

UNA REVISIÓN CRÍTICA DEL ESTADO DEL ARTE DE *CRISPR-CAS9* ANTE LAS ADVERSIDADES: UNA HERRAMIENTA MULTIDISCIPLINAR DE PLENA VIGENCIA

A CRITICAL REVIEW OF THE STATE OF THE ART (SOA) OF CRISPR-CAS9 IN THE FACE OF ADVERSITY: A MULTIDISCIPLINARY TOOL FULL FORCE

Ekain PAYÁN ELLACURIA

Resumen: la edición genética, con *CRISPR-Cas9* a la cabeza, se ha convertido desde su descubrimiento en una de las grandes esperanzas biológicas para erradicar algunas de las enfermedades más graves que azotan al ser humano. En buena lógica, debido al interés que despierta su aplicación, unido a sus innegables implicaciones éticas y jurídicas, así como a intereses económico-mercantiles, han proliferado en los últimos meses numerosas investigaciones, pudiendo poner en entredicho algunas de ellas el prometedor futuro que se le auguraba inicialmente a esta herramienta. En este sentido, destaca la realizada por la Universidad de Standford (EE.UU.), con arreglo a la cual los pacientes presentaban adaptaciones inmunitarias (anticuerpos y linfocitos T) contra la proteína *Cas9*, que opera como tijera molecular. La segunda es la relativa a un artículo escrito en una Revista científica de impacto que trató de refutar, de forma nada concluyente, las mutaciones genéticas inesperadas que produciría el uso de *CRISPR-Cas9*. Paralela y frontalmente, se ha conocido que, siguiendo los pasos de China y EE.UU., Europa asistirá en este 2018 al primer ensayo clínico con *CRISPR-Cas9* como tratamiento contra una enfermedad rara (la beta talasemia), que permitirá verificar su seguridad y eficacia. El objetivo de este artículo consiste en poner de manifiesto el pleno auge e incesante avance de la técnica, toda vez que existen soluciones de alcance real ante las diferentes problemáticas que se van suscitando, pero que requieren de una investigación responsable y de un aumento tanto en la financiación como en los ensayos clínicos.

Abstract: Since its discovery, the gene edition, with *CRISPR-Cas9* at its head, has become one of the great biological hopes for eradicating some of the most serious diseases that plague human beings. Obviously, due to the interest aroused by its application, together with its undeniable ethical and legal implications, as well as economic and commercial interests, numerous investigations have increased in recent months, some of which have been able to call into question the promising future that this tool was initially predicted

to have. In this regard, the one carried out by Stanford University (USA) is noteworthy, according to which the patients presented immune adaptations (antibodies and T lymphocytes) against the Cas9 protein, which operates as a molecular scissor. The second is an article written in an impact scientific journal that tried to refute, in an inconclusive way, the unexpected gene mutations that the use of CRISPR-Cas9 would produce. At the same time, it has been known that, following in the footsteps of China and USA, Europe will be attending the first clinical trial with CRISPR-Cas9 in 2018 as a treatment for a rare disease (beta thalassemia), which will make it possible to verify its safety and efficacy. The aim of this article is to highlight the full growth and relentless advance of technology, given that there are real solutions to the various problems that arise, but that require responsible research and an increase in both funding and clinical trials.

Palabras clave: *CRISPR-Cas9*/ Edición genética / Ensayos clínicos / Investigación responsable / Terapia génica

Keywords: CRISPR-Cas9 / Gene editing / Clinical trials / Responsible research / Gene therapy

Introducción: aproximación al concepto de CRISPR-Cas9

El descubrimiento de uno de los hitos más importantes de las últimas décadas en materia de edición genética tiene su origen en la propia naturaleza, tal y como se percató el microbiólogo español Francis MOJICA en 1993, al detectar la repetición de unas secuencias en el ADN de determinadas bacterias y que bautizaría con el acrónimo Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (en adelante, *CRISPR*). Este fenómeno resultó ser un mecanismo de defensa inmunológico de estos microorganismos frente a enfermedades de carácter vírico¹, presente desde hace millones de años e inadvertido a los ojos de la Ciencia.

No obstante, y a pesar de la incesante optimización evolutiva en bacterias, la posibilidad *real* de aplicar este descubrimiento en cualquier otro tipo de organismo -inclusive en mamíferos- no se produjo hasta el año 2012, en el que, fruto de la labor de los equipos de investigación liderados por Emmanuelle CHARPENTIER y Jennifer Anne DOUDNA, se constató que la adhesión de la endonucleasa *Cas9* a *CRISPR* permitía editar el genoma

¹ MOJICA, F. J. M. / JUEZ, G. / RODRÍGUEZ-VALERA, F., “Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites”, *Molecular Microbiology*, No. 3, Vol. 9, August 1993, pp. 613-621.

humano². En román paladino, *CRISPR* se articula como una especie de diana, que identifica el radio de acción, mientras que *Cas9* se encarga de actuar con suma precisión en la zona previamente delimitada. De esta manera, la técnica *CRISPR/Cas9* posibilita duplicar, eliminar, insertar, invertir, reordenar o sustituir secuencias de ADN, operando como una suerte de “tijeras moleculares”, razón por la que se le conoce comúnmente como “el corta pega genético”. Posteriormente, y una vez realizada la incisión, es el entramado celular el que se encarga de regenerar con celeridad el tejido dañado.

Como puede colegirse, esto abriría la puerta a la reparación de enfermedades incurables, raras y de carácter hereditario alterando la expresión -la función- del gen deletéreo en cuestión -activando o silenciando genes, según convenga-, lo que implicaría modificar *para su bien* el genoma del ser humano sobre el que se aplica (y no el conjunto del genoma humano o de la humanidad), convirtiéndolo en saludable. Aunque su uso está pensado para humanos adultos -algo en torno a lo que la sociedad se ha manifestado positivamente³-, también se ha considerado su utilización en embriones humanos, si bien su prohibición en los Estados firmantes del Convenio de Oviedo (en lo sucesivo, CO) y la preexistencia de otras técnicas menos invasivas como el Diagnóstico Genético Preimplantatorio (en adelante, DGP, es decir, *in vitro*, en la que es posible analizar los embriones antes de proceder a la implantación en la mujer, desechando los defectuosos y optando por aquellos que carezcan de mutaciones) desaconsejan en este momento su aplicación futura (salvo las excepciones en las que ambos progenitores fueran portadores de la misma enfermedad, en cuyo caso el DGP no constituiría una solución).

En cuanto a sus beneficios, constituye un auténtico avance biológico que permite, en comparación con otros métodos, modificar el genoma con suma precisión (eficiencia), sin costes significativos (económico)⁴ y con una aplicabilidad simple (facilidad),

² JINEK, M. / CHYLINSKI, K. / FONFARA, I. / HAUER, M. / DOUDNA, J.A. / CHARPENTIER, E., “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity”, *Science*, Vol. 337, August 2012, pp. 816-821.

³ Tres de cada cuatro personas (75%) se muestran partidarias a la edición genética con fines terapéuticos en adultos en EE.UU. GASKELL, G. / BARD, I. / ALLANS DOTTIR, A. / VIEIRA DA CUNHA, R. / EDUARD, P. / HAMPEL, J. / HILDT, E. / HOFMAIER, C. / KRONBERGER, N. / LAURSEN, S. / MEIJKNECHT, A. / NORDAL, S. / QUINTANILHA, A. / REVUELTA, G. / SALADIÉ, N. / SANDOR, J. / BORLIDO SANTOS, J. / SEYRINGER, S. / SINGH, L. / SOMSEN, H. / TOONDERS, W. / TORGENSEN, H. / TORRE, V. / VARJU, M. / ZWART, H., “Public views on gene editing and its uses”, *Nature Biotechnology*, No. 35, November 2017, pp. 1021-1023. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.3958> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

⁴ “(...) mientras que la utilización de las meganucleasas necesitan 4-5 años de trabajo y un coste de 6.000 € para llevar a cabo una investigación de edición, las ZF nucleasas implican un costo 30.000 €, las TALEN implican un tiempo de 3-4 meses y un costo de 10.000 €, con la CRISPRCas9 se necesitan solamente 2-3

maleable y versátil. Además de en humanos, *CRISPR-Cas9* puede aplicarse para el consumo de animales y plantas, potenciando alguna de las propiedades genéticas de su propio ADN, lo que permitiría aumentar exponencialmente su contenido nutricional. Al ser considerados Organismos Genéticamente Modificados (OGM) obtenidos mediante mutagénesis y no incorporar ADN externo (transgénesis) -al igual que en EE.UU.-, no se le aplicaría la Directiva Europea sobre transgénicos⁵, tal y como avanzó el 18 enero de 2018 el Abogado General del Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE) Michal BOBEK⁶. De paso, esta práctica garantizaría poder satisfacer las demandas alimenticias del mundo, haciendo frente a la superpoblación que se espera para el año 2050 (se estima que la Tierra estará habitada por 9.000 millones de personas)⁷.

Por el contrario, los riesgos vienen representados por su escaso bagaje experimental y seguridad -este año se cumple, precisamente, el vigésimo quinto aniversario de su descubrimiento en las salinas de Santa Pola, Alicante- y por el hecho de que fundamentalmente se haya experimentado *ex vivo* -esto es, fuera del cuerpo humano, generalmente, en *ratones avatar*- lo que supone que todavía no sea posible conocer los resultados *exactos* que podrían desarrollarse *in vivo*. Tampoco es posible controlar el complejo funcionamiento de los sistemas de reparación. Es por ello que es conveniente impulsar el diagnóstico y continuar con los ensayos clínicos, con carácter previo a aplicar la terapia génica en humanos, en aras de paliar los posibles efectos secundarios.

Lamentablemente, en los últimos meses hemos tenido conocimiento de algunos estudios que, de confirmarse, podrían afectar negativamente al recorrido de *CRISPR-Cas9*. El objeto de este artículo es, partiendo del marco legal y moral, ahondar en ellos e incidir en la responsabilidad que le atañe a la comunidad científica, en general, y a los

semanas de trabajo y un coste de 20-30 €”. LACADENA, J.-R., “Genética y Humanismo. Edición genómica: ciencia y ética”, *Revista Iberoamericana de Bioética*, Núm. 3, 2017, p. 3.

⁵ Diario Oficial nº L 106 de 17/04/2001 p. 0001 - 0039. Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de marzo de 2001, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

⁶ “(...) el Abogado General no ve ningún motivo derivado de la obligación general de actualizar la normativa (potenciada en el presente asunto por el principio de cautela) que pueda afectar a la validez de la exención de la mutagénesis”. Disponible en: <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-01/cp180004es.pdf> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

⁷ Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

investigadores, en particular, a la hora de publicar sus experimentos, no en cuanto a los resultados que se puedan obtener de los mismos, sino a la obligatoriedad de seguir pautas, procedimientos y procesos adecuados, contrastados y pertinentes, que permitan a la Ciencia continuar en su avance en pos del progreso y del último fin que es el beneficio humano a través del conocimiento. Por último, se tratará de poner en valor la importancia de los ensayos clínicos, al cual Europa tendrá ocasión de asistir en el presente año, emulando a los gigantes asiáticos y estadounidenses, respectivamente, lo que no hace sino manifestar el ya imparable interés de la técnica a colación del importante objetivo que persigue, pero que seguirá precisando de financiación y, para ello, de un amplio consenso entre los diferentes agentes implicados.

La edición del genoma humano: límites legales y morales

Independientemente de la postura que cada uno profese ante la edición genética, hay dos campos que no deben ignorarse ya que, hoy por hoy, operan no solo como límites que generan certidumbre y seguridad jurídica, sino como un marco de mínimo entendimiento del cual se debe partir para cualquiera de las iniciativas o propuestas subsiguientes.

En relación a la normativa aplicable en la Unión Europea (en lo sucesivo, UE), y como quiera que el Derecho suele ir a la zaga de la necesidades científicas y sociales, los textos que aluden y establecen normas que puedan ser aplicables a *CRISPR-Cas9* son todavía espurios, pudiéndose extraer líneas aproximadas de actuación, esencialmente, de dos de ellos.

En primer lugar, la Carta de los Derechos Fundamentales de la UE⁸ prohíbe expresamente, en su artículo 3.2, cualquier forma de eugenesia: “En el marco de la medicina y la biología se respetarán en particular: (...) la prohibición de las prácticas eugenésicas, y en particular las que tienen por finalidad la selección de las personas,”.

En segundo lugar, ligeramente más precisa es la referencia dual que el CO -elaborado por el Consejo de Europa, rubricado y ratificado por la mayoría de los países de la UE,

⁸ Disponible en: http://www.europarl.europa.eu/charter/pdf/text_es.pdf [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

incluyendo a España⁹, siendo jurídicamente vinculante en todos ellos- hace sobre la edición genética en su artículo 13, en el que regula que “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”.

A la vista de los anteriores, la utilización de *CRISPR-Cas9* quedaría ética y legalmente limitada a la terapia génica con finalidades clínico-terapéuticas en la línea somática del propio individuo, que, en cualquier caso, estaría vedada si llegara a afectar *voluntariamente* en la germinal. Consecuentemente, el espíritu literal de la ley impide actuar sobre aquellas patologías o enfermedades hereditarias -incluso en las de carácter incurable, algo que, sin embargo, sería difícilmente reprochable ética y moralmente- cuando se altere el genoma de la descendencia. Asimismo, quedarían totalmente excluidos y fuera del ámbito de aplicación los supuestos de mejora humana (léase cognitiva, física, intelectual) y de eugenesia. Y es que estos podrían suscitar mayor rechazo social al constituir fines no éticos que podrían atentar contra la dignidad humana en una de doble vertiente: por un lado, porque haría depender de lo que cada persona considerara como área susceptible de mejora (lo que requeriría identificar la delgada frontera entre enfermedad y mejora); y, por otro, porque podría restringirse el acceso universal a estas tecnologías, dividiendo a la especie humana en dos grupos diferentes: los seres humanos y los seres humanos mejorados¹⁰. Esto entronca con los principios de precaución y de responsabilidad defendidos por los bioconservadores, que podrían dar lugar a una peligrosa acción de pendiente resbaladiza, a lo que se opondrían radicalmente los principios de autonomía, beneficencia y justicia propugnados por los transhumanistas.

Contratiempos en el uso de la técnica

⁹ BOE Núm. 251, de 20 de octubre de 1999, artículo 13 del Instrumento de Ratificación del 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 (Convenio relativo a los Derechos humanos y Biomedicina o Convenio Europeo de Bioética), hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997. Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1999-20638 [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹⁰ DE MIGUEL BERRAIN, I. / ARMAZA ARMAZA, E., “Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRISPR-Cas9 a debate”, *Anales de la Cátedra Francisco Suárez*, Vol. 52, 2018, pp. 179-200. Disponible en: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/acfs/article/view/6555/5677> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

Como consecuencia de la cada vez más factible posibilidad de desarrollar terapia génica y distintas aplicaciones sanitarias en las generaciones presentes y futuras -que aportaría cuantiosos réditos económicos para las empresas del sector- no han hecho sino multiplicarse las investigaciones sobre *CRISPR-Cas9*, en especial, en aquellos países no suscriptores del CO en los que sus respectivas legislaciones son más laxas y en los que, normalmente, la financiación es mayor. Sea como fuere, los recientes resultados no han resultado nada halagüeños, pudiendo poner en entredicho las expectativas levantadas y afectando negativamente a algunas inversiones financieras¹¹. Destacaremos, a continuación, y por diferentes motivos, los que más revuelo han causado.

Anticuerpos y Linfocitos T

El primero versa sobre el artículo¹² publicado por la unidad de pediatría liderada por Matthew H. PORTEUS, de la Universidad de Standford. En base al análisis y muestreo de sangre realizado sobre 34 sujetos (en concreto, 22 recién nacidos y 12 adultos), se encontraron moléculas protectoras en más del 65% de los examinados¹³, por lo que, por extensión, buena parte de los seres humanos podrían presentar ya resistencia inmunitaria contra la proteína *Cas9*. Esta conclusión podría tener su explicación en que el organismo humano reconociera de antemano ambas bacterias¹⁴, al haber sido causantes con anterioridad de infecciones tan comunes como la faringitis o la otitis, lo que llevaría a activar el sistema inmunológico -vía anticuerpos y linfocitos T- en aquellas personas que las hubieran padecido. En lo que aquí interesa, esto no solo dificultaría el uso eficaz y seguro de *CRISPR-Cas9*, sino que podría provocar una reacción de carácter tóxico en los pacientes.

Aun resultando un contratiempo reseñable, se trata de algo lógico que ya se había llegado a barruntar dado el origen y fisionomía de la técnica, pero que, como sugiere el propio

¹¹ JOSEPH, A., “Genome-editing companies play down CRISPR paper, as concerns drive down shares”, STAT- Reporting from the frontiers of health and medicine (Biotech), January 8, 2018. Disponible en: <https://www.statnews.com/2018/01/08/crispr-immune-systems-companies/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹² CHARLESWORTH, C. T. / DESHPANDE, P. S. / DEVER, D. P. / DJENE, B. / GÓMEZ-OSPINA, N. / MANTRI, S. / PAVEL-DINU, M. / CAMARENA, J. / WEINBERG, K. I. / PORTEUS, M. H., “Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans”, *BioRxiv. The preprint server for biology*, January 2018. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/01/05/243345.full.pdf> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹³ Disponible en: <https://ipscell.com/2018/01/keep-calm-crispr-on-perspectives-on-report-of-human-cas9-immunity/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹⁴ *Streptococcus pyogenes (SpCas9)* y *Staphylococcus aureus (SaCas9)*, respectivamente.

autor de la investigación, podría tener varias soluciones provisionales¹⁵: de un lado, aplicando fármacos inmunosupresores¹⁶, y, de otro lado, caracterizando otras bacterias que ejercieran la misma función que *Cas9*¹⁷ y que nunca antes hubieran tenido contacto con el cuerpo humano en cuyo caso volverían a ser rechazadas. En todo caso, y a pesar de que son un indicativo óptimo, llama poderosamente la atención el hecho de que los resultados hayan sido tan concluyentes siendo el grupo de donantes tan reducido, por lo que tal vez convendría diseccionarlos y tratarlos con prudencia, al menos, hasta aplicarlos en un número mayor de voluntarios o con mayor diversidad del reservorio génico. Hasta entonces, deberán extremarse las precauciones cuando se empleen estas proteínas para la edición genética terapéutica *in vivo*.

Mutaciones genéticas involuntarias

El segundo supuesto se focaliza en el artículo publicado por Kellie A. SCHAEFER y sus colaboradores, adscritos a las Universidades de Stanford, Iowa y Columbia, en la prestigiosa Revista *Nature*¹⁸. En él afirmaban que el uso de *CRISPR-Cas9* en ratones - extrapolable a humanos- conllevaba la aparición de ingentes mutaciones en su genoma. Estos resultados, además de no coincidir con los de otros investigadores -que ya antes habían concluido que las mutaciones no deseadas como consecuencia del uso de esta

¹⁵ “Potential solutions to pre-existing adaptive immunity to Cas9 may include the use of immune suppression or immune depletion to prevent severe cell-mediated responses to Cas9, the use of Cas9 homologs from other bacterial species that do not infect or reside in humans, or the engineering of recombinant Cas9 proteins that escape immune detection. Besides testing of their efficacy in gene editing, exploration of alternatives to SaCas9 or SpCas9 needs to test their immunogenicity in human systems”. CHARLESWORTH, C. T. / DESHPANDE, P. S. / DEVER, D. P. / DJENE, B. / GÓMEZ-OSPINA, N. / MANTRI, S. / PAVEL-DINU, M. / CAMARENA, J. / WEINBERG, K. I. / PORTEUS, M. H., “Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans”, *op. cit.*, p. 7. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/01/05/243345.full.pdf> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹⁶ “For in vivo application of CRISPR/Cas9, immunosuppressive treatment must be considered (...)”. WAGNER, D. L. / AMANI, L. / WENDERING, D. J. / REINKE, P. / VOLK, H.-D. / SCHMUECK-HENNERESSE, M., “High prevalence of *S. pyogenes* Cas9-specific T cell sensitization within the adult human population - A balanced effector/regulatory T cell response”, *The preprint server for biology*, April 2018, p. 5. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/04/04/295139.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹⁷ ZETSCHKE, B. / GOOTENBERG, J. S. / ABUDAYYEH, O. O. / SLAYMAKER, I. M. / MAKAROVA, K. S. / ESSELETZBICHLER, P. / VOLZ, S. E. / JOUNG, J. / VAN DER OOST, J. / REGEV, A. / KOONIN, E. V. / ZHANG, F., “Cpf1 is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System”, *Cell*, Vol. 163, October 2015. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01200-3](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01200-3) [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

¹⁸ SCHAEFER, K. A. / WU, W.-H. / COLGAN, D. F. / TSANG, S. H. / BASSUK, A. G. / MAHAJAN, V. B., “Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo”, *Nature Methods*, No. 14, May 2017. Disponible en: <https://www.nature.com/nmeth/journal/v14/n6/full/nmeth.4293.html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

herramienta eran “raras”¹⁹ -, atribuyeron un impacto real muy superior a las alteraciones de genes que se conocían, arrojando errores en el diseño del experimento, toda vez que para la redacción de su artículo se basaron en el análisis de, únicamente, tres muestras de ratón: dos de ellos editados genéticamente y otro que no lo estaba, en cuya comparación se centraron. Por lo tanto, resultaba palmaria la observancia de deficiencias tanto en el control adecuado del proceso como en la interpretación de sus resultados, que, sin duda, parecían obedecer a las diferencias y a la falta de relación genética entre los tres ratones estudiados, todo lo cual debía desvincular, necesariamente, las mutaciones del mero uso de la técnica *CRISPR-Cas9*. Y es que no debe obviarse la exposición constante y permanente a mutaciones genéticas espontáneas -conocida como deriva genética- que, como fruto de la evolución de las especies, afecta a las generaciones venideras.

Las críticas no se hicieron esperar por parte de la comunidad científica²⁰, enterrando por completo el argumentario original y mostrando su estupor por el hecho de que un *paper* indebidamente contrastado hubiera superado los filtros de revisión por pares y de selección editorial en una revista con alto factor de impacto como la ya anunciada.

¹⁹ “Indeed, in our screen, no undesired mutations were detected at the six genomic loci highly similar to the targeted sequences under investigation”. SERUGGIA, D. / FERNÁNDEZ, A. / CANTERO, M. / PELCZAR, P. / MONTOLIU, L., “Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, April 2015, p. 4864. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/43/10/4855/2409455> [Última consulta: 11 de mayo de 2018]; “In contrast to embryonic stem cell technology, where extensive genetic variation arises in culture, undesired mutations induced by the Cas9 endonuclease will be rare in zygotes”. IYER, V. / SHEN, B. / ZHANG, W. / HODGKINS, A. / KEANE, T. / HUANG, X. / SKARNES, W. C., “Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice”, *Nature Methods*, No. 12, May 2015. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3408> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²⁰ En este sentido, *vid.* BURGIO, G., “Should we be worried about CRISPR/Cas9 off target effects?”, *Medium*, June 2017. Disponible en: <https://medium.com/@GaetanBurgio/should-we-be-worried-about-crispr-cas9-off-target-effects-57dafaf0bd53> [Última consulta: 11 de mayo de 2018]; LAREAU, C. / CLEMENT, K. / HSU, J. Y. / PATTANAYAK, V. / JOUNG, J. K. / ARYEE, M. J. / PINELLO, A., “Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo” are most likely pre-existing sequence variants and not nuclease-induced mutations”, *BioRxiv. The preprint server for biology*, July 2017. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/07/05/159707.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018]; BOTHMER, A. / MAEDER, M. L. / REYON, D. / WILSON, C. J. / COTTA-RAMUSINO, C. / FERNÁNDEZ, C. A. / MARCO, E. / BARRERA, L. A. / JAYARAM, H. / ALBRIGHT, C. F. / COX, G. F. / CHURCH, G. M. / MYER, V. E., “The experimental design and data interpretation in “Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo” by Schaefer et al. are insufficient to support the conclusions drawn by the authors”. Disponible en: http://arep.med.harvard.edu/pdf/Schaefer_Opinion_2Jun2017.pdf [Última consulta: 11 de mayo de 2018]; IYER, V. / BOROVIK, K. / THOMAS, M. / DOE, B. / RYDER, E. / ADAMS, D., “No unexpected CRISPR-Cas9 off target activity revealed by trio sequencing of gene-edited mice”, *BioRxiv. The preprint server for biology*, February 2018. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/02/09/263129.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

Tanto es así que la propia *Nature Methods* se vio obligada a publicar, en un breve espacio temporal, sendos editoriales²¹ en los que mostraba su preocupación por las controversias que había ocasionado el artículo, enérgicamente enfrentadas por los expertos en la materia, a la par que deslizaba una interpretación alternativa al mismo.

Por su parte, los autores volvieron a publicitar un nuevo experimento²², en el que alteraron su metodología inicial -a pesar de seguir incumpliendo los estándares correctos de control, pues se valieron, nuevamente, de solo tres ratones, aunque esta vez más cercanos genéticamente- y se desdijeron de las conclusiones extraídas en su primer estudio²³. Y es que, dada la antedicha cercanía, les resultó, como no podía ser de otra manera, imposible detectar las “miles de mutaciones inesperadas” que habían reportado en mayo de 2017.

Finalmente, la Revista optó, hace un mes, por retirar el artículo²⁴, mostrando, todavía, su oposición, cuatro de sus seis autores, incluidos el autor principal y la primera autora.

²¹ “14 June 2017 Editorial Note: readers are alerted that the conclusions of this paper are subject to criticisms that are being considered by editors. A further editorial response will follow the resolution of these issues”; “25 July 2017 Editorial Expression of Concern: The editors of *Nature Methods* are issuing an editorial expression of concern regarding this paper to alert our readers to concerns about interpretation of the data. Multiple groups have questioned the interpretation that single nucleotide changes seen in whole-genome sequences of two CRISPR-Cas9-treated mice are due to the CRISPR treatment. Since the background genetic variation between the control mouse and the CRISPR-treated animals is not known, an alternative proposed interpretation is that the observed changes are due to normal genetic variation. We are in contact with the critics and with the authors to examine this matter further. We will update our readers once these investigations are complete. All the authors do not agree with the journal's decision to issue an editorial expression of concern”. Disponible en: <https://retractionwatch.com/2017/07/26/controversial-crispr-paper-earns-second-editorial-note/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²² SCHAEFER, K. A. / DARBRO, B. W. / COLGAN, D. F. / TSANG, S. H. / BASSUK, A. G. / MAHAJAN, V. B., “Corrigendum and follow-up: Whole genome sequencing of multiple CRISPR-edited mouse lines suggests no excess mutations”, *BioRxiv. The preprint server for biology*, June 2017. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/03/26/154450.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²³ “On the other hand, examination of additional CRISPR-treated mice created with a different methodology did not show an excess number of unintended variants potentially introduced by CRISPR-Cas9 gene editing procedure. (...) Taken together, these whole-genome-sequencing- level results support the idea that in specific cases, CRISPR-Cas9 editing can precisely edit the genome at the organismal level and may not introduce numerous, unintended, off-target mutations. Although further analysis is needed (...) suggest a path towards clinically viable CRISPR-based gene editing, including studies to optimize precision and experimentally confirm genome-wide safety”. SCHAEFER, K. A. / DARBRO, B. W. / COLGAN, D. F. / TSANG, S. H. / BASSUK, A. G. / MAHAJAN, V. B., “Corrigendum and follow-up: Whole genome sequencing of multiple CRISPR-edited mouse lines suggests no excess mutations”, *op. cit.* Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/03/26/154450.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²⁴ “Retracted online 30 March 2018. This paper is being retracted because the genomic variants observed by the authors in two CRISPR-treated mice cannot be conclusively attributed to CRISPR-Cas9. (...) The study is therefore being retracted to maintain the accuracy of the scientific record”. Disponible en: <https://www.nature.com/nmeth/journal/v14/n6/full/nmeth.4293.html#correction3> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

El primer ensayo clínico en Europa

Como contrapunto a los anteriores, siguen produciéndose, día tras día -y, sobre todo, desde enero de 2013, fecha en la que se conocieron experimentos con *CRISPR-Cas9* que atestiguaron su uso como editor genético- nuevas e innovadoras aplicaciones, desarrollos y usos de esta herramienta en los laboratorios biosanitarios más avanzados de todo el mundo, todo lo cual no hace sino presagiar las ilimitadas posibilidades de esta técnica.

En este sentido, ya se han autorizado ensayos clínicos en China²⁵ y en EE.UU.²⁶ para llevar a cabo experimentos consistentes en extraer y modificar células madre humanas que, una vez reprogramadas e insertadas en el organismo, podrán combatir todo tipo de cáncer, siendo especialmente relevantes frente aquellos con mayor índice tumoral. Pues bien, se espera que, a finales de 2018, llegue el primer ensayo al viejo continente. Y es que, hace escasas semanas, se ha confirmado que la compañía *CRISPR Therapeutics* ha recibido el visto bueno de las autoridades comunitarias para probar la eficacia y seguridad de *CRISPR-Cas9* en la lucha contra la beta talasemia²⁷, una enfermedad que puede causar anemia severa por falta de oxígeno, pudiendo llevar al fallecimiento.

De este modo, y a pesar de que todavía queda un largo camino para su introducción en la práctica clínica, parecen vislumbrarse pasos para reforzar su uso con plenas garantías.

Consideraciones finales

A modo de conclusión, del epígrafe anterior se desprende, de forma meridianamente clara, que *CRISPR-Cas9* sigue siendo en la actualidad una herramienta tan revolucionaria como vanguardista²⁸.

²⁵ Constan acreditados dos ensayos hospitalarios aplicados, al menos, en 86 pacientes chinos en 2015, gracias a los escasos obstáculos regulatorios de aquel país, sin que se hayan publicado sus resultados. Disponible en: <https://www.wsj.com/articles/china-unhampered-by-rules-races-ahead-in-gene-editing-trials-1516562360> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²⁶ En junio de 2016, la Universidad de Pensilvania solicitó un estudio sobre 18 pacientes con tres tipos diferentes de cáncer (mieloma múltiple, sarcoma y melanoma), que comenzará en cualquier momento. Disponible en: <https://www.technologyreview.com/s/609999/us-doctors-plan-to-treat-cancer-patients-using-crispr/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²⁷ Disponible en: <https://hipertextual.com/2018/04/crispr-cas-beta-talasemia-edicion-genomica> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

²⁸ Disponible en: <https://www.cbsnews.com/news/crispr-the-gene-editing-tool-revolutionizing-biomedical-research/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

Evidentemente, y a medida que los ensayos clínicos aumentan en número, el conocimiento sobre esta *navaja suiza* crece, pero también, irremediable y forzosamente, la posibilidad de que surjan complicaciones. De hecho, me aventuraría a decir que, si en algún momento tienen que acontecer, es, ciertamente, en este, cuando aún se está experimentado *ex vivo*. Ello contribuirá a poder adelantarse a cualesquiera efectos no deseados en humanos antes de que estos lleguen a producirse y sean irreversibles. Será, entonces, cuando puede que se esté en disposición de aplicarlos *in vivo*, teniendo en cuenta que el “riesgo cero” no existe en medicina, y que siempre va a existir un porcentaje, por mínimo que este sea, que pueda poner en peligro el éxito de la intervención. En última instancia, habrá que procurar aproximarse, lo máximo posible, a optimizar los potenciales beneficios frente a los riesgos, siempre que estos últimos resulten aceptables en términos de salud o que, simplemente, no existan vías alternativas para el paciente.

Precisado lo anterior, podría llegar a ser contraproducente que se alimente un clima de alarma ante cada uno de los eventuales *retrocesos* de los que se tenga noticia para la puesta en práctica clínica de *CRISPR-Cas9*. Y es que, desde otra óptica, estos podrían representar un nuevo acicate para la Ciencia -piénsese, por ejemplo, en los resultados inesperadamente hallados- que tendrá ante sí la oportunidad de responder, como ya lo ha hecho en infinidad de ocasiones, con mayores -y mejores- dosis de investigación.

Empero, resulta francamente más sangrante que los resultados a divulgar carezcan de un mínimo de rigor en cuanto a las bases y constataciones fidedignas que se les presume. Y es que, además de poder comprometer los ingresos procedentes de las entidades financiadoras, se puede llegar a poner en duda la propia labor de muchos científicos que, conviene no olvidar, luchan denodadamente -algunos de ellos bajo precarias condiciones- para solventar todas y cada una de las adversidades que se van presentando. Debe apelarse, así, a la responsabilidad que les concierne tanto a las revistas científicas - sean o no de pago- que ofrecen sus servicios a los autores para publicar sus experimentos, como a los propios investigadores, ya que lo contrario puede repercutir gravemente no solo en la lógica desazón entre los compañeros de profesión, sino en el más absoluto descrédito frente a la opinión pública, que puede dejar de considerar la Ciencia como una opción plausible. De ahí que la concienciación en torno a una investigación responsable sea un mínimo que, en los tiempos de las *fake news*, no hay que dejar de proyectar.

Bibliografía

- BOTHMER, A. / MAEDER, M. L. / REYON, D. / WILSON, C. J. / COTTA-RAMUSINO, C. / FERNÁNDEZ, C. A. / MARCO, E. / BARRERA, L. A. / JAYARAM, H. / ALBRIGHT, C. F. / COX, G. F. / CHURCH, G. M. / MYER, V. E., "The experimental design and data interpretation in "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo" by Schaefer et al. are insufficient to support the conclusions drawn by the authors". Disponible en: http://arep.med.harvard.edu/pdf/Schaefer_Opinion_2Jun2017.pdf [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- BURGIO, G., "Should we be worried about CRISPR/Cas9 off target effects?", *Medium*, June 2017. Disponible en: <https://medium.com/@GaetanBurgio/should-we-be-worried-about-crispr-cas9-off-target-effects-57dafaf0bd53> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- CHARLESWORTH, C. T. / DESHPANDE, P. S. / DEVER, D. P. / DJENE, B. / GÓMEZ-OSPINA, N. / MANTRI, S. / PAVEL-DINU, M. / CAMARENA, J. / WEINBERG, K. I. / PORTEUS, M. H., "Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans", *BioRxiv. The preprint server for biology*, January 2018. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/01/05/243345.full.pdf> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- DE MIGUEL BERIAIN, I. / ARMAZA ARMAZA, E., "Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRISPR-Cas9 a debate", *Anales de la Cátedra Francisco Suárez*, Vol. 52, 2018. Disponible en: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/acfs/article/view/6555/5677> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- GASKELL, G. / BARD, I. / ALLANSDOTTIR, A. / VIEIRA DA CUNHA, R. / EDUARD, P. / HAMPPEL, J. / HILDT, E. / HOFMAIER, C. / KRONBERGER, N. / LAURSEN, S. / MEIJKNECHT, A. / NORDAL, S. / QUINTANILHA, A. / REVUELTA, G. / SALADIÉ, N. / SANDOR, J. / BORLIDO SANTOS, J. / SEYRINGER, S. / SINGH, L. / SOMSEN, H. / TOONDERS, W. / TORGERSEN, H. / TORRE, V. / VARJU, M. / ZWART, H., "Public views on gene editing and its uses", *Nature Biotechnology*, No. 35, November 2017. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.3958> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- IYER, V. / BOROVIAK, K. / THOMAS, M. / DOE, B. / RYDER, E. / ADAMS, D., "No unexpected CRISPR-Cas9 off target activity revealed by trio sequencing of gene-edited mice", *BioRxiv. The preprint server for biology*, February 2018. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/02/09/263129.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- IYER, V. / SHEN, B. / ZHANG, W. / HODGKINS, A. / KEANE, T. / HUANG, X. / SKARNES, W. C., "Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice", *Nature Methods*, No. 12, May 2015. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3408> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- JINEK, M. / CHYLINSKI, K. / FONFARA, I. / HAUER, M. / DOUDNA, J.A. / CHARPENTIER, E., "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity", *Science*, Vol. 337, August 2012.
- JOSEPH, A., "Genome-editing companies play down CRISPR paper, as concerns drive down shares", STAT- Reporting from the frontiers of health and medicine (Biotech), January 8, 2018. Disponible en: <https://www.statnews.com/2018/01/08/crispr-immune-systems-companies/> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- LACADENA, J.-R., "Genética y Humanismo. Edición genómica: ciencia y ética", *Revista Iberoamericana de Bioética*, Núm. 3, 2017.
- LAREAU, C. / CLEMENT, K. / HSU, J. Y. / PATTANAYAK, V. / JOUNG, J. K. / ARYEE, M. J. / PINELLO, A., "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo" are most likely pre-existing sequence variants and not nuclease-induced mutations", *BioRxiv. The preprint server for biology*, July 2017. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/07/05/159707.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- MOJICA, F. J. M. / JUEZ, G. / RODRÍGUEZ-VALERA, F., "Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites", *Molecular Microbiology*, No. 3, Vol. 9, August 1993.
- SCHAEFER, K. A. / WU, W.-H. / COLGAN, D. F. / TSANG, S. H. / BASSUK, A. G. / MAHAJAN, V. B., "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo", *Nature Methods*, No. 14, May 2017. Disponible en: <https://www.nature.com/nmeth/journal/v14/n6/full/nmeth.4293.html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- SCHAEFER, K. A. / DARBRO, B. W. / COLGAN, D. F. / TSANG, S. H. / BASSUK, A. G. / MAHAJAN, V. B., "Corrigendum and follow-up: Whole genome sequencing of multiple CRISPR-edited mouse lines suggests no excess mutations", *BioRxiv. The preprint server for biology*, June 2017. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/03/26/154450.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].
- SERUGGIA, D. / FERNÁNDEZ, A. / CANTERO, M. / PELCZAR, P. / MONTOLIU, L., "Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis", *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, April 2015. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/43/10/4855/2409455> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

WAGNER, D. L. / AMANI, L. / WENDERING, D. J. / REINKE, P. / VOLK, H.-D. / SCHMUECK-HENNERESSE, M., “High prevalence of *S. pyogenes* Cas9-specific T cell sensitization within the adult human population - A balanced effector/regulatory T cell response”, *The preprint server for biology*, April 2018. en: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/04/04/295139.full.pdf+html> [Última consulta: 11 de mayo de 2018].

ZETSCHKE, B. / GOOTENBERG, J. S. / ABUDAYYEH, O. O. / SLAYMAKER, I. M. / MAKAROVA, K. S. / ESSELETZBICHLER, P. / VOLZ, S. E. / JOUNG, J. / VAN DER OOST, J. / REGEV, A. / KOONIN, E. V. / ZHANG, F., “Cpf Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System”, *Cell*, Vol. 163, October 2015. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)01200-3](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)01200-3) [Última consulta: 11 de mayo de 2018].