosch y Laboratorios Esteve. Barcelona.
3. “Ensayo clínico de fase I, multicéntrico, abierto, de dosis única y rango de dosis para investigar la seguridad y tolerabilidad de un vector de terapia génica rAAV2 / 5-PBGD para el tratamiento de Porfiria intermitente aguda” Gloria González-Aseguinolaza y Digna Biotech SL. (Pamplona)

- Cáncer y virus oncolíticos:

1. “Tratamiento con ICOVIR5 de tumores pediátricos refractarios o recurrentes del Sistema Nervioso Central.” Luís Madero/Manuel Ramírez Orellana; Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Salud Carlos III. Madrid.
2. “Estudio fase I, multicéntrico, abierto, de aumento de la dosis de inyección intratumoral de VCN 01 adenovirus oncolítico en combinación con gemcitabina intravenosa en cáncer de páncreas avanzado”. VCN Biosciences (Barcelona) e Instituto Catalán de Oncología (Barcelona), Centro Integral Oncológico Clara Campal (Madrid) y Hospital 12 de Octubre (Madrid).
3. “Estudio de fase I, multicentro, abierto, de aumento de dosis de la administración intravenosa de adenovirus oncolítico VCN 01 solo y en combinación con gemcitabina intravenosa en pacientes con tumores sólidos avanzados”. VCN Biosciences (Barcelona) e Instituto Catalán de Oncología (Barcelona), Centro Integral Oncológico Clara Campal (Madrid) y Hospital 12 de Octubre (Madrid).

4. “Ensayo clínico de fase I de la administración endovenosa de un adenovirus condicionalmente replicante ICOVIR-5 en pacientes con melanoma maligno localmente avanzado o metastásico.” Instituto Catalán de Oncología. Barcelona.
5. “Ensayo clínico de fase I de adenovirus oncolítico Delta-24-RGD y temozolomida para el tratamiento del glioblastoma en la primera recurrencia.” Sonia Tejada y Marta Alonso. Clínica Universidad de Navarra.

## **1.2. Transplantes de células y tejidos modificados genéticamente ex vivo**

Recientemente se han desarrollado varias estrategias ex vivo de manipulación genética y seguida introducción de células somáticas sanas en el paciente. Estas células pueden proceder del mismo paciente, o pueden ser de un donante genéticamente similar pero no idéntico, o incluso células manipuladas de un animal. Estas células o tejidos modificados pueden ser entregados al paciente por varios métodos como la infusión, inyección o la implantación quirúrgica de los agregados.

Estas estrategias comprenden la implantación de células como una fuente in vivo de enzimas o citoquinas, la infusión de células inmunes modificadas para el reconocimiento y ataque de células específicas como linfocitos T modificados genéticamente para presentar receptores de antígenos específicos para las células cancerígenas y la introducción de tejidos modificados genéticamente para el remplazo de poblaciones celulares complejas como los islotes pancreáticos.

Con el advenimiento y desarrollo de las iPSCs, esta técnica de procesado y reinsertión ha avanzado considerablemente, ya que ha permitido la creación de células pluripotentes del paciente reduciendo considerablemente la aparición de las posibles respuestas inmunes que se dan con células madre alogénicas o xenotrasplantes. Esta estrategia terapéutica personalizada a cada paciente usando sus iPSCs se ha denominado estrategia “patient to patient”.

Estas iPSCs, una vez corregidas su material genético, se implantan como precursores celulares permitiendo al paciente generar células sanas por sí mismo, aunque la tecnología actual hace necesaria la transfusión periódica de estas células precursoras sanas. Aparte, son muy útiles para la investigación directa de las causas de las enfermedades genéticas. En 2010, Kazuki et al. corrigieron in vitro la mutación genética de la Distrofia Muscular de Duchenne sobre iPSC generadas a partir de fibroblastos de pacientes.

Las iPSC también se pueden usar para generar varias células que pueden ayudar a la reparación de tejido dañado al poder derivar de ellas una gran cantidad de material físico, pero están restringidos por factores como la entrega segura, aparición de efectos adversos y la estandarización necesaria para obtener una gran cantidad de iPSCs puras de gran calidad. También se utilizan tratamientos de iPSCs para tratar diversas inmunodeficiencias, como el sistema inmune prolongado, un trastorno autosómico recesivo o relacionado con X que afecta la función de los neutrófilos, deficiencia causada por mutaciones en el regulador de la actina del citoesqueleto en la línea hematopoyética (Braun *et al.*, 2014; Lizuka *et al.*, 2015).

Además, existen líneas de investigación que tratan de generar órganos in vitro a partir de iPSCs (Takebe *et al.*, 2013), que aunque no tiene expectativas de generar resultados revolucionarios en el futuro cercano, podrían evitar la escasez de órganos donados.

## 2. INGENIERÍA GENÉTICA SOBRE LA LÍNEA GERMINAL

Las modificaciones genéticas en la línea germinal son aquellos cambios que se heredan por la progenie del individuo alterado. Estos cambios se pueden realizar sobre los gametos que luego generarán un individuo, como sobre un embrión en estado temprano, donde el pequeño número de células del individuo permite la modificación de todo el material genético de su cuerpo, lo que es técnicamente posible en un individuo con millones de células. Asimismo, los cambios en el genoma de iPSCs que más tarde diferencien en espermatozoides u ovocitos son modificaciones a la línea germinal ya que según se dijo en la CIEGH, en la práctica se considera una modificación en la línea germinal a los cambios que estarían presentes en todas las células del bebe resultante.

### 2.1. Gametos

Una alteración en el genoma de una célula germinal, sea espermatozoide u ovulo, se considera una modificación de la línea germinal ya que a partir de la unión de los genomas haploides de esas células deriva el genoma diploide del individuo. Varios estudios han tratado de modificar tanto gametos masculinos como femeninos, con un éxito sin precedentes. Varios equipos han conseguido reparar mutaciones causantes de enfermedades y desordenes genéticos en células de espermatogonia y espermatoцитos de ratón, cerdo y vaca (Yusuan *et al.*, 2015), y varias voces ya afirman que la ingeniería genética de gametos se postula como el futuro de la industria ganadera. Asimismo, mediante la ingeniería genética de espermatozoides se han obtenido animales capaces de expresar la GFP, que han supuesto en protestas de varios grupos animalistas en el ámbito internacional que consideran estas investigaciones como un paso previo al desarrollo de mascotas fluorescentes (Seita *et al.*, 2017).

Los gametos femeninos son más editables y manipulables en comparación con los espermatozoides debido a su naturaleza, capacidad de supervivencia y características bioquímicas y de desarrollo. Por tanto, mientras que en la mayoría de estudios sobre los gametos masculinos se realizan modificaciones sobre las células precursoras del espermatozoide maduro, en el caso femenino se realizan sobre el óvulo desarrollado directamente. En un estudio realizado sobre primates, se modificaron varios óvulos mediante tecnología retroviral obteniéndose cinco macacos Rhesus transgénicos con síndrome de Huntington inducido, que serían usados como modelo de la enfermedad para investigaciones posteriores (Yang *et al.*, 2008).

La ingeniería genética terapéutica en gametos humanos se remonta a 2015 cuando varios investigadores de la Harvard Medical School de Inglaterra usaron la CRISPR in vitro sobre óvulos humanos cultivados a partir de tejido ovárico en el laboratorio para corregir el gen BRAC1 defectuoso, que se relaciona con varias formas heredables de cáncer ovárico y de mama. Otros estudios han demostrado que la edición genética en gametos es más eficiente que en pre-embriones al presentar un menor nivel de mosaicismo (Ma *et al.*, 2017).

Asimismo, los cambios realizados en células iPSC que luego derivan en gametos también son cambios en la línea germinal, si esos gametos son viables y por tanto capaces de dar un individuo (Hayashi *et al.*, 2011). En 2012, un individuo que acaecía de azoospermia no obstructiva, que significa que no produce espermatozoides, fue reclutado para un proyecto en el que a partir de células de la piel inducidas a iPSCs y posteriormente insertadas en los vasos seminíferos de un ratón se obtuvieron gametos humanos primitivos con la información genética del individuo, cuya maduración les daría la capacidad de fecundar un ovocito (Easley *et al.*, 2012).

Esta línea de investigación y las que después se han desarrollado a partir de ella han resultado polémicas en lo que la prensa más amarillista ha acuñado como “gametos sintéticos”. En Japón, un equipo de investigación ha logrado el nacimiento de ratones a partir de óvulos obtenidos *in vitro* mediante reprogramación de células de la cola a iPSCs (Hikabe *et al.*, 2016).

Acorde a los comités de expertos y tratados internacionales se engloban en el presente trabajo estas investigaciones y por cuestión de brevedad no se van a discutir las implicaciones tanto científicas como éticas de estos experimentos, pero sin embargo hay que remarcar que son ciertamente interesantes y en el futuro se espera que se abra un nuevo debate sobre este área de la biomedicina y la reproducción humana, con conceptos tan interesantes como la posibilidad de un fallecido de reproducirse o la creación de óvulos a partir de células de un hombre y espermatozoides de células de una mujer.

Además, es importante destacar que los cambios en el mtDNA de los gametos también son heredables por la descendencia y por tanto su modificación genética se consideraría modificación germinal. El mtDNA ha estado tradicionalmente ligado a la línea materna, afirmando que las mitocondrias del espermatozoide se ubiquitinizan y degradan tras la fusión con el ovulo, quedando solo las mitocondrias del ovocito en el pre-embrión, y por tanto solo mtDNA materno.

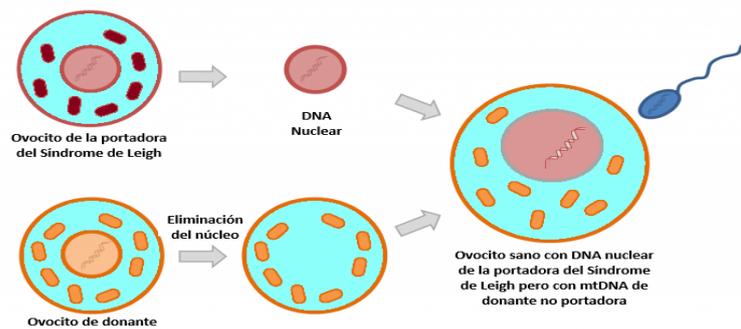
Sin embargo, varios estudios han afirmado que el mtDNA paterno puede sobrevivir este proceso (Alexander *et al.*, 2015), y a día de hoy es un tema abierto de investigación, aunque el consenso actual se resume en que, pese a que una pequeña porción del mtDNA paterno puede ser transmisible, este es tan reducido que se puede considerar despreciable (Yu *et al.*, 2017). A todos los aspectos, cualquier edición de mtDNA en esperma, óvulos o pre-embiones se considera una modificación germinal.

Sin embargo, las intervenciones en cuanto a esta información genética almacenada en las mitocondrias no están delimitadas claramente. En Septiembre de 2016, una pareja jordana tuvo un bebe sano. Esto no sería noticia si no fuera porque más de un cuarto de las mitocondrias de la madre tenían la mutación que causa el Síndrome de Leigh, una terrible enfermedad mitocondrial hereditaria que, en el caso de que el ovulo fecundado tuviera un alto número de estas mitocondrias mutadas (Thorburn *et al.*, 2016), causan una pérdida de movilidad gradual hasta causar la muerte del niño por fallo respiratorio (Leigh, 1951).

Esta enfermedad mitocondrial no tiene una manera precisa de cribado, pues en la enfermedad están implicados más de 75 genes (Lake *et al.*, 2016). La pareja, ya desesperada por la pérdida de dos hijos a las edades de 8 meses y 6 años y sabiendo por experiencia propia la inutilidad del cribado, acudió a la clínica de fecundidad neoyorquina del reputado doctor James Grifo en busca de ayuda para concebir un bebé sano.

El motivo de esta visita se debe a que el Dr. Grifo es uno de los creadores de una nueva técnica de reproducción asistida diseñada para evitar este tipo de enfermedades mitocondriales. Hace más de 15 años, fue el pionero de esta técnica obteniendo crías de ratón completamente sanas en su laboratorio (Grifo *et al.*, 2002). La técnica consiste en mover el material genético nuclear del óvulo de la madre afectada a un óvulo donado al que se elimina el DNA contenido en el núcleo, de forma que se obtiene un óvulo completamente sano con el material genético nuclear materno, pero con las mitocondrias sanas de un donante.

Por tanto, una vez fecundado por el padre, el embrión contiene el material genético paterno y materno en su núcleo diploide y el material genético del donante en forma del mtDNA en el interior de sus mitocondrias, por lo que hereda el genoma de 3 individuos (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema básico del proceso de transferencia mitocondrial ideado por el Dr. Grifo  
(Fuente: elaboración Propia)

Este tecnicismo fue explicado por la prensa americana como “Bebés de tres padres”, lo que supuso una prohibición explícita de esta técnica hasta la aprobación de la misma por los órganos gubernamentales de EE.UU. y sus comités de expertos, un proceso burocrático que por lo general requiere del paso de muchos años. Sin embargo, y demostrando con esto que las regulaciones nacionales delimitan en las fronteras, el Dr. Grifo les recomendó visitar a un antiguo pupilo practicante en México, el Dr. Zhang. En la legislación mexicana, esta técnica no estaba ni aprobada ni permitida, simplemente no se ha regulado su uso, por lo que era una intervención contraria a la norma, aunque no considerada por la ley. El Dr. Zhang había realizado este protocolo con anterioridad de manera exitosa en 2003 en China, donde la regulación de esta técnica es más permisiva. No causó el revuelo que causó en 2016 porque su paciente tuvo un parto prematuro y sus gemelos murieron en el parto, sin tener relación su muerte con la intervención mitocondrial.

Tras obtener el consentimiento informado de la pareja, se procedió con la intervención y, tras nueve meses, nació un niño completamente sano, cuyo seguimiento los siguientes 5 meses demostró que no estaba afectado por el Síndrome de Leigh. Este éxito se ha traducido en la aprobación de transferencias mitocondriales como técnica para la reproducción asistida por el Reino Unido y el comienzo de varias líneas de investigación sobre el asunto, a la vez que demuestra la facilidad para realizar una intervención genética de manera clandestina.

## 2.2. Investigación sobre pre-embryones

Cuando ocurre la fecundación del óvulo por el espermatozoide, ambas células se fusionan para formar un cigoto. Esta es la primera célula con el genoma completo de un organismo, de la que todas derivan más tarde. En los primeros días del cigoto, esta célula comienza a dividirse exponencialmente, y el número de células que componen un organismo pluricelular aumenta.

Por tanto, no es de extrañar que el primer animal transgénico se obtuviera en 1974 mediante la alteración genética directa sobre el cigoto temprano, ya que cualquier cambio genético en estas primeras etapas de división celular se encuentra presente en todas las células del individuo desarrollado, incluidos sus células sexuales, por lo que este cambio es heredable por su descendencia (Jaenisch & Mintz, 1974).

Además, cuanto menos células componen un individuo, como es el caso de los embriones tempranos, es más probable editar el genoma de todas sus células evitando el mosaicismo. Es por ello que la ingeniería genética sobre embriones en etapas tempranas provoca cambios en la línea germinal y afecta a la posible descendencia de estos.

Con mayor o menor eficiencia, todas las técnicas de edición genética han sido testadas sobre embriones de diversos animales para producir animales transgénicos cuyo fenotipo ha sido clave para la investigación avanzada.

El animal modelo para la investigación sobre embriones, así como generalmente para la investigación en mamíferos, es el ratón común *Mus musculus*. Los métodos de ZFNs, TALENs y CRISPR se han usado para producir ratones sintéticos con genes apagados, insertados o mutados que actualmente sirven como modelos para ámbitos de investigación como la inmunología y la oncología (Pagant *et al.*, 2018, Wefers *et al.*, 2016), reemplazando los modelos anteriores. Una de las principales ventajas del uso de estas técnicas es la menor incidencia de mutaciones aleatorias, así como la capacidad de generar cambios minúsculos imposibles de realizar por otros protocolos más antiguos de una manera tan sencilla y rápida. Además, el uso de estas nuevas técnicas evita el uso de varias generaciones, obteniendo animales completamente alterados en un solo paso, especialmente mediante el sistema CRISPR (Liu *et al.*, 2017).

En el protocolo de experimentación estándar, el sistema de edición genética se inyecta sobre el pronúcleo (Mizuno *et al.*, 2014) o el citoplasma de los embriones (Doe & Boroviak 2018). Dependiendo del sistema, más tarde la corrección en el genoma es comprobada antes de su implantación mediante un cribado o *screening* genético que permite seleccionar los embriones cuya mutación ha sido corregida y no muestran errores o cortes aleatorios en su patrón genómico. Es importante indicar que estos *screenings* son incapaces de detectar cambios fuera del sitio de corte que presentan una frecuencia inferior al 0.1% (Daesik *et al.*, 2015), por lo que la detección de pequeños errores causados por la manipulación genética esta en continuo desarrollo. La capacidad de estas técnicas para la curación de enfermedades genéticas ha sido ampliamente comprobada sobre ratones en varios estudios, evitando la aparición de desordenes como la Distrofia muscular de Duchenne (Long *et al.*, 2015) o las cataratas congénitas (Wu *et al.*, 2015). En primates la se ha reportado que la microinyección de TALENs o Cas9 sobre cigotos es capaz de corregir un evento indel de un solo gen con una eficiencia cercana al 50% por embrión (Niu *et al.*, 2014).

En el caso de la investigación sobre pre-embryones humanos, esta se ha encontrado siempre bajo la lupa debido a varios motivos éticos y legales. De hecho, y esto se ampliará en el siguiente apartado, los países que permiten la investigación sobre embriones humanos son una minoría. En la mayoría de estos países, los embriones usados para la investigación provienen principalmente de los descartes de clínicas de fertilidad o de bancos de almacenamiento congelados, embriones no utilizados en los procesos de reproducción asistida.

Por lo general estos embriones usados para la investigación genética se encuentran en un estado de desarrollo superior al tercer día desde la fecundación, y por tanto han progresado tanto en su diferenciación que la edición genética resulta imperfecta y suelen mostrar mosaicismo normalmente (Zhou *et al.*, 2015). Sin embargo, existen países donde la creación de pre-embryones humanos para fines de investigación científica está permitida, y en ellos estas novedosas técnicas han sido aplicadas exitosamente sobre embriones frescos.

El primer estudio modificando genéticamente embriones humanos y demostrando la eficiencia de la CRISPR/Cas9 para la edición de la línea germinal en la primera fase de desarrollo de embriones humanos se publicó en 2015.

En este estudio, un equipo de investigación chino intento corregir en 54 muestras el gen *HBB* que codifica la beta-globina, cuya mutación provoca la  $\beta$ -talasemia, una enfermedad sanguínea genética fatal. (Liang *et al.*, 2015). Pese a que los embriones uninucleares triplonucleados usados en este experimento no eran viables ni capaces de desarrollarse eficientemente, se comprobó que efectivamente se había alterado el sitio de la mutación en el 28 de los embriones (52%), aunque solo en 4 (14.3%) esta mutación había sido reparada efectivamente usando la copia no mutada de DNA introducida como plantilla para la reparación HDR.

Asimismo, se observó que varios embriones contenían una elevada proporción de mutaciones aleatorias.

No obstante, este estudio demostró la sencillez de esta intervención, y sus alentadores aunque mejorables resultados causaron la proliferación de multitud de experimentos para investigar la posibilidad de corregir terapéuticamente enfermedades genéticas en embriones, motivados por varias organizaciones científicas o gubernamentales que rápidamente se han visto obligadas a tener que aclarar su posición sobre el uso de embriones y métodos de ingeniería genética, llegando a pegar auténticos giros de 180 grados sobre sus recomendaciones anteriores.

Una segunda investigación china surgió en marzo de 2016. Esta vez se modificó el gen codificante de la C-C quimiocina receptora de tipo 5 (CCR5), uno de los co-receptores principales que el virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 utiliza para infectar células humanas. Mediante HDR se pretendió generar el alelo nulo CCR5-Δ32 que se encuentra en una frecuencia elevada en poblaciones no europeas de manera natural y que provoca una resistencia a la infección por el virus VIH (Kang *et al.*, 2016). Por tanto, no se corrigió un defecto congénito propiamente dicho, ya que el objetivo del experimento era generar embriones que presentaran una resistencia natural, pero para nada frecuente en la población asiática introduciendo un alelo beneficioso.

Los resultados obtenidos fueron comparables a los del primer equipo. El porcentaje de embriones transformados fue bajo, pero esta vez se comprobaron diversos métodos de edición genética por CRISPR, y se observó que el uso de la Cas9 junto a 2 RNAs guías (gRNA1 y gRNA2) en conjunto resultaba el más efectivo, generando 4 embriones con el alelo CCR5-Δ32 y con el menor número de eventos NHEJ. Asimismo, en este experimento se analizaron las mutaciones aleatorias causadas por la CRISPR. Para comprobarlo, se obtuvieron mediante herramientas bioinformáticas las secuencias en el genoma capaces de ligar potencialmente a los gRNA usados debido a su complementariedad de bases parcial.

Una vez obtenidos, y después de modificar genéticamente los embriones, se ampliaron mediante PCR las secuencias con más posibilidad de unión al gRNA usado, 11 sitios para el gRNA1 y 17 para el gRNA2. La secuenciación mostró un índice de errores muy reducido, y en los embriones modificados con ambos gRNAs en conjunto no se obtuvo ningún error. En conclusión, se obtuvieron 6 embriones humanos modificados satisfactoriamente para obtener resistencia al VIH-1 y sin causar errores en su genoma.

En ambos casos, el uso de embriones 3PN se motivó para evitar problemas éticos y sociales, ya que pese a que estos embriones son capaces de desarrollarse *in vitro* en condiciones de laboratorio hasta los 14 días, son incapaces de sobrevivir mucho más y menos una gestación, de forma que cualquier acusación a los investigadores de crear humanos modificados genéticamente carece de fundamento. Pero existen investigaciones de ingeniería genética sobre embriones 2PN, incluso sobre embriones completamente sanos.

De hecho, apenas medio año después de las publicaciones chinas, un investigador en Suecia causó un gran revuelo al levantar el tema tabú del uso de embriones sanos y comenzó un proyecto de investigación sobre los mecanismos de desarrollo del embrión temprano que actualmente se encuentra en desarrollo.

Este proyecto implica el uso de la CRISPR/Cas9 sobre embriones diploides completamente viables, sobrantes de los tratamientos de reproducción asistida de la clínica en la que trabajaba y, evidentemente, obtenidos con el consentimiento de los donantes para la investigación.

Las noticias de esta investigación llevaron a varias organizaciones a admitir la necesidad de revisar las recomendaciones en común para estas investigaciones, ya que aunque las líneas rojas establecidas en la CIEGH no se habían propasado, se quería evitar la aparición masiva de ensayos clínicos embrionarios que podrían trivializar todos los avances científico técnicos obtenidos por poner la opinión publica en su contra.

Pero el punto de inflexión en la modificación genética de embriones para la cura de enfermedades hereditarias recesivas ocurrió en verano de 2017 cuando un equipo de investigación editó el gen MYBPC3 mediante un novedoso protocolo basado en CRISPR/Cas9 y diseñado para aumentar la precisión de los cortes y el número de reparaciones HDR (Ma *et al.*, 2017). Al ser una mutación heterocigótica, no se necesitó DNA de un donante, ya que los embriones contenían una copia del gen normal y una copia del gen patógeno, y por tanto no se introdujo DNA foráneo al individuo. Mediante la modulación de la etapa del ciclo celular en el momento del corte, se logró evitar la aparición de mosaicismo y lograr un elevado número de embriones con ambas copias del gen normal, sin provocar mutaciones aleatorias.

Tras el éxito chino, Inglaterra aprobó por primera vez la modificación genética de embriones completamente sanos para estudiar los mecanismos del desarrollo embrionario. Este experimento tuvo como objetivo investigar la función del factor de transcripción OCT4 sobre la pluripotencia y el desarrollo del embrión, mediante la modificación genética del gen para provocar inserciones, deleciones y cambios de bases (Fogarty *et al.*, 2017). Este tipo de experimentación directa sobre el genoma ha supuesto un gran avance en la comprensión y los conocimientos para controlar el desarrollo de embriones humanos preimplantación para tratamientos de reproducción asistida como para la medicina regenerativa basada en células madre, y se espera que afloren más líneas de investigación derivadas de esta.

Poco más tarde, otro equipo corrigió el genoma de embriones afectados de  $\beta$ -talasemia cambiando un único nucleótido del gen HBB mediante un sistema BE que modificó molecularmente la base 28 transformando la Adenina en Guanina. Debido a la dificultad para encontrar suficientes embriones que tengan esta extraña doble mutación, el equipo investigador creó embriones humanos clonados a partir de células del fibroblasto de un paciente con la mutación homocigótica.

Estos embriones derivados de células del paciente, tras la manipulación genética, resultaron en embriones completamente transformados con una eficiencia del 23% de los embriones modificados y además obtuvo el índice más bajo de mosaicismo alcanzado en la actualidad. (Liang *et al.*, 2017) Asimismo, el hecho de no generar DSB evitó la aparición de mutaciones aleatorias por reparación NHEJ.

En Estados Unidos, el primer experimento para la corrección de genes patógenos sobre embriones fue aprobado a finales de 2016 al mismo tiempo que la Academia Nacional de Ciencias daba luz verde a estas líneas de investigación a nivel nacional. Según declaraciones del equipo investigador, liderado por el primer hombre en generar clones humanos, se han evitado los problemas de mosaicismo, ediciones incompletas y cambios aleatorios que presentan el resto de los experimentos anteriores a fecha de hoy. No obstante, este experimento se encuentra en desarrollo y por tanto no se puede comentar nada más en el presente trabajo hasta que se publiquen sus resultados.

## VI. LEGISLACIÓN VIGENTE

---

La regulación de la ingeniería genética se remonta a los inicios de esta, a la aparición de las primeras cadenas de DNA recombinantes obtenidas en 1975. El clima geopolítico de ese año significó que el principal objetivo de las primeras leyes adoptadas fuera evitar principalmente la aparición de microorganismos patógenos capaces de resistir los antibióticos conocidos por entonces, fuera esta aparición accidental o causada por laboratorios de exaltados Ministerios de Defensa en plena Guerra Fría.

Pese a que pocos países tenían la capacidad técnica de modificar genéticamente un organismo, el advenimiento de la estabilidad mundial y la acertada previsión de que estas tecnologías pasarían a ser más asequibles y sencillas conllevó a que paulatinamente en los siguientes 20 años se adoptara por todo el mundo legislaciones a nivel nacional. Estas no sólo se elaboraron para cubrir estas operaciones de edición, sino que también se diseñaron para englobar a los organismos genéticamente modificados (OGM) resultantes de las mismas, siendo las regulaciones de semillas y cultivos OGM el caso más llamativo y mediático actual en Europa.

No obstante, los avances en materia de edición genética descritos anteriormente y la aparición de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) provocaron que se comenzara a considerar la regulación de la manipulación genética no sólo en campos de cultivo y placas Petri, sino como una técnica utilizable sobre seres humanos. Esto es intrínseco a esta rama de la medicina moderna, ya que la mejora de los TRA implica la investigación directa no sólo de células germinales humanas, sino también sobre embriones.

Por tanto, la mayoría de las normativas a nivel nacional de las investigaciones sobre el uso de ingeniería genética a nivel nacional se establecen en las legislaciones que regulan los TRA. Sin embargo y como se mostrará a continuación, como estas legislaciones surgen de los principios de derecho y valores diferentes de cada país nos encontramos una gran disparidad no sólo en la regulación de la ingeniería genética como herramienta terapéutica, sino incluso en el uso de pre-embryones para la investigación.

### 1. TRATADOS INTERNACIONALES

Los avances en la tecnología y la aparición de servicios genéticos fueron previstos antes de obtenerse siquiera la secuencia del genoma humano, y por ello en 1997 la UNESCO declaró el genoma humano como patrimonio de la humanidad, estableciendo que *“Una investigación, un tratamiento o un diagnóstico en relación con el genoma de un individuo, sólo podrá efectuarse previa evaluación rigurosa de los riesgos y las ventajas que entrañe y de conformidad con cualquier otra exigencia de la legislación nacional.”* para evitar así el uso inapropiado por parte de intereses privados de la información genética.

En este mundo globalizado tras el advenimiento de la estabilidad mundial y ya reconocido el beneficio para la salud humana que la ingeniería genética significa se han firmado tratados internacionales para intentar sentar unas bases que regulen de forma básica la investigación sobre el genoma humano y la modificación germinal, así como para facilitar la cooperación internacional y la adaptación veloz de los resultados experimentales en el ámbito clínico. A continuación, y antes de analizar que permiten las legislaciones nacionales vigentes para la ingeniería genética terapéutica sobre embriones, se describen los dos convenios internacionales más importantes en Genética y Biomedicina: la Declaración de Helsinki y el Convenio de Oviedo.

## 1.1. La Declaración de Helsinki y el Consentimiento Informado (CI)

La Declaración de Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Humanos (conocida como la Declaración de Helsinki debido al lugar de creación) fue creada en 1964 por la Asamblea Médica Mundial (AMM) y ha sido modificada 9 veces desde entonces, siendo realizada la última enmienda en 2013. La Declaración de Helsinki sienta los principios éticos de la investigación médica sobre seres humanos, así como sobre su material biológico y la información codificada en su biología.

Establece que la investigación biomédica debe proteger la salud y derechos individuales de los individuos que participan en esta (Artículo 7) y aunque aprueba que *“La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo y los costos para la persona que participa en la investigación.”* en su Artículo 16, establece que el objetivo de una investigación nunca puede ser más importante que los derechos e intereses de estos individuos. Por tanto, declara que los principios éticos siempre se considerarán antes que las regulaciones vigentes.

El concepto más importante que aporta la Declaración de Helsinki es el Consentimiento Informado (CI). Establece que cualquier individuo que participe en un estudio médico debe dar su aceptación libre y voluntaria a ser parte de este, tras *“recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento, estipulaciones post estudio y todo otro aspecto pertinente de la investigación.”*

Esto es un punto clave que tiene especial repercusión en la investigación sobre embriones humanos, ya que es imposible obtener el CI de estos individuos, y además hay que considerar que los cambios genéticos heredables realizados sobre los embriones también afectarían a su futura descendencia, la cual tampoco es capaz de dar su consentimiento.

No obstante, estas investigaciones se han producido, como se ha descrito anteriormente. Esto se debe a que la Declaración de Helsinki permite la investigación sobre individuos incapaces de otorgar el CI si se cumplen unos requisitos:

1. Según el Artículo 28, un individuo puede ser incluido en el estudio si su representante legal otorga el CI. En el caso de embriones, el representante legal se establece como las personas de las cuales a partir de sus gametos deriva el embrión, sus padres biológicos. En la práctica, los embriones utilizados en investigación proceden de los sobrantes al realizar un TRA, principalmente. Estos embriones no implantados tienen tres destinos: su destrucción, su donación a la investigación y su congelación para tratamientos u investigaciones futuras.
2. Asimismo, este mismo artículo establece que un embrión sólo puede ser incluido en una investigación que le conlleve posibilidades de beneficio, y sin embargo los embriones usados en investigaciones de ingeniería genética han sido destruidos posteriormente. Esto se debe a que también permite la inclusión de un individuo cuando el objetivo de esta es promover la salud del grupo representado por el individuo, que en el caso de las investigaciones realizadas sobre embriones no viables implica la mejoría de la salud de individuos afectados de enfermedades genéticas.
3. Por último, en su artículo 30 establece que se puede incluir en una investigación a un individuo que es incapaz de dar el CI incluso sin el CI de su representante legal cuando este individuo presenta una condición física/mental que impide dar el CI y esta condición es característica del grupo investigado.

Este es el caso de los embriones afectados de enfermedades genéticas fatales que impiden su desarrollo y por tanto su CI, como los embriones usados en la investigación china publicada en verano de 2017, cuyos problemas provocan la muerte de los individuos afectados poco después del parto.

Por tanto, la Declaración de Helsinki permite la investigación biomédica sobre embriones que padecen enfermedades genéticas, ya que por regla general la Declaración de Helsinki está escrita de una manera que permite una interpretación bastante condescendiente de los beneficios potenciales de la investigación.

Sin embargo, es importante resaltar que pese a ser un gran signo de autocontrol, esta declaración emana de la comunidad científica a modo de regulación interna y por tanto no es legalmente vinculante. Esto significa que la autoridad para aprobar una investigación emana de la legislación del país donde se realiza, lo que explica la utilización de embriones sanos en Suecia para explotar las posibilidades de la CRISPR.

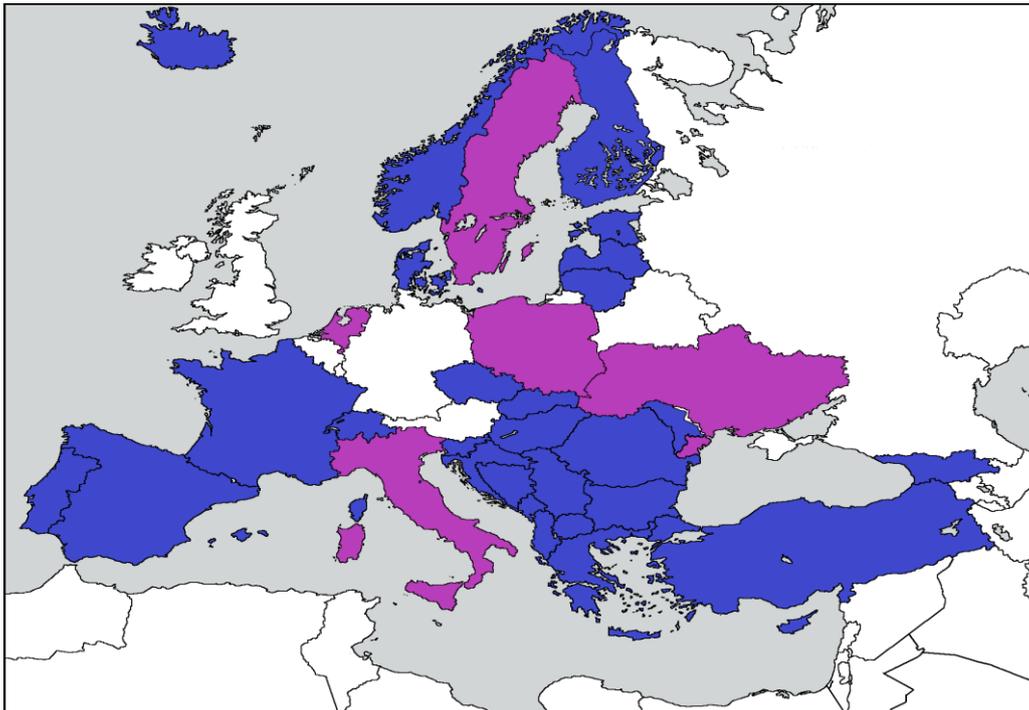
Pese a esto, es un documento muy importante cuyo contenido influye sobre la legislación nacional de países donde se investiga la curación de enfermedades genéticas. De hecho, su influencia en la ética científica internacional es tan notable que algunos países han decidido rechazar las versiones más actuales y que cubren conceptos de ingeniería genética en aras de versiones más permisivas en las que simplemente se cubren conceptos más básicos de la ética. Este es el caso de la Unión Europea, que en sus directivas para ensayos médicos solo reconoce la versión de 1996.

Esto se debe principalmente a discrepancias éticas sobre el uso del placebo en los protocolos de investigación clínica farmacológica, pero es un gran ejemplo de cómo al fin y al cabo esta Declaración es más una directriz que establece las pautas que los investigadores deberían seguir, y no una normativa que establece que se permite y que no. Asimismo, EE.UU. también renegó de las versiones posteriores a 1996 y en 2008 anunció el remplazo de la Declaración de Helsinki por su mucho más permisiva “Good Clinical Practice”, eliminando todas las referencias a la declaración de sus directrices y normativas nacionales. La Unión Europea armonizó rápidamente estas directivas con la versión de 1996 de la Declaración y actualmente referencia ambas para sentar las bases éticas de los ensayos clínicos realizados.

## **1.2. El Convenio de Oviedo**

El Convenio Europeo sobre los derechos humanos y la biomedicina: Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina se creó en 1997 y es habitualmente es denominado Convenio de Oviedo (CdO) por su lugar de firma. Al contrario que la Declaración de Helsinki, el CdO si es vinculante, de forma que los firmantes están obligados a seguir sus directrices, aunque permite la adopción de medidas de protección adicionales por parte de los países firmantes, así como la formulación de reservas a sus artículos cuando la legislación nacional permite algo que esta prohíbe y la designación del territorio nacional donde estas normativas se aplican o no. Este convenio europeo ha sido firmado por 33 países europeos y ratificado por 28 (Figura 6).

La intención de este Convenio es establecer el marco legal europeo común para asegurar la dignidad e integridad del ser humano y las generaciones venideras frente al desarrollo de la biotecnología y la medicina, tomando como punto de partida la Declaración Universal de los Derechos Humanos. En el Convenio se sientan las bases de la privacidad y el derecho del paciente o participante en una investigación biomédica a decidir conocer la información con respecto a su salud (Artículo 8).



**Figura 5.** Países firmantes del Convenio de Oviedo. En azul se indican los países que han firmado y ratificado el convenio. En morado se indican aquellos países que firmaron el Convenio, pero no lo han ratificado en sus legislaciones vigentes y por tanto no pueden penalizar legalmente la no adhesión a la normativa del convenio. Debido a la situación geopolítica actual no se aplica el convenio en todo el territorio de Moldavia (Transnistria) ni Ucrania (Crimea). Elaboración propia a partir de la lista de firmas del tratado en la web del Consejo Europeo ([https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/164/signatures?p\\_auth=JmhWTxvH](https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/164/signatures?p_auth=JmhWTxvH) consultado el 14/05/2018).

En cuanto a la investigación embrionaria, el CdO establece en el Artículo 18 que estas investigaciones son legales en aquellos países donde su legislación lo permita. Sin embargo, sentencia que la creación de embriones con el mero objetivo de investigar está prohibido, lo que explica la no adhesión a este convenio de algunos países europeos que sí lo permiten como Reino Unido y Bélgica.

Asimismo, se retoma el concepto de consentimiento en su artículo 5, como un acto libre, voluntario y completamente informado que se basa en el principio de la autonomía del individuo, lo que una vez más choca con el uso de embriones para ensayos clínicos. No obstante, al igual que en la Declaración de Helsinki, establece que el CI puede omitirse en situaciones de emergencia mientras sea en beneficio del individuo.

En cuanto al problema del CI embrionario, el CdO lo resuelve estableciendo que estas investigaciones y tratamientos pueden realizarse de modo excepcional y en las condiciones de protección previstas por la ley cuando *“El experimento tenga por objeto, mediante una mejora significativa del conocimiento científico del estado de la persona, de su enfermedad o de su trastorno, contribuir a lograr en un determinado plazo resultados que permitan obtener un beneficio para la persona afectada o para otras personas de la misma categoría de edad o que padezcan la misma enfermedad o el mismo trastorno, o que presenten las mismas características.”*

No obstante, el apartado más importante de este convenio en relación a la modificación genética terapéutica de la línea germinal para la erradicación de enfermedades genéticas se encuentra en el Capítulo 4: Genoma Humano del convenio. A continuación, se exponen los 4 artículos incluidos en este apartado:

*Artículo 11. No discriminación.*

- *“Se prohíbe toda forma de discriminación de una persona a causa de su patrimonio genético.”*

*Artículo 12. Pruebas genéticas predictivas.*

- *“Sólo podrán hacerse pruebas predictivas de enfermedades genéticas o que permitan identificar al sujeto como portador de un gen responsable de una enfermedad, o detectar una predisposición o una susceptibilidad genética a una enfermedad, con fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado.”*

*Artículo 13. Intervenciones sobre el genoma humano.*

- *“Únicamente podrá efectuarse una intervención que tenga por objeto modificar el genoma humano por razones preventivas, diagnósticas o terapéuticas y sólo cuando no tenga por finalidad la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia.”*

*Artículo 14. No selección de sexo.*

- *“No se admitirá la utilización de técnicas de asistencia médica a la procreación para elegir el sexo de la persona que va a nacer, salvo en los casos en que sea preciso para evitar una enfermedad hereditaria grave vinculada a sexo.”*

Al leer estas disposiciones, nos encontramos con un panorama bastante ambiguo que requiere de un análisis en profundidad de cada artículo para comprender sus implicaciones sobre la terapia genética de enfermedades hereditarias sobre embriones. Para comenzar, el artículo 11 impide la discriminación basada en la genética, lo que impediría cambios en el DNA no motivados por decisiones sobre la salud. Igualmente, el artículo 12 impide realizar PGS para fines no médicos o de investigación, lo que permitiría su realización sobre la sospecha de presencia de mutaciones patógenas.

El artículo 14 explica que realizar un PGS sobre embriones para elegir el sexo del embrión implantado solo se permite cuando esta elección sirve para evitar una enfermedad ligada al sexo. Por tanto, amplía la información de los artículos 11 y 12, ya que especifica que esta selección del sexo se basa en causas médicas y por lo tanto no es una decisión discriminante.

Estos tres artículos protegen y respetan a cualquier individuo basado en su genoma, y permiten realizar elecciones biomédicas basadas en la información contenida en su DNA. Pero es en el artículo 13 donde el convenio realmente indaga en las modificaciones genéticas. Pese a que permite las intervenir el genoma humano para fines terapéuticos, especifica que *“...sólo cuando no tenga por finalidad la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia.”* Esta definición, aunque escueta, deja muy claro que las modificaciones genéticas efectuadas sobre un individuo no deben afectar a su descendencia, aunque estos cambios en su genoma se deban a motivos terapéuticos y tampoco se aclara cómo se podría hacer tal modificación sin introducir "modificaciones en el genoma de cualquier descendiente". Por tanto, el Convenio de Oviedo impide a los países firmantes ningún tipo de terapia genética sobre la línea germinal.

En su momento de creación constituyó un gran avance histórico en la regulación de la genética, pero la aparición de técnicas más especializadas de ingeniería genética ha provocado una exigencia de normativas más específicas y menos ambiguas, que dejen claro que se permite o prohíbe específicamente. Sin embargo, actualmente muchas voces dentro de la comunidad científica de los países firmantes han comenzado a apuntar las insuficiencias del Convenio. Estas deficiencias están debidas principalmente a que, como todo documento jurídico, este documento fue escrito para afrontar una situación que existía en un momento histórico complejo.

En su década de firma el mundo vivía la primera revolución mediática internacional de la genética con el proyecto Genoma Humano. Asimismo, la terapia génica acababa de aparecer y ya habían ocurrido las primeras muertes de participantes en ensayos clínicos cerrados al público. Esta saturación de noticias sobre genética, así como la falta de información sobre los ensayos clínicos, o lo mal explicados que fueron en su momento a la sociedad, llevó a la generación de estos documentos encabezados por la sociedad científica ya que peligraba el futuro de la investigación biomédica y la investigación genética cuando esta solo comenzaba a despegar debido a la relativa ignorancia de aquel entonces de la técnica y a los abusos de varias empresas farmacéuticas dispuestas a ganar mucho dinero en un mundo sin regular.

Es por ello que en la aplicación actual de la formulación original del Convenio de Oviedo no cubre la evolución de la técnica científica ni la evolución de la legislación en biomedicina en la mayoría de los países firmantes y, mientras este desarrollo ha ido restando trascendencia a algunos apartados del convenio, en materia de terapia genética a día de hoy impide la realización de terapias que la legislación de muchos de sus firmantes permite en su práctica clínica. Este es el caso de la situación española, cuya regulación sobre la ingeniería genética para la cura de enfermedades heredables se analiza en profundidad a continuación.

## **2. MARCO LEGAL ESPAÑOL DE LA TERAPIA GÉNICA SOBRE EMBRIONES PARA LA CURA DE ENFERMEDADES**

En España, el marco legal que regula aquellos temas relativos a la manipulación genética de preembriones queda incluido en 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, que regula los estudios genéticos, ambas en el Boletín Oficial del Estado, y la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) (Enguer y Ramón, 2018). Como muchos otros países, la legislación española previene aquellos temas relativos a la manipulación de preembriones en su regulación de la reproducción asistida.

Concretamente es la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida la que más específica en cuanto al régimen por el que se regulan las modificaciones genéticas sobre humanos en estado de preembrión. Esta ley permite y establece los principios de la investigación en preembriones, indicando que se considera como preembrión a aquel embrión in vitro que se encuentra constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del ovocito desde que es fecundado hasta 14 días más tarde.

El concepto de aceptar la investigación hasta el día 14 de desarrollo es compartido por la legislación de casi todos los países que permiten investigar sobre los embriones humanos. Es un concepto que concilia intereses contrarios entre la presión ejercida por una parte de la sociedad que aprueba la investigación sobre embriones y la presión ejercida por la otra parte que no considera ético manipular y modificar la vida humana. El Convenio de Oviedo, en el que España se incluye, rechaza el término preembrión.

Además, cuando derivado de un TRA resultan preembriones sobrantes no utilizados, estos son criopreservados por ley. Una vez criopreservados, son los progenitores en última instancia los que deben decidir qué hacer con ellos. Actualmente los diferentes destinos posibles de los preembriones criopreservados sobrantes de los TRA son:

1. Su utilización por la propia mujer o/y su cónyuge.
2. La donación con fines reproductivos.
3. La donación con fines de investigación.
4. El cese de su conservación sin otra utilización, lo que implica su destrucción.

Esta última opción sólo es posible legalmente cuando pasa un plazo mínimo de 2 años desde su criopreservación, por motivos prácticos, éticos y médicos. Es importante destacar que asimismo la ley obliga a la entidad encargada de la criopreservación a solicitar cada dos años la renovación o modificación de la decisión adoptada por los progenitores. Si durante dos renovaciones consecutivas no se obtiene de los progenitores el consentimiento correspondiente, la ley entiende que estos se desentienden de los preembriones, que quedan a disposición de los centros en los que se encuentran crioconservados.

Por ello, en un periodo mínimo de 4 años, la gran mayoría de embriones sobrantes de la fecundación in vitro son donados a investigación independientemente de los deseos paternos, ya que estos no se han encargado de reivindicar su consentimiento y estos preembriones supone un material biológico muy valioso y poco frecuente.

Es por ello que, si no han sido donados a investigación por sus progenitores, los preembriones que pueden ser utilizados en la investigación española provienen de un criopreservación de duración mínima de 4 años. Es importante comentar que esta incapacidad para experimentar sobre embriones frescos afecta a los resultados de la modificación genética y disminuye la eficacia de esta aumentando el mosaicismo, como se ha indicado antes.

En definitiva, en España hasta los 14 días de desarrollo se puede alterar las características de un preembrión, ya que no se considera que este tiene un estatuto especial. No obstante, esta ley también establece como ilegal la creación de preembriones con el objetivo de investigar, y por lo tanto, todos los ensayos clínicos de terapia génica a realizar actualmente en España deben ser realizados sobre preembriones sobrantes de tratamientos de reproducción asistida, que son donados a la investigación con el consentimiento de la pareja de la que derivan, o en su caso de la mujer soltera.

Pero el apartado más interesante en cuanto a la ingeniería genética terapéutica sobre preembriones se encuentra en el CAPÍTULO III: Crioconservación y otras técnicas coadyuvantes de las de reproducción asistida. Concretamente, en su artículo 13, que se expone a continuación:

*“Artículo 13. Técnicas terapéuticas en el preembrión.*

1. *Cualquier intervención con fines terapéuticos sobre el preembrión vivo in vitro sólo podrá tener la finalidad de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas.*
2. *La terapia que se realice en preembriones in vitro sólo se autorizará si se cumplen los siguientes requisitos:*
  - a. *Que la pareja o, en su caso, la mujer sola haya sido debidamente informada sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapia propuesta y las hayan aceptado previamente.*
  - b. *Que se trate de patologías con un diagnóstico preciso, de pronóstico grave o muy grave, y que ofrezcan posibilidades razonables de mejoría o curación.*
  - c. *Que no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos ni se busque la selección de los individuos o de la raza.*
  - d. *Que se realice en centros sanitarios autorizados y por equipos cualificados y dotados de los medios necesarios, conforme se determine mediante real decreto.*
3. *La realización de estas prácticas en cada caso requerirá de la autorización de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.”*

Sorprendentemente, esta ley no necesita de una deconstrucción exhaustiva para su comprensión. Establece que los preembriones pueden ser sujetos a ingeniería genética para modificar los caracteres hereditarios patológicos. Sin embargo, no se especifica cuál es la medida para constatar el riesgo de un tratamiento con *“posibilidades razonables de mejoría o curación”*, por lo que a priori esta ley es permisiva, pues deriva la autorización de la realización de estas intervenciones a las autoridades sanitarias y la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, un comité de expertos generado a partir de esta ley.

Asimismo, no se establece una definición clara de qué significa impedir la transmisión de una enfermedad en el apartado 1, ya que no especifica que la transmisión de la enfermedad que se pretende evitar debe ser del individuo modificado a otro o viceversa.

Una interpretación conservadora de esto comprendería la transmisión genética a la herencia, pero como ya hemos visto, existen experimentos que han demostrado la capacidad de generar individuos con resistencia al VIH, impidiendo la transmisión de esta enfermedad.

Por tanto, según la definición actual, la ley permitiría un procedimiento para generar individuos inmunes al contagio de ciertos virus (lo que en sí es un concepto muy poco probable debido a la elevada capacidad de mutación de los mismos).

En definitiva, la ley española de reproducción asistida contempla la modificación genética terapéutica de la línea germinal sobre embriones y permite realizar cambios en el genoma del embrión por ende su descendencia, siempre que estos cambios en el DNA estén motivados por decisiones explícitamente médicas, mientras la terapia que sea realizada ofrezca una posibilidad real de mejorar la calidad de vida del individuo aceptado, se dé el consentimiento de los progenitores, y se realice por expertos autorizados.

No obstante, como se ha comentado en el marco legal español existe otra ley que trata sobre la manipulación del material genético. Esta es la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. Pese a que el objetivo de esta ley es regular *“la investigación biomédica que implique intervenciones sobre seres humanos, así como en la realización de análisis genéticos, el tratamiento de datos genéticos de carácter personal y de las muestras biológicas de origen humano que se utilicen en investigación”* y trata más bien del tratamiento de muestras biológicas y los PGS en el marco de la protección de datos y la privacidad (Lluch y Ramón, 2017).

A lo largo del documento solo se nombra la modificación del genoma de un individuo en su Artículo 74, apartado de infracciones, para indicar que:

*C) Son infracciones muy graves:*

*a) La realización de cualquier intervención dirigida a la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia.*

Esta ley no posterior a la anteriormente descrito no matiza sobre el objetivo de la modificación genética y, por tanto, choca con lo establecido en la Ley 14/2006 sobre reproducción asistida. Si además analizamos el Código Penal español, podemos observar cómo en el Artículo 159 se establece que:

*1. Serán castigados con la pena de prisión de dos a seis años e inhabilitación especial para empleo o cargo público, profesión u oficio de siete a diez años los que, con finalidad distinta a la eliminación o disminución de taras o enfermedades graves, manipulen genes humanos de manera que se altere el genotipo.*

*2. Si la alteración del genotipo fuere realizada por imprudencia grave, la pena será de multa de seis a quince meses e inhabilitación especial para empleo o cargo público, profesión u oficio de uno a tres años.*

Al analizar el Código Penal nos encontramos que, sorprendentemente, éste sí diferencia entre ingeniería genética terapéutica e ingeniería genética con otro objetivo no médico, siendo penalizado esta última. Por lo tanto, si seguimos únicamente el criterio del código penal, ambos tipos de terapia (sobre la línea somática y sobre la línea germinal) estarían permitidos.

Como detalle último, es de especial interés el indicar que la legislación española permite a sus comunidades autónomas la creación de regulaciones autonómicas de la investigación con embriones humanos. Actualmente, solo la comunidad autónoma de Andalucía ha legislado al respecto, mediante su Ley 4/2014, de 9 de diciembre, por la que se regula la investigación en Andalucía con preembriones humanos no viables para la fecundación in vitro. La presente ley no introduce ninguna modificación importante respecto a la legislación estatal en cuanto a la edición genética de embriones.

En definitiva, el análisis de la legislación española muestra como actualmente en 2018 existe una contradicción entre lo recogido en los diferentes Códigos y Leyes españolas.

Por lo tanto, pese a que la terapia génica somática está bien establecida como legal en todos ellos y actualmente se están llevando a cabo investigaciones en fase de ensayos clínicos, la legalidad de la terapia génica sobre la línea germinal, con un potencial para la erradicación de enfermedades genéticas, no está bien definida. Asimismo, la firma y ratificación del Convenio de Oviedo por las autoridades españolas impide a los investigadores nacionales realizar ingeniería genética sobre la línea germinal, pese a que la legislación española permita la realización de estas terapias *a priori*, aunque de una manera contradictoria.

Por lo tanto, actualmente se espera que en el futuro cercano el marco legislativo de la corrección de enfermedades génicas sobre embriones tanto a nivel nacional como internacional deberá ser objeto de revisiones y modificaciones en un futuro, puesto que hoy en día es contradictorio, no refleja los avances tecnológicos ni los cambios sociales, y no están bien definidos sus conceptos.

### 3. SITUACIÓN ACTUAL DE OTROS PAÍSES

En el ámbito internacional, las regulaciones de la modificación genética germinal humana varían entre países, aunque tienen en común el no permitirla. Actualmente, al menos 29 países tienen regulaciones sobre la modificación genética de la línea germinal (Figura 7). Diferentes países consideran los mismos conceptos en sus legislaciones, mientras que conceptos como la terapia génica, la diferencia entre línea somática y germinal, o la consideración de preembrión, no aparecen en todos ellos.

En cuanto a este último concepto, es importante remarcar que aquellos países donde no se permite la investigación con embriones humanos o los tratamientos de reproducción asistida debido a razones éticas no evalúan la posibilidad de regular estas modificaciones genéticas en la línea germinal en sus legislaciones o en el caso de considerarlas las prohíben explícitamente. Asimismo, también existen países que permiten la creación de embriones con fines de investigación y países en el que 14 días no es el límite temporal para considerar a un embrión con el estatus especial de preembrión, sino que depende de la creación de los rasgos primitivos embrionarios.

Al analizar la forma en la que se regulan a nivel nacional la terapia génica sobre embriones en varios países nos encontramos con que generalmente los países se dividen entre países que prohíben explícitamente en su legislación las modificaciones genéticas de la línea germinal y países que prohíben estas modificaciones mediante directrices de asesoramiento.

La principal diferencia entre ambos tipos de regulaciones reside en que las prohibiciones de directrices tienen más dificultad a la hora de castigar su incumplimiento y por tanto tienen más complicado el hacer cumplir sus objetivos, aportando por lo general simples sanciones menores no muy aclaradas y en resumen, siendo más permisivas que las leyes.

No obstante, el aspecto positivo de las directrices reside en que están más especializadas y son capaces de regular de una manera más amplia todos los sucesos posibles, así como tienen más facilidad a la hora de cambiar en sus normativas y por tanto son más adaptables al mundo siempre en movimiento de la ciencia.

Además, al igual que en España con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, los países que se encuentran actualmente investigando la ingeniería genética sobre la línea germinal o que tienen capacidad para realizar terapias génicas han creado una serie de organismos y autoridades de expertos que deben dar el visto bueno para todo tipo de investigación y terapia, o han habilitado las autoridades existentes. A continuación, se muestra un análisis global de la situación nacional interna de los principales países respecto a la investigación terapéutica sobre embriones humanos, en la que se describirán los mecanismos y procesos que han permitido alcanzar el momento técnico actual, así como un mapa donde se



La situación de los EE. UU. es única en el mundo ya que sus organismos reguladores controlan la aceptación de un producto en el mercado, pero una vez comercializada una tecnología, el control ejercida sobre la misma es muy débil, y los médicos estadounidenses pueden aplicar un producto aceptado para un propósito y aplicarlo libremente para otro. Existen dos organismos reguladores principales a nivel nacional en este país: la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) que regula la aprobación de productos para su uso en EE. UU., y el Instituto Nacional de Sanidad (NIH) que regula todo tipo de investigaciones médicas y por ahora no permite en sus directrices la terapia génica sobre la línea germinal.

Actualmente la ingeniería genética terapéutica sobre embriones humanos no está prohibida por la legislación americana, aunque en 2016 el congreso estadounidense prohibió directamente a la FDA la aceptación de terapias que sean heredables por la descendencia de un individuo mediante la intervención congresarial durante la generación de los presupuestos americanos, los llamados *Consolidated Appropriations Act*, que deben enmendarse cada año fiscal y por tanto esta prohibición puede evaporarse rápidamente, pese a que en Septiembre de 2017 fue enmendada y esta situación no parece que vaya a cambiar en los próximos años.

Este moratorio se hace efectivo por las directrices actuales de la NIH que debe aprobar ensayos clínicos y la vigilancia de la FDA sobre su aplicación. Esto quiere decir que tanto en EE. UU. como en los países nombrados anteriormente una mejora en la seguridad y eficacia de la terapia génica sobre preembriones puede traducirse en que se permita su uso clínico de una manera veloz.

Es importante remarcar que en los EE. UU. se han realizado más de la mitad de los ensayos con terapias génicas en los últimos 3 años y por tanto las regulaciones de este país tienen mucha influencia en lo que fuera de este se permite realizar, sobre todo en el ámbito europeo.

La situación europea está dividida entre los países que aplican el CdO y los que no. Entre los que lo aplican y por tanto no pueden realizar terapia génica sobre embriones encontramos países como Alemania, Francia, los países bálticos y los países nórdicos, que además por lo general prohíben y sancionan en sus legislaciones la modificación genética de la línea germinal. Entre los que no se adhieren al CdO, destaca Irlanda que, como ya hemos comentado, se encuentra con una situación similar a China o Japón, en la que la terapia génica está regulada mediante directrices y no a través de leyes y por tanto es más adaptable.

En el grupo de países que no han firmado el Convenio encontramos países como Holanda, Bélgica, o Suecia que también prohíben por ley la terapia génica embrionaria, aunque pueden permitir su investigación de una manera más permisiva que los firmantes.

Reino Unido merece una mención especial, ya que pese a ser uno de los líderes europeos de investigación genética sobre embriones y permitir la creación de embriones para la investigación, indica explícitamente que la edición genética de la línea germinal está prohibida en su ley *Human Fertilisation and Embryology (Research Purposes) Regulations* de 2001, y además, añade con bastante acierto que es poco probable que ninguna jurisdicción europea permita esto en los próximos años.

Asimismo, existen países como Islandia, Rusia, Chile y Sudáfrica en la que la prohibición del uso de ingeniería genética terapéutica sobre embriones no está concretada ni implícita en sus leyes, aunque se debe una legislación ambigua que no clarifica especialmente la aplicación terapéutica de la ingeniería genética o no la considera en el ámbito reproductivo y, pese a que parece que sus organismos reguladores no vayan a permitir la aplicación de estas actualmente, un cambio en la situación internacional podría resultar en la rápida adopción de estas por parte de los mismos.

Como se puede observar, la situación de España es muy poco común entre los países investigadores, ya que sus leyes contemplan la posibilidad de realizar cambios heredables en el genoma de un embrión por motivos terapéuticos, pero su adhesión al Convenio de Oviedo le impide actualmente llevarlas a cabo.

En definitiva, actualmente ningún país permite explícitamente la modificación genética de la línea germinal. Sin embargo, existen diferentes grados de prohibiciones y un conjunto de países ambiguos que no especifican aún los límites de la ingeniería genética sobre embriones para el tratamiento de enfermedades genéticas. En el análisis se puede observar que los países líderes en tecnología genética tienen una serie de regulaciones más laxas, que se deben al interés nacional en innovación o a lo enrevesado de sus elaborados organismos de control elaborados cuyas directrices varían.

Asimismo, se puede observar como existen excepciones europeas a la regla común, como en el caso de Irlanda o Islandia. También debe apuntarse que las regulaciones de la terapia génica han sido creadas desde un punto de vista precavido, y pese a que son recientes existen países donde el paso de la prohibición a la aprobación de la terapia génica sobre la línea terminal puede darse de la noche a la mañana, pero no parece que en los próximos años esto suceda debido a la falta de consenso sobre la potencial aplicación de la misma y la cohesión internacional en materia de investigación genética en humanos.

## VII. CONCLUSIONES

---

La modificación genética humana es un tema destinado a generar controversia durante los próximos años al implicar cambios en la información que nos hace únicos y, además, humanos. Este debate lleva en pie años, pero nunca antes se han tenido unas herramientas capaces de hacer esto una realidad como ahora, y es lógico que los avances constantes en ingeniería genética aumenten aún más la efectividad y la seguridad de los mismos.

Está claro que actualmente la ingeniería genética de embriones humanos es un suceso posible del que conocemos muy poco aparte de los resultados de 5 estudios, y son necesarias muchas investigaciones para que se acepte su aplicación clínica. Sin embargo, cada vez más y más equipos de investigación están centrándose en este tema, y se debe exigir garantías de que estas investigaciones médicas para el bien de todos no se hagan de una manera oculta o vergonzosa.

Cada año, aproximadamente 7,9 millones de niños, el 6% del total de nacimientos en todo el mundo, nacen con un grave defecto congénito de origen genético o parcialmente genético. Como demuestra el caso del indebidamente llamado “bebé de tres padres”, existen casos en los que los cribados genéticos preimplantacionales no sirven para evitar el nacimiento de niños enfermos, y son estos casos donde ocurren tratamientos que aprovechan vacíos legales que, no obstante, muestran la efectividad de las técnicas tabú. Mientras no exista una regulación que comprenda este tipo de casos desesperados, es imposible evitar la edición genética por parte de interés privados que pueden dañar irreversiblemente la reputación y todos los avances sociales que se han conseguido estos últimos años en la biomedicina.

Por ello la aplicación de la edición genética debe ser lo suficientemente segura como para usarse en humanos. No solo para allanar el camino para los procedimientos en laboratorios, sino para mantener abierta la posibilidad de utilizar la edición de genes para proteger a los embriones de las principales enfermedades genéticas y evitar que otras afecciones genéticas debilitantes se transmitan a las generaciones futuras. Para que esto sea posible, deben discutirse en profundidad los aspectos éticos tanto de la aplicación exitosa como de la aplicación fallida de la ingeniería genética puramente terapéutica sobre embriones, así como actualizar las regulaciones y límites legales en cuanto a la edición genética en base a los avances técnicos para garantizar que estas terapias sean transparentes, accesibles y seguras.

Asimismo, la comunidad científica debe hacer un esfuerzo en hacer llegar de una manera clara y comprensible a la sociedad los resultados de sus estudios y los potenciales peligros y beneficios que estos conllevan, ya que la sociedad debe ser una parte clave en este debate. Varias encuestas realizadas por editores científicos de prestigiosos periódicos de reputación internacional como *The Guardian* y publicaciones como la revista *Science* muestran como en Reino Unido, EEUU, Japón y Alemania cerca de dos tercios de la sociedad se encuentran a favor de editar genes para corregir enfermedades hereditarias, mientras que rechazan el uso de la ingeniería genética para potenciar o mejorar habilidades como la fuerza e inteligencia, o para realizar niños a la carta.

Si el colectivo social que se beneficiaría de la terapia génica en embriones no está familiarizado con los términos "biotecnología" e "ingeniería genética", es probable que esté más propenso a considerar que los productos de estos campos causaran en un futuro sucesos desconocidos y tienen posibles efectos perjudiciales.

En cuanto a la legislación española, esta es única en el mundo ya que sus leyes amparan y permiten realizar terapias genéticas embrionarias y establecen mecanismos reguladores efectivos, pese a no permitir su aplicación práctica debido a la adhesión de España al Convenio de Oviedo.

Al analizar la situación en los distintos países, se ve claramente que los países líderes en genética son más permisivos con la investigación embrionaria, además de tener unos marcos legales preparados para adaptarse a los cambios en la técnica y en la sociedad de una manera veloz.

Si queremos ser parte de ese grupo a la vanguardia, la comunidad científica española debe revisar su adhesión a este tratado y presionar para actualizar los principios establecidos hace más de veinte años del Convenio de Oviedo, de manera que se evite flujos de investigadores a aquellos países en los que existe la posibilidad de realizar estas investigaciones.

En conclusión, la edición genética terapéutica de embriones plantea muchos problemas importantes, y es importante considerar las implicaciones morales y éticas tanto para el individuo como para las generaciones futuras fruto de unas alteraciones genéticas que alteran directamente la evolución humana. Sería una irresponsabilidad proceder con cualquier uso clínico de la edición de la línea germinal a menos que se hayan resuelto los problemas relevantes de seguridad y eficacia, y exista un amplio consenso social sobre la idoneidad de la aplicación propuesta.

Es importante que cada país tenga, en última instancia, la independencia y autonomía para regularse a sí mismo, pero el genoma es algo compartido entre todas las naciones, que pertenece a todos los humanos del planeta. Por ello la comunidad internacional debe esforzarse para estar a la altura de las circunstancias y establecer claramente y sin tapujos que es aceptable en cuanto a la curación de los desórdenes genéticos para promover la salud y mejorar la calidad de vida de todos nosotros en conjunto.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ALEXANDER, M., HO, S. Y., MOLAK, M., BARNETT R., CARLBORG, Ö., *et al.* (2015). Mitogenomic analysis of a 50-generation chicken pedigree reveals a rapid rate of mitochondrial evolution and evidence for paternal mtDNA inheritance. *Biology letters*, 11(10).
- ARAKI, M., & ISHII, T. (2014). International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive biology and endocrinology*, 12(1), 108.
- BACMAN, SR., WILLIAMS, SL., PINTO, M., *et al.* (2013) Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nature medicine*; 19(9):1111–1113.
- BEANE, J. D., LEE, G., ZHENG, Z., GANDHI, N., *et al.* (2015). Clinical Scale Zinc Finger Nuclease (ZFN)-Driven Gene-Editing of PD-1 in Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) for the Potential Treatment of Metastatic Melanoma. *Molecular Therapy*, 23, S33-S34.
- BLAESE, R. M., CULVER, K. W., MILLER, A. D., CARTER, C. S., Fleisher, T., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA– SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235), 475-480.
- BOCH, J., SCHOLZE, H., SCHORNACK, S., LANDGRAF, A., HAHN, S., *et al.* (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors *Science* 11 Vol. 326, Issue 5959, 1509-1512.
- BRAUN, C. J., BOZTUG, K., PARUZYSKI, A., WITZEL, M., SCHWARZER, A., ROTHE, M., FRONZA, R. *et al.* (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome—long-term efficacy and genotoxicity. *Science translational medicine* 6(227), 33.
- CARBERRY, I. D., JI, D., HARRINGTON, A., BROWN, V., WEINSTEIN, E. J., *et al.* (2010). Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186: 451–459
- CHOI, SM., KIM, Y., SHIM, JS., PARK, JT., WANG, RH., *et al.* (2013) Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*. Jun;57(6):2458-68.
- CHRISTIAN, M., CERMAK, T., DOYLE, E. L., SCHMIDT, C., ZHANG, F., HUMMEL, A., VOYTAS, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 757-761.
- CUI, X., JI, D., FISHER, D.A., WU, Y., BRINER, D.M., WEINSTEIN, E.J. (2011). Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 29, 64-67.
- DAESIK, K., SANGSU, B., JEONGBIN, P., EUNJI, K., *et al.* (2015) Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nature Methods* volume 12, pages 237–243
- DENG, D., PING, Y., CHUANGYE, Y., XIAOJING, P., XINQI, G., SHIQIAN, Q., TIAN, X., MAHFOUZ, M., *et al.* (2012) Recognition of methylated DNA by TAL effectors *Cell Res*. 22(10): 1502–1504.
- DOE, B., BROWN, E., BOROVIK, K. (2018). Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector. *Methods and Protocols*, 1(1), 5.
- DOYON, Y., CHOI, V. M., XIA, D. F., VO, T. D., GREGORY, P. D., HOLMES, M. C. (2010). Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nature methods*, 7(6), 459.
- EASLEY, CAIV., PHILLIPS, BT., MCGUIRE, MM., BARRINGER, JM., VALLI, H., *et al.* (2012) Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep*; 2:440–446.
- ENGUER, P., RAMÓN, F. (2018) Dilemas bioéticos y jurídicos de la reproducción asistida en la sociedad actual en España, *Revista Latinoamericana de Bioética* 18(34), 104-135.
- FOGARTY, N. M., MCCARTHY, A., SNIJDERS, K. E., POWELL, B. E., KUBIKOVA, N., BLAKELEY, P., MACIULYTE, V. *et al.* (2017) Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550(7674), 67.

GABRIEL, R., LOMBARDO, A., ARENS, A., MILLER, J.C., GENOVESE, A., *et al.* (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* Aug 7;29(9):816-23.

GILBERT, L.A., HORLBECK, M.A., ADAMSON, B., VILLALTA, J.E., CHEN, Y., WHITEHEAD, E.H., *et al.* (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell* 159:647–661.

GRIFO, J.A., ZHANG J., MOFFA, F., COMOGLIO, F., *et al.* (2002). Germinal vesicle transfer between fresh and cryopreserved immature mouse oocytes. *Human Reproduction*, 17(1), 178-183.

GUPTA, A., CHRISTENSEN, R. G., RAYLA, A. L., LAKSHMANAN, A., STORMO, G. D., WOLFE, S. A. (2012). An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nature methods*, 9(6), 588.

HASHIMOTO, M., & TAKEMOTO, T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific reports*, 5, 11315.

HAYASHI, K., OHTA, H., KURIMOTO, K., ARAMAKI, S., SAITOU, M. (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*; 146:519–532.

HIKABE, O., HAMAZAKI, N., NAGAMATSU, G., OBATA, Y., HIRAO, Y., *et al.* (2016). Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, 539(7628), 299.

HORVATH P., & BARRANGOU R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.

INDER M. V., & NIKUNJ SOMIA, 1997. Gene therapy - promises, problems and prospects *Nature* 389, 239–242.

JAENISCH, R., & 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*, 71(4), 1250-1254.

JAO, L. E., WENTE, S. R., & CHEN, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13904-13909.

JO, A., HAM, S., LEE, G. H., LEE, Y. I., KIM, S., LEE, Y. S., LEE, Y. *et al.* (2015). Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *BioMed research international*, 2015.

KAN, Z., JAISWAL, B. S., STINSON, J., JANAKIRAMAN, V., BHATT, D., *et al.* (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466(7308), 869.

KANG, X., HE, W., HUANG, Y. *et al.* (2016) Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing *J Assist Reprod Genet* 33: 581.

KAZUKI, Y., HIRATSUKA, M., TAKIGUCHI, M., OSAKI, M., KAJITANI, N., *et al.* (2010). Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*, 18(2), 386-393.

KIM, Y.G., CHA J., CHANDRASEGARAN, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.3:1156-1160.

KOMOR, A. C., KIM, Y. B., PACKER, M. S., ZURIS, J. A., & LIU, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420.

KONERMANN, S, BRIGHAM, MD, TREVINO, AE, JOUNG, J, ABUDAYYEH, OO, BARCENA, C, HSU, PD, *et al.*: Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015, 517:583-588.

KWON, DY., ZHAO, YT., LAMONICA, JM., ZHOU, Z. (2017) Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR–Cas9-based HDAC. *Nat Commun* 8:15315.

LAKE, N. J., COMPTON, A. G., RAHMAN, S., THORBURN, D. R. (2016). Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology*, 79(2), 190-203.

LAMBRIGHT, L., LOPES, A., KOS, S., SERSA, G., PRÉAT, V., VANDERMEULEN, G. (2016). Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 13(2), 295-310.

LEI, Y., ZHANG, X., SU, J., JEONG, M., GUNDRY, MC., HUANG, YH., ZHOU, Y., LI, W., GOODELL, MA. (2017) Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9–MQ1 fusion protein. *Nat Commun* 8:16026.

LEIGH, D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 14: 216-221.

LI, H. L., FUJIMOTO, N., SASAKAWA, N., SHIRAI, S., OHKAME, T., SAKUMA, T. YAMAMOTO, T. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports*, 4(1), 143-154.

LI, L., PIATEK, MJ, ATEF, A, PIATEK, A, WIBOWO, A, MAHFOUZ, MM, *et al.* (2012). Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol.* 78(4-5):407-16.

LIANG, P., DING, C., SUN, H., XIE, X., XU, Y., ZHANG, X., WANG, Y. *et al.* (2017). Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein & cell*, 8(11), 811-822.

LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, C., HUANG, R., ZHANG, Z., *et al.* (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 6, 363–372.

LIU, E. T., BOLCUN-FILAS, E., GRASS, D. S., LUTZ, C., MURRAY, S., SHULTZ, L., ROSENTHAL, N. (2017). Of mice and CRISPR: The post-CRISPR future of the mouse as a model system for the human condition. *EMBO reports*, e201643717.

LIU, H., WEI, Z., DOMINGUEZ, A., LI, Y., *et al.* (2015). CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, 31(22), 3676-3678.

LIU, XS, WU, H, JI, X, STELZER, Y, WU, X, CZAUDERNA, S, SHU, J, DADON, D, YOUNG, RA, JAENISCH, R (2016) Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell* 167(233–247).

LIZUKA, H., KAGOYA, Y., KATAOKA, K., YOSHIMI, A., MIYAUCHI, M., TAOKA, K., KUROKAWA, M. *et al.* (2015). Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis. *Experimental hematology*, 43(10), 849-857.

LLUCH, C., RAMÓN, F., (2017) El caso Moore y la prestación del consentimiento informado en investigación médica, *Derecho y Salud* 27(2), 58-87.

LONG, L., GUO, H., YAO, D., XIONG, K., LI, Y., *et al.* (2015) Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. rerio*. *Cell Res* 25:638–641.

MA H., MARTI-GUTIERREZ N., PARK SW., WU J., LEE Y., SUZUKI K., KOSKI A. *et al.* (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548(7668), 413-419.

MAHFOUZ, M., LI L., SHAMIMUZZAMAN, MD., WIBOWO, A., FANG, X., ZHU, JK. (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(6): 2623–2628.

MALI, P., ESVELT, K. M., CHURCH, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods*, 10(10), 957.

MAO, Y., ZHANG, H., XU, N., ZHANG, B., GAO, F., ZHU, JK. (2013) Application of the CRISPR/Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular Plants* 6(6).

MARSHALL, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286(5448), 2244-2245.

MARTON, I., ZUKER, A., SHKLARMAN, E., ZEEVI, V., TOVKACH, A., *et al.* (2010). Non-transgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol.* 154: 1079–1087

MIAO, J, GUO, D, ZHANG, J, HUANG, Q, QIN, G, ZHANG, X, WAN, J, GU, H, QU, LJ (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res* 2013, 23:1233–1236.

MIZUNO, S., DINH, T. T. H., KATO, K., MIZUNO-IJIMA, S., *et al.* (2014). Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mammalian genome*, 25(7-8), 327-334.

MOORE, M., KLUG, A., CHOO, Y. (2001) Improved DNA binding specificity from polyzinc finger peptides by using strings of two-finger units. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*;98(4):1437-144

MORENO, A. M., FU, X., ZHU, J., KATREKAR, D., SHIH, Y. R. V., MARLETT, J., VARGHESE, S. *et al.* (2018). In situ gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9 mediated targeted gene regulation. *Molecular Therapy.*

MULLIS, KB., SAIKI, RK., GELFAND, DH., STOFFEL, S., ERLICH, HA, *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.

NALDINI, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351.

NIU, Y., SHEN, B., CUI, Y., CHEN, Y., XIANG A. P. *et al.* (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4): 836-843.

OSBORN, MJ., STARKER, CG., MCELROY, AN., *et al.* (2013) TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.*; 21(6):1151–1159.

OUSTEROUT, DG., PEREZ-PINERA, P., THAKORE, PI., *et al.* (2013) Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy.*; 21(9):1718–1726.

PAGANT, S., HUSTON, M. W., YASUDA, M., ST MARTIN, S., SPROUL, S., DEKELVER, R., DESNICK, R. J. *et al.* (2018). ZFN-mediated in vivo genome editing results in therapeutic levels of  $\alpha$ -galactosidase A and effective substrate reduction in Fabry knockout mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(2), S113.

PÉREZ, EE., WANG, J., MILLER, JC., JOUVENOT, Y., *et al.* (2008) Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 26(7):808-16.

PETOLINO, JF. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* 2015;51(1):1-8.

PIGANEAU, M., GHEZRAOUI, H., DE CIAN A., *et al.* Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *GENOME RESEARCH.* 2013;23(7):1182-1193.

SABZEHEI, F., KOUHPAYEH, S., DASTJERDEH, MS., *et al.* (2017) A Novel Prokaryotic Green Fluorescent Protein Expression System for Testing Gene Editing Tools Activity Like Zinc Finger Nuclease. *Advanced Biomedical Research.*;6:155.

SANJANA, N. E., SHALEM, O., ZHANG, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods*, 11(8), 783.

SCANNELL, J. P., CRESTFIELD, A. M., ALLEN, F. W. (1959). Methylation studies on various uracil derivatives and on an isomer of uridine isolated from ribonucleic acids. *Biochimica et biophysica acta*, 32, 406-412.

SEITA, Y., TSUKIYAMA, T., IWATANI, C., TSUCHIYA, H., MATSUSHITA, J., AZAMI, T., OKAHARA, J., NAKAMURA, S., HAYASHI, Y., HITOSHI, S., *et al.* (2017) Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep.* 2016;6:24868.

SHALEM, O., SANJANA, NE., HARTENIAN, E., SHI, X., SCOTT, DA., MIKKELSON, T., HECKL, D., EBERT, BL., ROOT, DE., DOENCH, JG. *et al.*: Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014, 343:84-87.

SUN, N., LIANG, J., ABIL, Z., *et al.* (2012) Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Molecular bioSystems.*; 8(4):1255–1263.

TAKEBE, T., SEKINE, K., ENOMURA, M., KOIKE, H., KIMURA, M., TANIGUCHI, H. *et al.*, (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.*

- TRUONG, D. J. J., KÜHNER, K., KÜHN, R., WERFEL, S., ENGELHARDT, S., WURST, W., ORTIZ, O. (2015). Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic acids research*, 43(13), 6450-6458.
- VAAMEE, ES., SANTAGATA, S., AGGARWAL, AK. (2001) FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol.*; 309:69–78.
- WATANABE, M., UMEYAMA, K., MATSUNARI, H., TAKAYANAGI, S., HARUYAMA, E., et al. (2010). Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 14–18.
- WEFERS, B., BRANDL, C., ORTIZ, O., WURST, W., KÜHN, R. (2016). Genome editing in mice using TALE nucleases. In TALENs. *Humana Press*, New York, NY. 229-243.
- WU, Y., ZHOU, H., FAN, X., ZHANG, Y., ZHANG, M., WANG, Y., TANG, W. et al. (2015). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell research*, 25(1), 67.
- YAMANAKA, S., TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
- YANG SH., CHENG PH., BANTA H., PIOTROWSKA-NITSCHKE K., YANG JJ., CHENG EC., SNYDER B., LARKIN K., LIU J., ORKIN J., Et al. (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*; 453:921–4.
- YONGSUB K., JIYEON K., ANNIE K., JAE K. C., JI Y.Y. et al. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome *Nature Biotechnology* Vol. 31, 251–258.
- YOUNG J. J., CHERONE J. M., DOYON Y., ANKOUDINOVA I., FARAJI F. M., et al. (2011). Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 7052–7057.
- YU Z., O'FARRELL P. H., YAKUBOVICH N., & DELUCA S. Z. (2017). The mitochondrial DNA polymerase promotes elimination of paternal mitochondrial genomes. *Current Biology*, 27(7), 1033-1039.
- YUAN, J., WANG, J., CRAIN, K., FEARN, C., KENNETH, A K., HUA, K.L., GREGORY, PD., HOLMES, MC., TORBETT, BE., (2012). Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4+ T cell resistance and enrichment. *Molecular Therapy*, 20(4), 849-859.
- YUSUAN W., HAI Z., XIAOYING F., YING Z., MAN Z., YINGHUA W., ZHENFEI X., MEIZHU B., QI Y., DAN L., et al. (2015) Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Research* volume25, 67–79.
- ZHOU X., XIN J., FAN N., ZOU Q., HUANG J., OUYANG Z., YI X. et al. (2015). Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and molecular life sciences*, 72(6), 1175-1184.

## **LEGISLACIÓN**

- Consolidated Appropriations Act, 2016 (Sec. 749), consultado el 14 de mayo de 2018. Disponible en: <https://www.congress.gov/bill/114th-congress/house-bill/2029>
- Declaración de Helsinki de la AMM, consultado el 12 de mayo de 2018. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
- Convention on Human Rights and Biomedicine, Oviedo, 1997.
- Human Fertilisation and Embryology (Research Purposes) Regulations 2001, consultado el 14 de mayo de 2018. Disponible en: [http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2001/188/pdfs/ukxi\\_20010188\\_en.pdf](http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2001/188/pdfs/ukxi_20010188_en.pdf)
- Ley 7/2003, de 20 de octubre, por la que se regula la investigación en Andalucía con preembriones humanos no viables para la fecundación in vitro. (BOE núm. 279, de 21 de noviembre de 2003).
- Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida (BOE núm. 126, de 27 de mayo de 2006).
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (BOE núm. 159, de 4 de julio de 2007).