

DESAFÍOS ÉTICOS Y JURÍDICOS DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS GENÓMICAS

“Reescribir el genoma: un sueño al alcance de la mano”

Santiago Torres Martínez
Catedrático de Genética
Universidad de Murcia
storres@um.es

Los antecedentes

El pasado 23 de octubre se entregaba en Oviedo el Premio Princesa de Asturias de “Investigación Científica y Técnica” a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, por

‘los avances científicos que han conducido al desarrollo de una tecnología que permite modificar genes, con gran precisión y sencillez en todo tipo de células, posibilitando cambios que suponen una verdadera “edición del genoma”’.

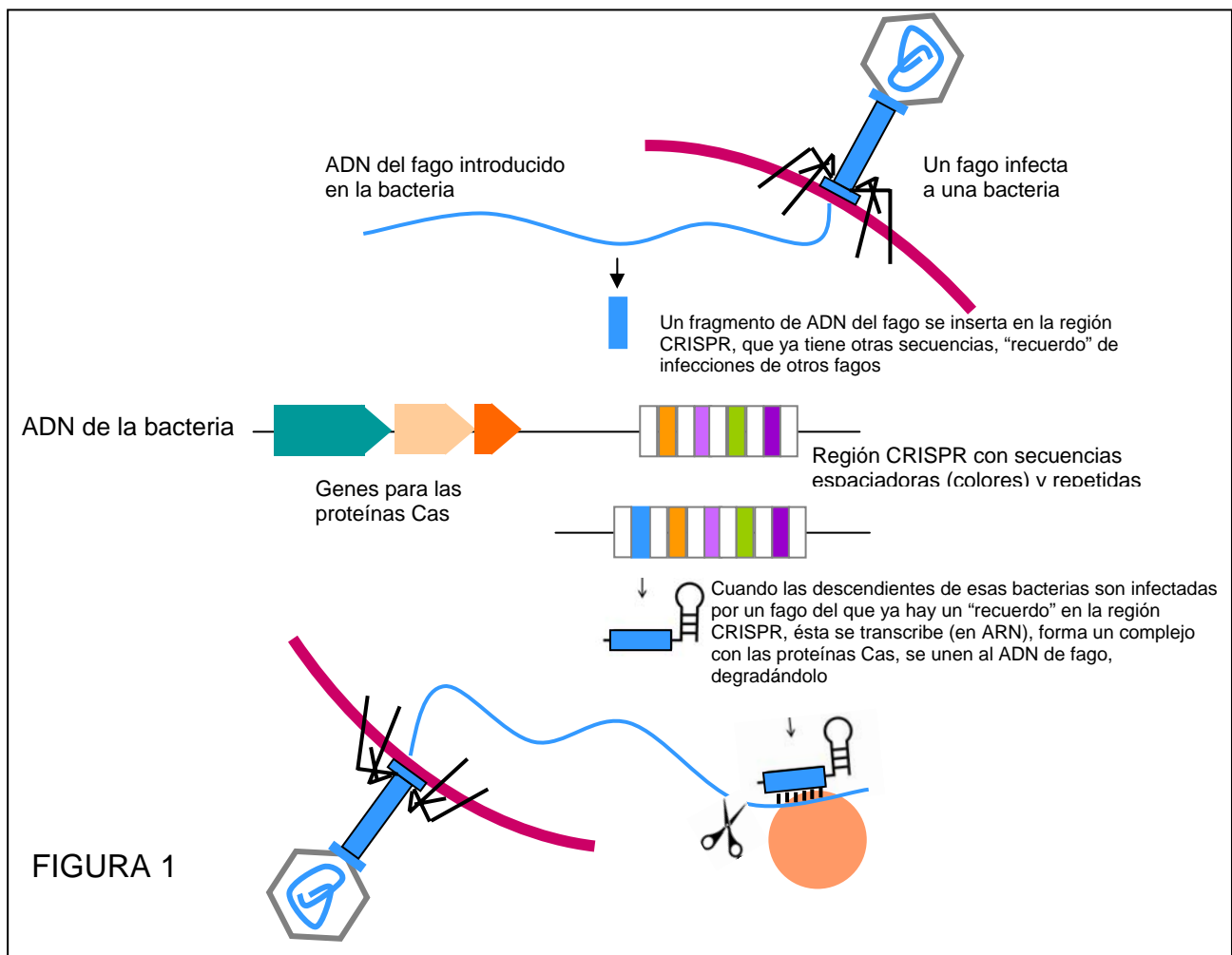
¿Cuáles eran esos avances científicos que mencionaba el jurado de esos Premios? Para entenderlos adecuadamente hay que remontarse a finales de los años ochenta del pasado siglo¹, y no muy lejos de aquí, a las salinas de Santa Pola, en cuyas aguas habita la arquea *Haloferox mediterranei*, un microorganismo unicelular parecido a las bacterias, muy resistente a las altas concentraciones salinas. Con este microorganismo trabajaba el biólogo Francisco Mójica, a la sazón estudiante de doctorado en la Universidad de Alicante. Analizando el ADN de este microorganismo, Mójica encontró una curiosa estructura formada por secuencias de 30 bases (A, T, G, C) que se repetían varias veces, separadas entre sí por una secuencia “espaciadora” de unas 36 bases. Algo que, en principio, no iba más allá de una curiosidad científica. De forma independiente, en el año 1985, Atsuo Nakata² y sus colegas de la Universidad de Osaka, en Japón, describieron la existencia, en el genoma de la bacteria *Escherichia coli*, de una secuencia breve de ADN, de 29 bases, que se repetía 14 veces. Entre cada repetición se encontraban secuencias de 32 ó 33 bases (las secuencias “espaciadoras”) que eran de secuencia única, no se repetían.

El significado biológico de este conglomerado de secuencias era un misterio, pero lo que sí se comprobó pronto es que no era exclusivo de *E. coli*, ni de *H. mediterranei*, sino que se podían encontrar secuencias similares en otras muchas arqueas y bacterias, algunas

muy distantes evolutivamente. También en este descubrimiento tuvo bastante que ver Mójica³. De hecho, hoy sabemos que un tipo de organización similar está presente en el 45% de los genomas de bacterias secuenciados y en el 84% de los de arqueas, organismos parecidos a las bacterias que forman uno de los tres “dominios” de la vida (los otros dos son las bacterias y los eucariotas, que es al que los humanos pertenecemos). Por sus características estructurales y organizativas, estas secuencias se designaron, a sugerencia del propio Mójica, como “*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*” (CRISPR), esto es, “repeticiones palindrómicas breves, agrupadas y espaciadas de forma regular”. Las secuencias CRISPR, además, no se encuentran solas, sino que junto a ellas se localiza un grupo de genes para los que se acuñó el nombre de CAS (**CRISPR-associated**). Por ello, al conjunto se le denomina sistema CRISPR-Cas.

Hubo que esperar hasta el año 2005 para que varios grupos de investigadores correlacionaran la existencia del sistema CRISPR-Cas con una suerte de “inmunidad” frente a la invasión de “agentes extracromosómicos”, como los virus (los que infectan a las bacterias se denominan fagos). Es de justicia resaltar aquí que el grupo de Mójica fue quizás el primero en proponer esa correlación, en 2003, pero lamentablemente no encontró el apoyo de las principales revistas científicas, que rechazaron su trabajo, y tuvo que esperar hasta 2005 para publicarlo en una revista de menos impacto⁴. ¿Cómo funciona esa “inmunidad”? Los investigadores observaron que cuando un cultivo de bacterias era infectado por un determinado fago (recuérdese, un virus de bacterias), algunas de ellas resultaban “resistentes” a ese fago. Al analizar la región CRISPR de estas bacterias resistentes se observó que a dicha región se había incorporado una nueva secuencia “espaciadora”, de 32 ó 33 bases, procedente del fago que las infectó. Estas bacterias que habían incorporado esta nueva secuencia se volvían resistentes a ese fago, esto es, se volvían “inmunes”. ¿Cómo lo hacían? El mecanismo es sencillo y “elegante”. La región CRISPR no es ningún “fósil” inerte, sino que se “expresa”, esto es se transcribe como si fuera un gen cualquiera, pasando la información que está en formato de ADN a una molécula distinta, el ARN. Pero, a diferencia de los genes que llevan información para que se fabrique una proteína, que se transcribe primero a ARN y éste después se “traduce” dando lugar a la proteína, el ARN de CRISPR no se traduce, sino que es procesado (fragmentado) e incorporado a trocitos en un complejo en el que participa también la proteína Cas. Durante el procesamiento se eliminan las secuencias repetidas, quedando sólo las espaciadoras. De esta manera, se forman complejos que llevan proteína Cas y pequeños trozos de ARN con secuencias espaciadoras que, recuérdese,

proceden de fagos que previamente infectaron a esas bacterias. Cuando la bacteria es infectada por un fago (Figura 1), éste introduce su material genético (normalmente ADN) dentro de la bacteria, pero si esta bacteria (en realidad una antecesora suya) ya ha sido previamente infectada por ese mismo tipo de fago y una pequeña secuencia de éste se ha incorporado al genoma de la bacteria, en la región CRISPR, el ADN del fago va a ser reconocido por uno de esos complejos ARN-Cas, concretamente el que lleve secuencias idénticas al fago, y se unirá a él “por complementariedad” (de la misma manera que se unen las bases enfrentadas que forman la doble hélice del ADN). Esta es la señal para que la proteína Cas actúe como unas tijeras moleculares, cortando el ADN por el sitio donde se ha emparejado con el pequeño trozo de ARN correspondiente a la secuencia espaciadora. Una vez cortado, el ADN se degrada, porque la bacteria es incapaz de “reparar” ese corte provocado por la tijera molecular. En resumen, el complejo ARN-Cas reconoce a toda secuencia de ADN que sea “complementaria” a la secuencia de ese ARN y lo corta, provocando su degradación. Así funciona el mecanismo de inmunidad bacteriano, confiriendo “resistencia” al fago al degradar su material genético.



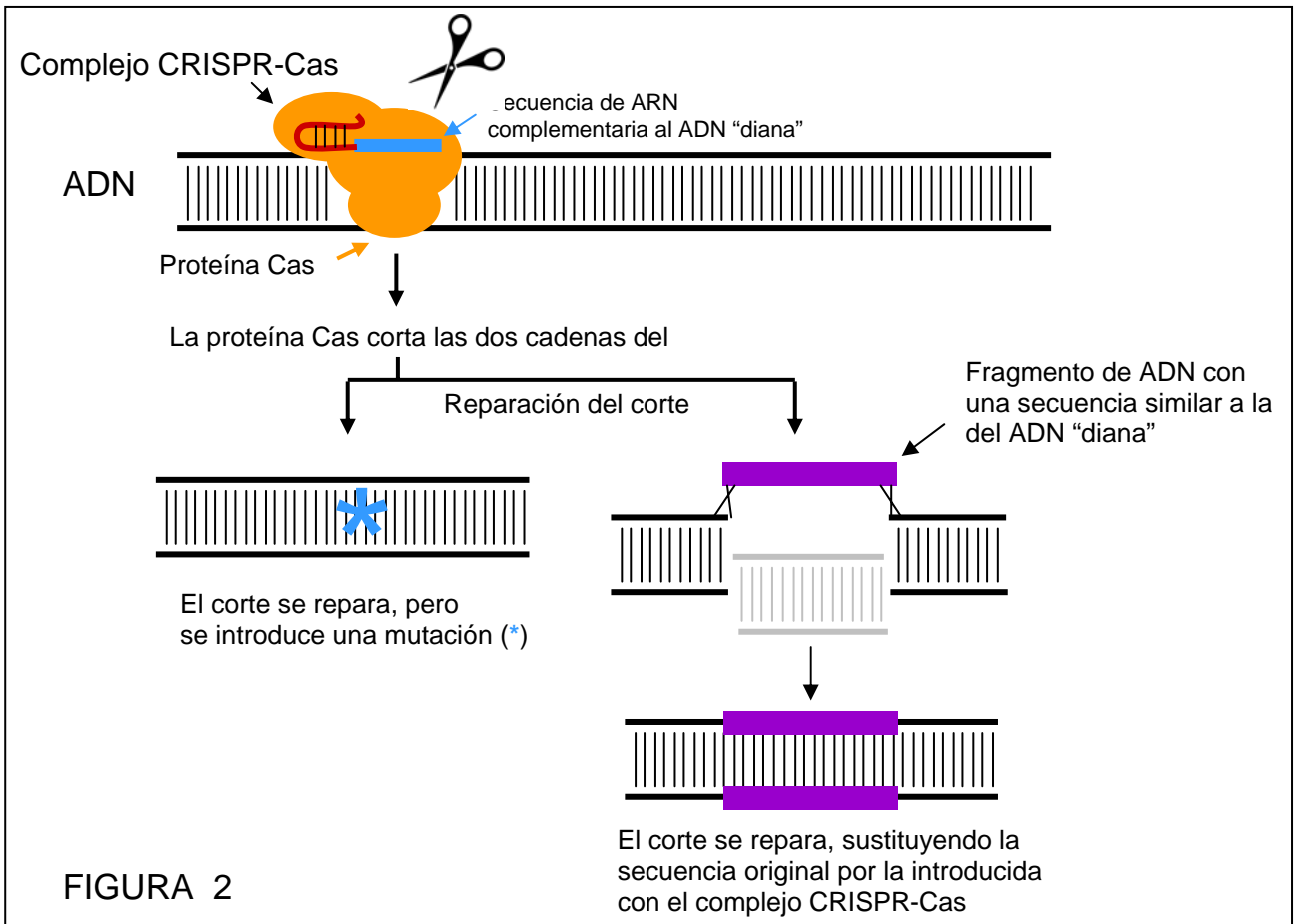
Las herramientas

En este punto puede ser útil recuperar lo que el jurado de los premios Princesa de Asturias escribía para justificar la concesión del premio:

“Ambas investigadoras estudiaron la forma en que determinadas bacterias se defienden de los virus que las infectan, destruyendo el ADN de los mismos tras reconocer algunas de sus características específicas. A partir de estos avances unieron sus esfuerzos con una visión innovadora que les ha permitido desarrollar lo que se ha denominado el sistema CRISPR-Cas. Se trata de un método de aplicación universal basado en el diseño de pequeñas moléculas de ARN que sirven de guía a la enzima Cas9 para actuar sobre el ADN, permitiendo modificar genes en las propias células”.

Ya hemos visto cómo funciona el sistema CRISPR-Cas en su ambiente natural, pero ¿en qué consistió esa “visión innovadora” que llevó a Charpentier y a Doudna a desarrollar su revolucionario método? La idea, en principio, parece sencilla y trivial^{5,6}. Si queremos que el complejo CRISPR-Cas se “dirija” específicamente hacia una secuencia de ADN (la “diana”) de una célula de un organismo concreto, bastaría con “fabricar” una pequeña molécula de ARN (que actuaría como la secuencia espaciadora de la región CRISPR) complementaria a la región de ese ADN “diana”, y adosarle después una proteína Cas. Lo siguiente es introducir este complejo sintético [ARN-Cas] dentro de la célula, para que una vez allí se una, por complementariedad, a la secuencia de ADN “diana”. Una vez conseguida la unión ADN-ARN, la proteína Cas (la “tijera”) cortará al ADN justo por ese sitio. ¿Y qué pasa ahora? Lo normal es que cuando se produce una rotura de ese tipo en el ADN se pongan en funcionamiento las maquinarias de reparación de daños que suelen tener prácticamente todas las células y todos los organismos. El problema es que, a veces, cuando se intentan reparar esos daños se pueden producir pérdidas de algunas bases (mutaciones) en el sitio donde se produce la reparación. Como consecuencia de ello, se puede alterar el mensaje que lleva la información para fabricar una proteína, con el resultado final de que, tras el corte del ADN por Cas y la posterior reparación, se genera una mutación en un sitio específico. También puede ocurrir que, si a la vez que se introduce el complejo sintético [ARN-Cas] en la célula, se introduce con él un fragmento de ADN con una secuencia parecida a la del ADN “diana”, la maquinaria que repara el daño producido por Cas “intercambia” un fragmento del ADN “diana” por el que se ha

introducido exógenamente. Si se piensa detenidamente, las consecuencias de una u otra variante del sistema de reparación de daños inducidos por el complejo [ARN-Cas] son realmente extraordinarias. En el primero de los casos, se puede utilizar el sistema CRISPR-Cas para provocar mutaciones en sitios concretos. En el segundo, para intercambiar específicamente un segmento de ADN por otro. En ambos casos, de una forma simple y relativamente barata.



Las aplicaciones

¿Cuál es el interés de poder provocar mutaciones en sitios específicos? Es la propia esencia de la Genética. La estrategia genética a la hora de estudiar un proceso biológico, una función, se basa en la obtención de mutantes afectados en dicha función. La idea es que para saber cómo funciona algo y cuáles son los "protagonistas" (genes) que participan en dicho proceso, lo primero que hay que hacer es alterar (mediante mutaciones) la función, el proceso, y analizar los mutantes. Así sabremos cuántos genes (y proteínas) participan en una función. Esta tarea no es fácil. En los principios de la

genética, las mutaciones se provocaban al azar, con mutágenos, y luego se diseñaban procedimientos más o menos ingeniosos para “seleccionar” los mutantes deseados. Más recientemente, se han diseñados protocolos para hacer esta tarea de forma más dirigida, pero con el inconveniente de que éstos no son universales, no valen para todas las células ni todos los organismos, y además son muy laboriosos. El sistema CRISPR-Cas, en este sentido, es la herramienta ideal.

Pero lo que puede realmente revolucionar la biomedicina no es ya provocar cambios (mutaciones) en sitios concretos, sino la posibilidad de intercambiar específicamente un segmento de ADN por otro. Imagínense sólo por un momento la posibilidad de “curar” una enfermedad, debida a la alteración de un gen, cambiando simplemente el segmento de ADN dañado por otro “sano”. Eso es lo que haría el sistema CRISPR-Cas. Los ensayos para demostrar que tal tipo de terapia es posible se han hecho ya en ratones, que son el modelo animal más próximo a la especie humana con el que se puede experimentar en el laboratorio. Y los resultados son espectaculares. Así, por ejemplo, se ha conseguido corregir en ratones unas cataratas hereditarias, inyectando en el cigoto (la célula que resulta tras la fertilización de un óvulo por un espermatozoide) el complejo CRISPR-Cas con todos los elementos necesarios para ello. Con una estrategia similar se ha conseguido también corregir en ratones una distrofia muscular, similar a la de Duchenne en humanos, una enfermedad degenerativa grave ligada al cromosoma X⁷. Pero quizás uno de los logros recientes más espectaculares es el que ha permitido a un equipo de la Universidad de Harvard modificar embriones de cerdo para eliminar dos de los mayores inconvenientes que limitaban el uso de órganos de estos animales para transplantes en humanos: su rechazo por parte del sistema inmune humano y las infecciones causadas por virus que son residentes habituales del genoma del cerdo. Para ello han modificado más de 80 genes que son los causantes de estos problemas, un hito que pone de relieve el extraordinario poder de esta nueva técnica para modificar el genoma, en este caso con fines terapéuticos para la especie humana⁸. Todas estas actuaciones se han llevado a cabo inyectando todo el material (el ARN-Cas y el fragmento de ADN que se desea reemplazar) en cigotos. Tras el desarrollo embrionario, el organismo adulto que resulta lleva modificado (“editado”) el genoma en todas sus células. Son modificaciones permanentes, que se van a transmitir a toda la descendencia. Con ellas, se ha alterado la “línea germinal”.

Los hechos

La mera idea de poder extender estas aplicaciones a los seres humanos ha encendido todas las alarmas, porque el trasfondo ético de este tipo de intervenciones tiene una dimensión realmente extraordinaria. Pero, además, es que a nivel mundial no hay unanimidad en cuanto al tratamiento legal de la modificación genética de la línea germinal humana⁹. Así, hay países, que son permisivos en cuanto a la investigación con células madre procedentes de embriones humanos, en los que está estrictamente prohibida por ley la modificación genética de la línea germinal humana. Es el caso de España, donde las investigaciones que afectan a la línea germinal están rechazadas por el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina, o Convenio de Oviedo^{16,17}, que en su artículo 13 establece 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”*. En otros países, como los Estados Unidos, no están oficialmente prohibidas por ley las modificaciones de la línea germinal, pero los “Comités Consultivos para el uso del ADN Recombinante” (RAC) de los NIH, que son los órganos encargados de velar por las directrices reguladoras en este campo, claramente establecen que, por ahora, no se autorizarán propuestas encaminadas a la alteración de la línea germinal humana. Entre estas dos situaciones hay toda una serie de países, como Rusia, en los que la legislación es ambigua, bien por omisión, o por falta de concreción. O China, donde la normativa al respecto, sin rango de ley, prohíbe expresamente la clonación reproductiva en humanos, pero permite la “experimentación” con células madre obtenidas, por ejemplo, a partir de preembriones “sobrantes” en los procedimientos de fertilización *in vitro*, dejando a los comités de ética de las instituciones donde se realizan las investigaciones la responsabilidad de aprobarlas. La falta de concreción sobre los límites de la experimentación con preembriones ha permitido que recientemente un grupo de científicos chinos haya publicado el primer caso conocido de intento de modificar la línea germinal en humanos. Para ello utilizaron embriones “no viables”, esto es, que no podían dar lugar a un ser vivo, obtenidos de una clínica de fertilidad. Con ellos, los investigadores intentaron modificar el gen de la globina beta, responsable de una enfermedad fatal, la beta-talasemia¹¹. Los resultados, sin embargo, no han sido en absoluto satisfactorios y los propios investigadores reconocen que, de momento, los obstáculos encontrados han sido muy importantes. A pesar de ello, el mero hecho de que se haya intentado ha tenido un impacto extraordinario en la comunidad científica y en la sociedad en general. Unos

consideran que este fracaso es una advertencia seria para los que alegremente piensan que la tecnología ya está lista para empezar a erradicar genes responsables de enfermedades, actuando directamente sobre los embriones. Otros muchos, además, piensan que este tipo de trabajos traspasa una línea roja y alertan sobre el uso poco ético e inseguro de esta nueva técnica. Como ya sucedió en 1975, cuando se publicaron los primeros experimentos que abrirían la era de la ingeniería genética, muchos son los científicos, algunos de los cuales son los mismos que entonces ya se pusieron a la cabeza de las iniciativas que proponían medidas responsables, que proponen un debate amplio y multidisciplinar sobre qué hacer y cómo a partir de ahora¹². Desgraciadamente, y aunque *a priori* parece haber un amplio consenso de que este es el camino a seguir, el trabajo de los investigadores chinos puede haber desatado una carrera para tratar de solventar los obstáculos técnicos que les llevó al fracaso. De hecho, ya hay fuertes rumores de que otros grupos, también chinos, lo están intentando.

Es un hecho que la ciencia no se detiene. Mientras se escribía este artículo se han conocido dos hechos importantes, en relación con la aplicación en humanos de esta técnica. Uno de ellos es que un grupo de científicos del Instituto Francis Crick, de Londres, ha recibido autorización de la Human Fertilisation and Embriology Authority (HFEA) del Reino Unido para llevar a cabo experimentos de edición genómica en embriones humanos sanos, utilizando la técnica CRISPR-Cas, y que serían los primeros con respaldo legal en todo el mundo. El objetivo es estudiar genes que se activan inmediatamente después de la fertilización, y que por tanto son necesarios para un normal desarrollo del embrión. Una buena parte de los fracasos con las técnicas de fecundación *in vitro* podría deberse a fallos que implicarían a esos genes de expresión temprana, por lo que la aplicación de la técnica de edición genómica iría orientada al tratamiento de la infertilidad. La decisión de la HFEA autoriza exclusivamente la utilización de la técnica con fines de investigación, pero no reproductivos (que sigue siendo ilegal), y de hecho los experimentos se detendrían a los siete días del desarrollo del embrión, que después sería destruido. El otro, mucho más reciente, es la autorización, por parte de un panel de expertos de los Institutos de Salud de EEUU (NIH), de un ensayo clínico que probará un tratamiento contra el cáncer basado en esta técnica^{13,14}. El objetivo en primera instancia de este primer ensayo clínico, que se realizará en 18 pacientes con mieloma, sarcoma y melanoma, será probar si CRISPR-Cas es seguro para usarse en humanos. El objetivo es modificar tres genes de un tipo de glóbulos blancos, los linfocitos T, para que puedan atacar selectivamente, y con eficacia, a las células cancerosas.

En la actualidad, la aplicación de esta técnica en embriones humanos, en España, debería ser autorizada, si el objetivo es la investigación básica, por la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos. Esta Comisión fue creada por la Ley 14/2007 de Investigación biomédica y desarrollada por el Real Decreto 1527/2010, por el que se regulan tanto esa Comisión como el Registro de Proyectos de Investigación. Está adscrita al Instituto de Salud Carlos III. Para un caso similar al aprobado por los NIH (EEUU), y aunque nuestra legislación no contempla explícitamente este tipo de terapias, por similitud con el caso de los ensayos clínicos de terapia génica sobre células somáticas (no germinales) con virus, la responsabilidad sería del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

El dilema jurídico y ético

Desde un punto de vista jurídico, nuestra legislación es clara al respecto ya que, como se ha comentado, el Convenio de Oviedo^{16,17}, prohíbe las prácticas que tengan por finalidad la modificación del genoma de la descendencia, esto es, la línea germinal. Pronunciamientos sobre la protección del genoma humano se encuentran también, por ejemplo, en la Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos¹⁸, de 11 de noviembre de 1997 (que en su artículo 24 califica las intervenciones en la línea germinal como “*contrarias a la dignidad humana*”), y en la Declaración Universal de los Derechos Humanos de las Generaciones Futuras¹⁹, de 26 de febrero de 1994, que en su artículo 3 dispone expresamente que “*las personas que pertenecen a las generaciones futuras tienen derecho a la vida y preservación de la especie humana y se prohíbe causar daño a la vida en particular con actos que comprometan de forma irreversible la preservación de la especie humana, el genoma y la herencia genética*”.

El dilema fundamental se plantea desde el punto de vista ético, y tiene que ver con los límites que la sociedad está dispuesta a aceptar²⁰. ¿Se debe cuestionar, e incluso detener, el uso de una técnica que podría tener enormes beneficios desde un punto de vista terapéutico, por el temor de que su utilización fuera de estos fines pueda, en manos de algunos, derivar en la tentación de crear “criaturas de diseño”? Son ya algunos los grupos que utilizan estas técnicas de “reescritura” o edición del genoma (“corta y pega genético” la denominan algunos) con fines terapéuticos, para desarrollar terapias que

permitan corregir defectos genéticos en personas²¹. Por ello, es preciso establecer claramente las diferencias entre la aplicación de la técnica CRISPR-Cas exclusivamente en el individuo (un fin terapéutico), y que acaba en él, y la que resulta de la modificación directa del embrión para alterar la línea germinal (un fin reproductivo), ya que esta última supone la creación de un individuo con un material genético modificado, sin su consentimiento, y que además se podría transmitir de forma permanente a las futuras generaciones.

Encontrar respuestas a este tipo de dilemas y a cómo abordar toda la problemática planteada por la aplicación de la técnica CRISPR-Cas en humanos ha sido el objetivo de algunas reuniones que se han sucedido en los últimos meses. En una de ellas, celebrada a principios de 2015 en Napa, California, un importante grupo de científicos planteaba una serie de prioridades y propuestas¹². Entre las principales figuraba la necesidad de alcanzar unos niveles aceptables de seguridad y eficacia en la aplicación de la técnica, con una apuesta además por la máxima transparencia en las investigaciones encaminadas a evaluar dichos requisitos. Para los científicos, la utilización de la tecnología CRISPR-Cas debería además sustentarse sobre unos principios éticos básicos, siendo necesario un debate amplio entre la comunidad científica, la industria, los profesionales de la medicina, los organismos reguladores y el público en general sobre los usos responsables de esta tecnología.

¿Qué sería un “uso responsable” de esta técnica? Desde el punto de vista de su aplicación en humanos, claramente hay que distinguir entre los usos terapéuticos, en los que se actuaría sólo sobre la persona afectada, bien de forma sistémica o directamente sobre el órgano o tejido afectado (*in vivo*), o extrayendo células, modificándolas en el laboratorio y, una vez corregido el defecto, volviéndolas a introducir en el paciente (*ex vivo*), y los usos “eugenésicos”, esto es, actuando sobre la línea germinal, lo que conllevaría el uso de embriones, su modificación y su posterior implantación en el útero de una mujer para su desarrollo. En el primer caso, la modificación empieza y acaba en la persona, y en el segundo se transmitiría a su descendencia. Parece que el consenso sobre las ventajas y escasas implicaciones éticas de la aplicación terapéutica para curar o tratar enfermedades graves es general, y que sería ampliamente aceptado por la sociedad. Al fin y al cabo hay muchos casos ya de ensayos clínicos en los que se aplica la terapia basada en genes, sin más restricciones que las legalmente establecidas para este tipo de ensayos. ¿Cuáles podrían ser, sin embargo, las consecuencias que podrían derivarse de esa aplicación “eugenésica”, actuando sobre la línea germinal? Podrían ser

totalmente imprevistas, ya que nuestro conocimiento actual sobre las interacciones entre genes, genes-ambiente, y las rutas implicadas en muchas enfermedades es bastante limitado. Y, por supuesto, están las implicaciones éticas derivadas del hecho de que modificaciones de este tipo no se limitan al presente, sino que afectan también a las generaciones futuras.

En cualquier caso, es la sociedad la que en última instancia debería decidir sobre las normas que deben regir los principios sobre los que deben aplicarse estos avances científicos. Lo que hoy nos parece inaceptable mañana puede ser admisible. Lo verdaderamente fundamental es que todas las implicaciones sociales, ambientales y éticas puedan discutirse en base a una información seria y rigurosa, que debe ser aportada por expertos científicos, juristas, eticistas, etc., exentos de prejuicios. La información, la educación y la transparencia son los pilares que deben sustentar las decisiones que una sociedad debe tomar sobre su futuro. Y creo que no se exagera al decir que la técnica CRISPR-Cas es una de esas herramientas que puede marcar nuestro futuro.

Referencias

1. LANDER, E. S. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 2016, 164: 18-28
2. ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M., NAKATURA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987. 169:5429-5433
3. MOJICA, F. J. M., JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites. *Mol Microbiol.* 1993. 9: 613–621
4. MOJICA, F. J. M, DÍEZ-VILLASEÑOR, C, GERCÍA-MARTÍNEZ, J., SORIA, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol.* 2005. 60:174–182
5. 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.* 2012. 337:816-821
6. DOUDNA, J.A. and CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014. 346(6213):1258096.
7. LONG, CH., MCANALLY, J. R., SHELTON, J. M., MIREAULT, A. A., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E. N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9–mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014. 345:184-1188

8. YANG, L., GÜELL, M., NIU, D., GEORGE, H., LESH, E., GRISHIN, D., AACH, J., SHROCK, E., XU, W., POZI, J., CORTAZIO, R., WILKINSON, R. A. , FISHMAN, J. A., CHURCH, G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015. 350:1101-1104.
9. ARAKI, M., ISHII T. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014. 12:108-119
10. Ley 14, 2006. Sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE 27 de mayo 19947-19956.
11. LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, CH., HUANG, R., ZHANG, Z., LV, J., XIE, X., CHEN, Y., LI, Y., SUN, Y., BAI, Y., SONGYANG, Z., MA, W., ZHOU, C., HUANG J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprenuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015. 6:363–372
12. BALTIMORE, D., BERG, P., BOTCHAN, M., CARROLL, D., ALTA CHARO, R., CHURCH, G., CORN, J. E., DALEY, G. Q., DOUDNA, J. A., FENNER , M., GREELY, H. T., JINEK, M., MARTIN, G. S., PENHOET, E., PUCK, J., STERNBERG, S. H., WEISSMAN, J. S., YAMAMOTO, K. R. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. 348: 36-36
13. PICHEL, J. Todas las dudas sobre la edición de embriones humanos. (Revisado el 5 de Julio de 2016) http://www.lespanol.com/ciencia/20160623/134736988_0.html
14. DOMÍNGUEZ, N. El ‘cortapega’ genético llega a los humanos. (Revisado el 5 de Julio de 2016) http://elpais.com/elpais/2016/06/22/ciencia/1466609365_058334.html
15. Ley 14/2007 de investigación biomédica. BOE 4 de julio 28826- 28848.
16. 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 la biomedicina), hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997. B.O.E. de 20 de octubre de 1999; 251:36825-30.
17. Instrumento de Ratificación del Protocolo Adicional al Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de a Biología y la Medicina, por el que se prohíbe la clonación de seres humanos, hecho en París el 12 de enero de 1998. B.O.E. de 1 de Marzo de 2001; 52:7671-2.
18. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos. 11 de noviembre de 1997.
19. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura Declaración Universal de los Derechos Humanos de las Generaciones Futuras. 26 de febrero de 1994.
- 20 LANPHIER, E., URNOV, F., HAECKER, S. E., WERNER, M. and SMOLENSKI, J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015. 519:410-411
21. SAVI, C., SCHWANK , G- Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. 2016. *Transl Res*. 168:15-21.

