



INFORME DE LA COMISIÓN NACIONAL DE BIOSEGURIDAD SOBRE LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA (“EDICIÓN GENÉTICA”)

Antecedentes

La Corte Europea de Justicia dictaminó el 25 de julio de 2018 que los organismos obtenidos mediante nuevas técnicas de mutagénesis dirigida, entre las que se encuentra la edición genética, deben ser considerados organismos modificados genéticamente (OMG) y que por lo tanto su regulación debe estar sujeta a las obligaciones recogidas en la 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.

En octubre de 2018, el Consejo Interministerial de OMG solicitó un informe a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) en relación con: 1) la finalidad con la que se usan dichas técnicas en los distintos sectores biotecnológicos, 2) la comparación de los riesgos que su utilización pueda suponer para la salud y el medio ambiente en relación con otras técnicas de modificación genética que dan lugar a OMG u otras técnicas de mutagénesis tradicionalmente utilizadas para modificar plantas y animales y 3) sopesar, desde el punto de vista científico y de control de cumplimiento, la Sentencia del Tribunal de Justicia de la UE sobre este asunto.

Para la elaboración de este informe se ha contado, no solo con los expertos científicos de la Comisión Nacional de Bioseguridad, sino también con la participación de un grupo de Expertos *Ad-hoc* compuesto por representantes e investigadores del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Universidad de Lleida, Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP-UPM-INIA), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Universidad de Girona e INIA.

Introducción

Los métodos básicos de edición genética desarrollados hasta el momento se basan en la generación de un corte en una o en las dos hebras de la doble hélice del ADN realizado de forma precisa y dirigida en la región a editar. Este corte es luego reparado por la célula que dispone, para esto, de dos mecanismos alternativos. (1) La vía de reparación preferencial es la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos. Este mecanismo consiste en la simple unión de los extremos generados y típicamente introduce mutaciones adicionales al generar inserciones o deleciones en la zona de la unión. (2) La otra vía de reparación mucho menos frecuente es la recombinación homóloga que puede utilizar como molde la región correspondiente del cromosoma homólogo o una molécula exógena de ADN con homología de secuencia alrededor de la región del corte y provista para llevar a cabo la correcta unión de los extremos. El cromosoma así editado es luego heredado por las células hijas.

En las últimas décadas se han desarrollado distintas metodologías de edición genética entre las que se encuentran las basadas en nucleasas capaces de cortar la doble cadena del DNA de manera específica en un sitio predefinido del genoma gracias a su capacidad de reconocer secuencias específicas (por ejemplo, nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), nucleasas de dedos de zinc), modificaciones del genoma mediadas por ácidos nucleicos (mutagénesis dirigida por



oligonucleótidos ,ODM), o una combinación de las mismas (técnicas CRISPR/Cas9), y permiten las alteraciones específicas y precisas de los genomas de plantas, animales y microorganismos, en comparación con las llamadas “técnicas de mutagénesis tradicionales”.

Estas técnicas de edición genética se utilizan a menudo en investigación básica para el estudio de la regulación de genes, por ejemplo, en biomedicina, para la generación de nuevos modelos celulares y animales para la investigación de enfermedades, en biotecnología de plantas para la mejora de la calidad del cultivo, la generación de resistencias a enfermedades o herbicidas, por ejemplo, en terapia génica por la posibilidad de inactivar genes, corregir mutaciones e incluso insertar genes intactos, y en biotecnología industrial en la biosíntesis de productos farmacéuticos y químicos y biocombustibles, desarrollo de biosensores, y en biorremediación.

Riesgos asociados a la edición genética

La aplicación de las técnicas de edición genética puede implicar a día de hoy riesgos de introducirse mutaciones no deseadas en otras regiones del genoma (mutaciones *off-targets*)¹ y multitud de secuencias de ADN reparadas (mutaciones *on-target* o mosaicismo genético), incluidos los reordenamientos del genoma editado, lo cual podría ser perjudicial y tener consecuencias impredecibles².

Con respecto a las plantas hay que también tener en cuenta que pueden ocurrir alteraciones genéticas en condiciones naturales. Las plantas están constantemente expuestas a estrés ambiental (como la radiación UV-B), el ozono, la desecación y la rehidratación, y la contaminación del aire y del suelo, lo que puede causar como respuesta la rotura de una cadena o de la doble cadena del ADN. La reparación de estas mutaciones por los mismos mecanismos endógenos celulares anteriormente descritos puede dar lugar a errores, algunos de los cuales pueden inducir efectos tóxicos directos para reducir la síntesis de proteínas, destruir la membrana celular y la proteína fotosintética para inhibir el crecimiento de la planta, provocar fusiones de cromosomas o producir cambios genéticos en la planta que pueden transmitirse a las próximas generaciones. En ocasiones estas mutaciones son fuente de variación natural importante para la evolución de la planta y útil para la mejora de cultivos.

De forma convencional se han realizado en plantas mutaciones utilizando sustancias químicas con acción mutágena o radiaciones ionizantes. Sobre estas técnicas no se puede ejercer ningún control ni direccionamiento a genes específicos, y además requieren un largo proceso de selección, siendo probable que los productos finalmente seleccionados tengan mutaciones adicionales más allá de las que dan como resultado el rasgo deseado, algunas de las cuales pueden ser nocivas. Muchas de las plantas de consumo común obtenidas mediante estas técnicas, no se han sometido a una evaluación del riesgo y no han sido un motivo de preocupación respecto a su seguridad, con lo cual se puede considerar que la ausencia de incidentes en su historia de uso es un testimonio de su seguridad.

¹ Li, J.-F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, J.M. and Sheen, J. (2013) Multiplex and homologous recombination mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nat. Biotechnol. 31(8), 688–691.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J. et al. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31(8), 686–688.

Feng, Z., Mao, Y., Xu, N. et al. (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 111(12), 4632–4637.

² Wolt, J.D. (2017). Safety, security, and policy considerations for plan genome editing. Prog. Mol. Transl. Sci. 149, 215-241.



Las técnicas de edición genética son mucho más específicas que las técnicas tradicionales y, por tanto menos propensas a generar mutaciones no deseadas. En conjunto, las mutaciones *off-target* en plantas son en general menos frecuentes que las mutaciones somáticas que surgen durante el cultivo de tejidos³.

Se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar la precisión y eficiencia de estas técnicas, tales como acortar el tiempo de actividad de las nucleasas, evitar homodimerizaciones (en el caso de las TALEN y nucleasas de dedos de zinc), convertir las nucleasas en nickasas, creando así roturas de una sola hebra en lugar de roturas de una doble hebra, la obtención de nuevas nucleasas Cas más específicas, modificaciones de la unión al ADN, desarrollo de herramientas bioinformáticas para el diseño de estos instrumentos⁴, y el diseño de herramientas para caracterizar y detectar estos sitios *off-targets*⁵.

En cuanto a su aplicación en animales, el uso de estas técnicas, y en concreto la metodología CRISPR/Cas9, ha demostrado ser capaz de producir de forma relativamente rápida y rutinaria cambios genómicos discretos, tanto en células troncales pluripotentes embrionarias como en embriones. Los enfoques anteriores que trataban de crear modificaciones similares eran laboriosos y a menudo dejaban tras de sí grandes alteraciones como la introducción de genes de selección de antibióticos que requerían un segundo paso para su eliminación.

Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de crear mutaciones en mosaico de manera que algunas células portan la modificación deseada, otras portan otras modificaciones y otras no portan ninguna modificación. Para reducir la creación de animales mosaico la edición del genoma se debe llevar a cabo en un punto del desarrollo lo suficientemente temprano, de forma que todas las células del organismo posean la secuencia editada. Además, aunque los mecanismos subyacentes a las mutaciones en mosaico mediadas por CRISPR/Cas9 siguen siendo desconocidos, la expresión y actividad prolongada de Cas9 en embriones podría contribuir a su generación⁶. Por ello actualmente se utilizan RNP (ribonucleoproteínas) CRISPR-Cas9 que tienen un rango temporal de actividad limitado. En el estado actual del conocimiento se puede considerar seguro el uso de CRISPR/CAS9 utilizando técnicas “*ex vivo*” debido a que se puede seleccionar el clon deseado, mientras que el uso de esta técnica “*in vivo*” todavía dista de ser segura.

En líneas celulares cancerosas humanas se observó un 50% más de mutaciones *off-target* que mutaciones en la secuencia específica debido a que en estas células el sistema de reparación del ADN es defectuoso⁷. Cuando se utilizaron células troncales, la secuenciación del genoma completo reveló

³ Li, M., Li X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DE1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front.Plant Sci.* 7,377

⁴ Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, Forni G, Lade SB, Soto E, Jin X, Medina V, Villorbina G, Muñoz P, Farré G, Fischer R, Twyman RM, Capell T, Christou P, Schillberg S (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J.* 2016 Dec;14(12):2203-2216.

⁵ Cameron, P., Fuller, C. K., Donohoue, P.D., Jones, B. N.,Thompson, M.S., Carter, M.M., (2017). Mapping the genomic landscape of CRISPR/Cas9 cleavage. *Nat. Methods* 14, 600-606.

⁶ Tu, Z¹, Yang, W., Yan, S., Yin, A., Gao, J., Liu, X., Zheng, Y., Zheng, J., Li, Z., Yang, S., Li, S., Guo, X., Li, X. *J. Sci Rep.* 2017 Feb 3;7:42081. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos.

⁷ Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR–Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.

Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H.R., Hwang, J. (2015). Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods*, 12, 237–243.



la ausencia de mutaciones *off-target*⁸ o solo unos pocos eventos⁹. Por otra parte, se ha demostrado en animales que la edición genética puede inducir una respuesta en las células que intenta proteger contra el daño del ADN. Esta respuesta implicaría la activación del gen p53, el guardián del genoma, que intenta reparar la ruptura del ADN. Se ha encontrado que CRISPR/Cas9 funciona más eficazmente en células troncales pluripotentes humanas con genes p53 disfuncionales. Sin embargo, estas son las que tienen mayor predisposición a transformarse en células tumorales. Es decir, que la edición genética con CRISPR/Cas9 y la inserción en un paciente de estas células modificadas con baja o nula actividad p53 podría aumentar el riesgo que en el paciente se desencadene cáncer¹⁰, por lo que se debe asegurar que las células que se administren al paciente poseen p53 intacto.

Por otro lado, se ha comprobado que la mayoría de individuos tiene anticuerpos circulantes dirigidos a las dos formas más utilizadas de la proteína Cas9 empleada en CRISPR, derivadas de dos bacterias patógenas gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* causantes de las infecciones nosocomiales (en hospitales) o de laringitis/otitis, respectivamente, y por ello, nuestro sistema inmunitario ha desarrollado ya tanto anticuerpos como linfocitos contra estas bacterias y sus componentes, incluidas las nucleasas Cas9, lo que bloquearía su aplicación de esta metodología en ensayos clínicos¹¹, a no ser que se usará una terapia inmunosupresora co-administrada. En este sentido se está trabajando en buscar genes Cas de especies de bacterias y arqueas de nichos ecológicos con los que las poblaciones humanas no han estado en contacto y para las que por lo tanto, no se encontrarán inmunizados. También se están haciendo estudios para la generación de proteínas Cas sintéticas no reconocidas por el sistema inmune humano.

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado al inicio de este informe, la Corte Europea de Justicia en su dictamen considera que los organismos obtenidos mediante las “técnicas de mutagénesis tradicional” utilizadas convencionalmente y que tienen largo historial de seguridad, siguen estando exentos de la regulación de OMG. En cambio, esta sentencia asume que el riesgo asociado al uso de las técnicas de mutagénesis dirigida (incluida la edición genética) podría ser similar a los riesgos de los OMG obtenidos mediante técnicas que suponen la incorporación en un organismo de material genético extraño (transgénesis). En este sentido con respecto a estos últimos, hay que señalar que tras más de 30 años de estudios sobre los propios OMG, hasta la fecha no se han detectado efectos adversos indeseables para la salud o el medio ambiente.

La mutagénesis dirigida en este aspecto se sitúa dentro de las técnicas con mínimo riesgo por su especificidad y selección.

Con anterioridad a las técnicas de edición genética, la introducción de rasgos novedosos en los organismos por ingeniería genética se basaba principalmente en el uso de técnicas de introducción

⁸ Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y. (2014). Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 15,12–13.

⁹ Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 15, 27–30.

¹⁰ Leslie K. F. CRISPR, cancer, and p53. *Sci. Signal*. 17 Jul 2018:Vol. 11, Issue 539.

¹¹ Carsten, T. Ch., Priyanka, S. D., Daniel, P. D., Beruh, D., Natalia, G.-O., Sruthi, M., Mara, P.-D., Joab C., Kenneth, W., Matthew, H. P. Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans, bioRxiv preprint first posted online Jan. 5, 2018.



estable, pero aleatoria, de la modificación genética (por ejemplo, mutagénesis convencional) o de material genético extraño (transgénesis). Debido a la aleatoriedad, se pueden producir alteraciones no deseadas en el genoma, como la interrupción (no deseada) de genes y/o elementos reguladores, o la creación de nuevos marcos de lectura abiertos (por ejemplo, con una secuencia similar a toxinas o alérgenos conocidos), lo que explica por qué los procesos de selección de OMG con rasgos deseables a menudo son complicados y requieren mucho tiempo. El uso de la edición genética ofrece la posibilidad de reducir la probabilidad de estos efectos adversos no deseados, ya que proporciona una manera de dirigirse a un locus predefinido del genoma, junto con una rápida selección posterior para conseguir la alteración genética deseada, desechando todas las demás que pudieran haber sido generadas.

En el caso de las plantas, la edición genética puede dar lugar a variedades que no se distinguen genéticamente de aquellas que portan la misma modificación generada de forma espontánea, desarrolladas por introgresión del gen deseado mediante sucesivos cruzamientos o inducida mediante mutagénesis tradicional y sin embargo, los requisitos reglamentarios para cada una de estas variedades serían diferentes, lo cual es de difícil comprensión desde el punto de vista científico. Para muchos de los productos es difícil, si no imposible, disponer de un método de detección. En el caso de que no se informe sobre la técnica utilizada para la obtención de determinadas modificaciones, no se podrá diferenciar si se han obtenido por técnicas de edición genética o cualquiera de las técnicas no sometidas a regulación.

Teniendo en cuenta la dificultad para la detección, identificación y cuantificación se presenta un panorama difícil para cumplir igualmente con las obligaciones que recoge la directiva respecto a la trazabilidad y el etiquetado de los OMG, lo cual será aún más difícil para variedades, que obtenidas mediante estas técnicas, procedan de países cuya legislación no las consideran OMG, y que, sin lugar a dudas, empezarán pronto a llegar a nuestros mercados de consumo.

La Comisión Nacional de Bioseguridad ya recogió, en su informe de noviembre de 2015 sobre nuevas técnicas de mejora genética para plantas, su opinión respecto a si los productos obtenidos mediante la utilización de estas técnicas deben considerarse OMG. En este informe se indica que para determinar si un organismo entra dentro del ámbito de aplicación de la Directiva 2001/18/CE se debería evaluar el producto y no la técnica con la que se obtiene y se debería establecer la seguridad del producto en función de sus nuevas características, el medio ambiente en el que se cultiva y las prácticas agrícolas, en el caso de plantas, y la exposición de los humanos y los animales.

Por todos estos motivos y ante el rápido avance de estas nuevas herramientas biotecnológicas, la CNB considera que todavía son necesarias aclaraciones sobre algunas cuestiones de implementación por parte de las instancias europeas pero, así mismo, aboga por una revisión de la actual normativa sobre OMG que refleje los últimos conocimientos y que, basándose en la evidencia científica y técnica, garantice la seguridad para la salud y el medioambiente. Si no se actualiza la legislación se pueden dar consecuencias importantes para la salud de los ciudadanos europeos, para el comercio internacional, para la cooperación con los países en vías en desarrollo y también para el avance científico europeo.

En este sentido se estaría de acuerdo con lo recogido en el informe del grupo científico asesor de la Comisión Europea¹² en que *“Es necesario mejorar la legislación de la UE sobre OMG para que sea clara, basada en evidencia, aplicable, proporcionada y lo suficientemente flexible para hacer frente a los avances futuros en ciencia y tecnología en esta área. Para lograr esto, recomendamos revisar la*

¹² https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/2018_11_gcsa_statement_gene_editing_2.pdf



actual Directiva de OMG para reflejar el conocimiento actual y la evidencia científica, en particular sobre la edición de genes y las técnicas establecidas de modificación genética. Esto debe hacerse en relación a otra legislación relevante para la seguridad alimentaria y la protección del medio ambiente”.

Madrid, 14 de enero de 2019