

L'edició genòmica i el seu impacte

Informe de la Secció de Ciències Biològiques
de l'Institut d'Estudis Catalans



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

L'edició genòmica
i el seu impacte

L'edició genòmica i el seu impacte

Informe de la Secció de Ciències Biològiques
de l'Institut d'Estudis Catalans

MARC EXPÒSIT-GOY
RAMON BARTRONS
JAUME BERTRANPETIT



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

L'edició genòmica i el seu impacte: informe de la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans. — Primera edició

Bibliografia. — Conté l'informe sobre l'Edició genòmica i el seu impacte i resums de les presentacions del cicle de conferències i de les ponències de la Jornada sobre Edició genòmica (24.11.2020). — Text en català

ISBN 978-84-9965-562-8

I. Expòsit-Goy, Marc, editor literari II. Bartrons, Ramon, editor literari

III. Bertranpetit, Jaume, editor literari IV. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques

1. Edició genòmica — Catalunya

Informe de la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans.

Consell de Govern

President: Pere Puigdomènech

Vicepresident: Ramon Bartrons

Secretària: Montserrat Aguadé

Tresorer: Joaquim Gosálbez

Vocal: Jordi Casanova

© Jo Milne, per a la il·lustració de la coberta (<https://jomilne.com>)

© 2020, Institut d'Estudis Catalans

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: novembre del 2020

Compost i imprès per Kit-book Serveis Editorials, S.C.P.

ISBN: 978-84-9965-562-8

Dipòsit Legal: B 20159-2020



Aquesta obra és d'ús lliure, però està sotmesa a les condicions de la llicència pública de *Creative Commons*. Es pot reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada. Es pot trobar una còpia completa dels termes d'aquesta llicència a l'adreça: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/deed.ca>.

ÍNDIX GENERAL

ABREVIACIONS	9
PREÀMBUL,	13
per Ramon Bartrons i Jaume Bertanpetit	
SUMARI EXECUTIU	17
1. INTRODUCCIÓ	21
2. LES TECNOLOGIES D'EDICIÓ GENÒMICA	23
2.1. Precursors de l'edició genòmica amb CRISPR-Cas9.....	23
2.2. El sistema CRISPR-Cas9.....	26
2.3. Darrers avenços derivats de CRISPR-Cas9	29
3. L'EDICIÓ GENÒMICA EN RECERCA BIOMÈDICA.....	33
3.1. CRISPR <i>screens</i>	33
3.2. Edició genòmica en cèl·lules mare humanes.....	36
3.2.1. <i>Models de malalties</i>	37
3.2.2. <i>Descoberta de fàrmacs</i>	38
3.2.3. <i>Estudi del desenvolupament humà</i>	39
4. L'EDICIÓ DE GENOMES MICROBIANS	41
4.1. Aplicacions de l'edició genòmica en procariotes	41
4.2. Aplicacions de l'edició genòmica en fongs i microalgues.....	44

5. L'EDICIÓ DE GENOMES DE PLANTES I ELS OMG	45
5.1. Perspectiva històrica.....	45
5.2. Aplicacions de l'edició genòmica en conreus agrícoles	48
5.3. Reptes ecològics, ètics i legals	49
6. L'EDICIÓ GENÒMICA EN ANIMALS	53
6.1. L'edició en models de malaltia <i>in vivo</i>	53
6.2. L'edició genòmica i la ramaderia	55
6.3. Aplicacions futures de l'edició genòmica en animals	56
7. L'EDICIÓ GENÒMICA EN ELS HUMANS	61
7.1. L'edició de la línia somàtica en teràpia	62
7.2. L'edició genòmica germinal.....	64
7.3. La millora de les qualitats humanes per mitjà de l'edició genòmica	66
8. IMPLICACIONS ECONÒMIQUES, LEGALS, ÈTIQUES I SOCIALS.....	69
8.1. Panorama de les patents derivades de CRISPR-Cas9.....	69
8.2. Conseqüències socials i ètiques de l'edició genòmica en humans	72
9. BIBLIOGRAFIA.....	77
10. RESUMS DE LES PRESENTACIONS DEL CICLE DE CONFERÈNCIES	87
10.1. Per què l'edició genètica ha revolucionat la biologia?,..... per <i>Lluís Montoliu</i>	87
10.2. L'edició en cèl·lules somàtiques i cèl·lules mare pluripotencials. Aplicacions terapèutiques,..... per <i>Núria Montserrat</i>	89
10.3. L'edició en cèl·lules somàtiques. Aplicacions terapèutiques,..... per <i>Àngel Raya</i>	90
10.4. L'edició genòmica en plantes: la seva aplicació a la millora genètica i la seva regulació a Europa,..... per <i>Josep M. Casacuberta</i>	94

10.5.	L'edició genètica i el seu impacte en el futur de l'agricultura,	95
	per <i>Diego Orzáez</i>	
10.6.	Enginyeria precisa del genoma de mamífers,.....	96
	per <i>Marc Güell</i>	
10.7.	Edició gènica en embrions de ratolí mitjançant la tecnologia CRISPR-Cas9,.....	98
	per <i>Laura Batlle-Morera</i>	
10.8.	L'edició genòmica en <i>Caenorhabditis elegans</i> ,	98
	per <i>Jeremy Vicencio</i>	
10.9.	La dinàmica natural dels genomes en evolució,	100
	per <i>Jaume Bertranpetit</i>	
10.10.	El germen de l'edició genètica,	101
	per <i>Francisco J. Martínez Mojica</i>	
10.11.	Organoides i edició genòmica en l'estudi de la diversitat fenotípica del càncer colorectal,	103
	per <i>Elena Sancho i Eduard Batlle</i>	
10.12.	Edició genòmica en la línia germinal,.....	106
	per <i>Anna Veiga</i>	
10.13.	Edició genètica per a la millora dels éssers humans? La fina línia grisa: edició genòmica per a la millora humana?,	107
	per <i>Gemma Marfany</i>	
10.14.	La teràpia genètica i la biologia sintètica: la vida com a <i>software</i> ,.....	109
	per <i>Lluís Pareras</i>	
10.15.	Aspectes ètics de l'edició genòmica,.....	111
	per <i>Josep Santaló</i>	
10.16.	L'edició genètica a l'arena pública: comunicació i percepció social,	114
	per <i>Gema Revuelta</i>	

ABREVIACIONS

3R	reemplaçar, reduir, refinar
ABE	<i>adenine base editor</i> (editor de la base adenina)
ACL	amaurosi congènita de Leber
BAL	bacteris de l'àcid làctic
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> (receptor d'antigen quimèric)
CAR-T	<i>chimeric antigen receptor T-cell</i> (receptor d'antigen quimèric de cèl·lules T)
CBE	<i>cytosine base editor</i> (editor de la base citosina)
CCR	càncer colorectal
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i> (repeticions palindròmiques curtes agrupades i regularment interespaïades)
CRISPRa	<i>CRISPR activation</i> (activació de CRISPR)
CRISPRi	<i>CRISPR interference</i> (interferència de CRISPR)
crRNA	<i>CRISPR RNA</i> (CRISPR RNA)
CVC	Califòrnia, Viena, Charpentier (una de les agrupacions de recerca que han patentat un mètode per a la CRISPR-Cas9)
dCas9	<i>dead Cas9</i> (Cas9 mort)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (àcid desoxiribonucleic)
DSB	<i>double-strand break</i> (tall de doble cadena)

EFSA	European Food Safety Authority (Autoritat Europea de Seguretat Alimentària)
EMA	European Medicines Agency (Agència Europea de Medicaments)
ESC	<i>embryonic stem cell</i> (cèl·lula mare embrionària)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura)
FBN1	fibril·lina 1
FDA	US Food and Drug Administration (Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units)
FIV	fecundació <i>in vitro</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (proteïna de fluorescència verda)
GGE	<i>germline genome editing</i> (edició genòmica en la línia germinal)
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> (reconegut/uda generalment com a segur/a)
gRNA	<i>guide RNA</i> (RNA guia)
HDR	<i>homology directed repair</i> (recombinació dirigida per homologia)
hESC	<i>human embryonic stem cell</i> (cèl·lula mare embrionària humana)
hPSC	<i>human pluripotent stem cell</i> (cèl·lula mare pluripotent humana)
HTS	<i>high-throughput screening</i> (cribratge d'alt rendiment)
IAEA	International Atomic Energy Agency (Agència Internacional de l'Energia Atòmica)
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i> (cèl·lula mare pluripotent induïda)
NERRI	<i>Neuro-enhancement; Responsible Research and Innovation</i> (Neuromillora: Recerca i Innovació Responsable)
NGG	nucleobase, guanina, guanina
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> (recombinació no homòloga)
NPBT	<i>new plant breeding techniques</i> (noves tècniques de millora genètica de plantes)
OMG	organisme modificat genèticament

PAM	<i>protospacer adjacent motif</i> (motiu adjacent al protoespaiador)
PDO	<i>patient-derived organoid</i> (organoide derivat de pacient)
PERV	<i>porcine endogenous retrovirus</i> (retrovirus endogen del porc)
PHA	polihidroxialcanoat
PLX	vemurafenib
PRRSV	<i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i> (virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (àcid ribonucleic)
SDN	<i>site-directed nuclease</i> (nucleasa dirigida)
sgRNA	<i>single guide ribonucleic acid</i> (àcid ribonucleic guia simple)
SSN	<i>site-specific nuclease</i> (nucleasa específica del lloc)
TALE	<i>transcription activator-like effector</i> (efector similar a un activador de transcripció)
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i> (nucleasa efectora similar a un activador de transcripció)
TE	<i>transposable element</i> (transposó)
tracrRNA	<i>trans-activating CRISPR RNA</i> (CRISPR RNA transactivador)
VIH	virus d'immunodeficiència humana
ZFN	<i>zinc-finger nuclease</i> (nucleasa de dits de zinc)

PREÀMBUL

Des dels inicis de la biologia molecular, les noves tècniques que aquesta ciència ha anat introduint han causat preocupació i debats ètics sobre les possibles alteracions que poguessin produir en el DNA humà. En són exemples els enzims de restricció que donaren pas a les tècniques d'enginyeria genètica en els anys setanta del segle passat, la producció d'animals i vegetals recombinants durant els anys vuitanta, les teràpies amb vectors virals en els noranta i, darrerament, les noves tècniques d'edició genòmica. Isaac Asimov, en el seu llibre *The beginning and the end* (1978), va escriure: «L'avanç de l'enginyeria genètica fa que sigui concebible que aviat comencem a dissenyar el nostre propi progrés evolutiu.» Fa gairebé quaranta anys, l'enorme perspectiva de l'edició de gens humans no era més que una utopia, però avui s'ha convertit en la tècnica més prometedora i controvertida de la biologia moderna.

L'edició genòmica ha obert perspectives impensables fa poc temps. Això ha estat possible gràcies al descobriment de Francisco Mojica, l'any 1993, del sistema CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, «repeticions palindròmiques curtes agrupades i regularment interespaiades») que els procariotes han desenvolupat com un eficaç sistema de defensa per lluitar contra virus invasors. Posteriorment, d'altres investigadors varen descriure els components del sistema CRISPR que permeteren posar a punt la metodologia per editar gens eucariotes i tota la revolució tecnològica que ha vingut després. L'ús del sistema CRISPR com a mètode d'edició genòmica, associat a la proteïna Cas9, es va descriure l'any 2012, i es va convertir en l'eina d'enginyeria genètica més versàtil creada en la història recent de la biologia molecular. Aquesta metodologia permet eliminar, activar, inactivar, fins i tot corregir qualsevol gen, cosa que dona lloc a diverses aplicacions tant en recerca bàsica com en agricultura, ramaderia i biomedicina. S'obre així la possibilitat de desenvolupar tractaments dirigits a malalties genètiques que actualment no tenen teràpies eficaces. Aquesta capacitat d'aquest sistema per

editar genomes de diferents espècies, amb una facilitat sense precedents, ha generat una gran discussió en la comunitat científica i un important debat ètic i moral en la societat sobre les seves possibles aplicacions i conseqüències.

El sistema CRISPR es pot adaptar per editar qualsevol seqüència de DNA. Aquesta revolució tecnològica ja és una realitat en molts laboratoris de biologia, i en les dues disciplines relacionades: biomedicina i biotecnologia. També comença a ser una realitat en aplicacions que afecten plantes, animals, fongs i bacteris, fonamentalment les destinades a alimentació per millorar la producció, la salut o l'adaptació al medi ambient. I aviat esperem que també ho serà als hospitals, per tractar les mutacions puntuals de gens que provoquen alguna de les deu mil malalties monogèniques congènites, una vegada aconseguim entendre i controlar com funcionen els sistemes de reparació del DNA, essencials per completar el procés d'edició.

L'any 2015 es va concedir el Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica a les investigadores Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna pels avenços científics que havien conduït al desenvolupament d'una tecnologia que permet modificar gens, amb gran precisió i senzillesa, en tota classe de cèl·lules, la qual cosa possibilita canvis que signifiquen una veritable edició del genoma. Malauradament, el jurat es va oblidar del treball original d'en Francisco Mojica. Posteriorment, s'han donat d'altres premis importants als investigadors que han liderat aquestes noves metodologies, aconseguint finalment, Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna, el premi Nobel de Química de l'any 2020 pel desenvolupament d'aquest mètode d'edició genòmica, basat en el sistema de defensa dels procariontes CRISPR.

En aquests moments, usant aquesta tècnica, s'estan fent assajos clínics per tractar una àmplia varietat de malalties. Tot i que existeix un important suport social per a les aplicacions terapèutiques, hi ha preocupació sobre les consideracions ètiques (morals) i de seguretat de la tècnica, sobretot en les aplicacions de CRISPR en l'edició del genoma de cèl·lules germinals. Cal destacar que aquestes discussions van començar durant la reunió de Napa Valley (2015) quan el grup líder de científics que treballaven amb CRISPR-Cas9 es varen reunir per examinar els aspectes legals i ètics d'aquesta metodologia. A partir d'aquesta reunió, hi ha hagut deliberacions més extenses a diferents països. L'objectiu d'aquestes reunions ha estat examinar quan, on i com aquesta tecnologia podria aplicar-se en humans.

Des de la Secció de Ciències Biològiques vàrem creure oportú revisar aquest tema durant el curs acadèmic 2019-2020 per tal de poder oferir recomanacions bàsiques que haurien de servir en les possibles aplicacions d'aquestes tècniques. Així, hem desenvolupat seminaris amb la presència dels investigadors que sobresurten en aquestes metodologies i hem tractat els temes més generals

sobre edició genòmica, l'edició en cèl·lules somàtiques i cèl·lules mare, l'edició genòmica en plantes, animals i humans, les aplicacions en teràpia humana, l'edició genòmica germinal i en embrions, i els aspectes ètics, econòmics i socials de l'edició genòmica.

Hi ha precedents contrastats de l'acceptació social de la modificació del DNA de cèl·lules somàtiques per tal d'aconseguir un benefici mèdic definit, amb una relació benefici/risc favorable. Com a exemples, podem trobar els trasplantaments d'òrgans sòlids d'altres individus o la substitució de cèl·lules de medul·la òssia de donants. També, les diferents variants metodològiques de la teràpia gènica per tractar trastorns greus. En aquests casos s'han desenvolupat polítiques reguladores per garantir que aquests procediments es duguin a terme d'acord amb valors ètics i socials, amb variacions específiques de cada país per adaptar-se als diferents aspectes culturals i religiosos. En canvi, no s'ha trobat el consens social necessari per a l'ús d'aquestes tècniques per modificar la línia germinal, un procés controvertit perquè crea un canvi permanent en el genoma que es pot transmetre durant generacions. Hi ha països que ho prohibeixen i d'altres que posen barreres a la utilització d'embrions en diferents períodes de desenvolupament. Per exemple, vint-i-nou països han signat i ratificat la Convenció d'Oviedo (<https://www.coe.int/en/web/bioethics/oviedo-convention>), que prohibeix específicament l'edició del genoma heretable. Els Instituts Nacionals de Salut (NIH) dels EUA varen decidir el 2015 que no finançarien l'ús de tecnologies d'edició de gens en embrions humans, defensant que alterar la línia germinal humana és un pas que no s'hauria de creuar. Tot i això, el primer informe sobre la modificació del DNA de dos embrions humans mitjançant la tècnica CRISPR-Cas9 de científics xinesos el 2015 va ser un toc d'atenció per a la comunitat científica que, poc després, varen promoure una cimera de l'Acadèmia Xinesa de Ciències, la Royal Society i les Acadèmies Nacionals de Ciències dels Estats Units, a més d'investigadors d'altres països. La reunió va culminar amb una declaració conjunta que incloïa la següent declaració: «Seria irresponsable procedir amb qualsevol ús clínic de l'edició de línies germinals fins que no hi hagi seguretat i eficàcia garantides.» La declaració també va posar de manifest la necessitat d'una normativa i supervisió adequada. Tot i això, l'any 2018, He Jiankui, científic xinès, va modificar el gen *CCR5*, necessari per a la invasió del VIH, en el genoma de dues nenes bessones que van néixer amb genomes editats. Aquesta conducta, penada amb multa i presó, es va considerar equivocada, prematura, innecessària i en gran mesura inútil.

Si volem avançar en qualsevol camp científic, necessitem nous mètodes, com deia Sydney Brenner, «el progrés, en ciència, depèn de les noves tècniques, els nous descobriments i les noves idees, probablement en aquest ordre». La presa de decisions morals i ètiques hauria d'evolucionar a mesura

que avança la ciència i considerem que seria raonable que les legislacions nacionals i supranacionals consideressin la regulació d'aquestes tècniques basada en l'evidència de les aplicacions CRISPR per a la millora de la salut i el progrés de les persones.

RAMON BARTRONS
JAUME BERTRANPETIT

SUMARI EXECUTIU

Les tècniques d'edició genòmica permeten modificar el genoma i, així, les característiques dels éssers vius amb una precisió que resultava impensable fa uns anys. Cada cop es descriuen més aplicacions innovadores d'aquestes tècniques en recerca biomèdica, alhora que s'utilitzen amb més freqüència per desenvolupar nous productes industrials i tractaments mèdics que no serien viables d'una altra manera. A més, l'impacte de les tècniques d'edició genòmica s'ha distribuït a través de tots els dominis de les ciències de la vida, des de bacteris a humans. Les aplicacions de l'enginyeria genòmica tenen tant potencial transformador que resulta necessari comentar els beneficis i riscos del seu ús i plantejar les implicacions socials i ètiques que se'n deriven.

En l'àmbit molecular, les tècniques d'edició genòmica més utilitzades consisteixen en nucleases (proteïnes amb funció enzimàtica) que reconeixen una seqüència genòmica concreta i la tallen en un punt específic, la qual cosa provoca el trencament de la doble cadena de DNA genòmic. En resposta al tall, els mecanismes de reparació de DNA propis de la cèl·lula s'activen per tornar a unir les cadenes i mantenir la integritat del genoma, però en fer-ho pot ser que introdueixin mutacions o, fins i tot, seqüències d'interès just en el punt de tall. Hi ha diverses nucleases dirigides (com les ZFN o les TALEN), però és la descripció del sistema CRISPR-Cas9 com a tècnica d'edició genòmica, l'any 2012, el que inicia el creixement exponencial de la popularitat d'aquestes tècniques. A diferència de les tècniques anteriors, el sistema CRISPR-Cas9 es pot utilitzar per editar gairebé qualsevol regió genòmica a baix cost i permet alterar un nombre elevat de regions genòmiques alhora.

Aquests avantatges tècnics han facilitat l'adopció del sistema CRISPR-Cas9 com una eina potent per a la investigació biomèdica. La possibilitat de programar CRISPR-Cas9 per alterar l'expressió de milers de gens s'ha aprofitat per identificar quins són els responsables de certs fenotips i malalties o, simplement, inactivar o modificar l'expressió d'un gen específic. Similarment,

l'aplicació de les tècniques d'edició genòmica en cèl·lules mare humanes (bé siguin embrionàries, pluripotents induïdes o en forma d'organoides) d'individus concrets ha donat lloc a models de malalties que s'utilitzen per descobrir nous fàrmacs i provar tractaments de medicina personalitzada. A més, l'edició en embrions ha millorat la comprensió del desenvolupament humà i de la plasticitat cel·lular, cosa que ha facilitat avenços en el camp de la medicina regenerativa.

Els usos de les tècniques d'edició genòmica no es limiten a la recerca, sinó que també tenen un alt valor en la millora de processos industrials desenvolupats per microorganismes. A través de l'activació o la repressió de diversos gens, les tècniques d'edició permeten alterar de manera significativa el metabolisme dels microorganismes. Per tant, es pot redirigir el flux de nutrients a fi d'obtenir un millor rendiment de productes o, fins i tot, produir nous metabòlits d'interès. Aquesta aproximació s'ha utilitzat en *Escherichia coli*, altres bacteris rellevants industrialment, fongs i microalgues per tal de produir compostos bioactius complexos, fitoquímics i biofuels, entre d'altres, incloent-hi medicaments d'alt interès.

L'impacte en el sector alimentari també és especialment rellevant, ja que les tècniques d'edició genòmica com CRISPR-Cas9 faciliten la concepció de plantes i animals modificats genèticament. En el cas de les plantes, les tècniques d'edició acceleren l'obtenció de varietats vegetals d'interès gràcies a la capacitat de dirigir les edicions, la qual cosa evita el procés més llarg i tediós de la mutagènesi aleatòria induïda i selecció de les varietats amb el fenotip d'interès. La majoria de les modificacions són per millorar la tolerància a estressos abiòtics (e. g., sequera) o biòtics (e. g., plagues d'insectes), el rendiment d'ús de nutrients o les propietats nutricionals de la planta. Tot i això, el cultiu de plantes modificades genèticament per a ús alimentari està limitat per les regulacions i la percepció que en té cada país. La regulació permissiva dels Estats Units, per exemple, contrasta amb l'europea, que és especialment estricta en l'ús de tècniques d'edició genòmica. Així mateix, Espanya destaca per l'alt nombre de cultius transgènics conreats en comparació amb els altres estats europeus, on l'adopció és pràcticament nul·la.

Pel que fa als animals, de moment alguns països han aprovat l'ús alimentari d'un salmó modificat per accelerar el seu creixement sense alterar la mida final, i és previsible que en els anys vinents es facin propostes que alterin les propietats nutricionals de diversos animals. Més enllà de l'ús alimentari, les tècniques d'edició genòmica s'utilitzen en organismes model en genètica (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, peix zebra i ratolí) per estudiar el desenvolupament i crear models de malalties. A més, hi ha algunes aplicacions en animals amb molt potencial i que plantegen debats ètics, com la millora dels xenotrasplantaments, la desextinció d'espècies i l'impuls genètic (necessari per a la disseminació de les noves variants), sense oblidar l'ús que se'n pot derivar per raons lúdiques o estètiques.

Un altre àmbit d'interès és utilitzar les tècniques d'edició genòmica per curar malalties, i és que, de fet, l'aplicació terapèutica d'aquestes tècniques en humans és una realitat imminent. Els primers assajos clínics són majoritàriament de teràpies *ex vivo*, en què s'editen cèl·lules fora del cos per produir un factor terapèutic i trasplantar-les al mateix pacient, o de teràpies *in vivo* de teixits de fàcil accés com la retina de l'ull. Així, s'està estudiant utilitzar aquestes tècniques per tractar malalties de la sang com l'anèmia falciforme i la β -talassèmia, per millorar els limfòcits T que eliminen cèl·lules canceroses i per tractar malalties genètiques que afecten els ulls (amaurosi de Leber), entre d'altres. Fins que no hi hagi una millora en els sistemes de lliurament dels enzims d'edició de DNA a les cèl·lules a editar, és previsible que la teràpia somàtica es limiti a aquests casos o bé en altres semblants.

L'edició de la línia germinal humana desperta molt interès perquè, a diferència de l'edició somàtica que es restringeix a poques cèl·lules, faria factible l'edició de la majoria, si no tots, dels teixits afectats per una malaltia. Si bé resulta interessant des del punt de vista terapèutic, això comporta que la línia germinal de l'individu transmeti les mutacions als descendents, cosa que multiplicaria els riscos de l'edició i comprometria l'ètica del que es considera acceptable actualment. Les limitacions tècniques actuals impedeixen un ús segur de l'edició d'embrions amb finalitats reproductives, motiu pel qual està prohibida o limitada arreu del món. Això no va impedir, però, que el novembre de 2018 s'anunciés el naixement a la Xina dels primers nadons modificats genèticament. La notícia va il·lustrar la complexitat de regular estrictament els usos de les tècniques d'edició genòmica i la necessitat de debatre obertament les conseqüències d'aquests experiments abans que es duiguin a terme. De manera similar, caldria començar a estudiar les implicacions socials que podria tenir la millora de les qualitats humanes amb les tècniques d'edició genòmica, ja que en alguns casos resulta complex delimitar què és teràpia i què és millora.

En definitiva, les aplicacions de les tècniques d'edició genòmica resulten tan innovadores com esperançadores, de manera que cal seguir atents als desenvolupaments que vinguin els anys vinents. Els avenços fins al moment sobrepassen les expectatives que podia haver-hi fa una dècada, i ja s'ha arribat a aplicacions amb fortes implicacions socials i ètiques. És previsible que aquesta tendència es mantingui en el futur i és possible que es plantegin qüestions que ara som incapaços de preveure. És primordial que, a l'espera dels canvis que vindran pròximament en aquest camp, no ens mantinguem de braços plegats sinó que cal prendre un paper actiu divulgant aquest coneixement per estimular un debat plural però informat. No és altre que aquest l'objectiu del cicle de conferències sobre edició genòmica organitzat entre 2019 i 2020 per la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans i que el present document pretén resumir i posar a disposició de la població general.

1. INTRODUCCIÓ

El genoma és el conjunt complet de DNA d'un organisme, incloent-hi tots els seus gens i els elements que el regulen. En humans, el genoma té més de 3.000 milions de parells de bases (3×10^9) de DNA i cada cèl·lula nucleada del cos en té dues còpies (excepte els gàmetes que en tenen una). La seqüència de bases de DNA de cada còpia del genoma emmagatzema tota la informació necessària per construir i mantenir un organisme. Això permet, per exemple, desenvolupar un organisme pluricel·lular complex a partir d'una única cèl·lula (el zigot) provinent de la unió de dos gàmetes, cada un amb una sola còpia del genoma.

El genoma és el responsable d'organitzar el comportament cel·lular, des de les reaccions metabòliques més simples fins a les vies de senyalització més complexes. En el cas dels animals i plantes, el genoma també orquestra la regulació de cada cèl·lula en el context d'un teixit i un òrgan, tot tenint en compte els estímuls exteriors. Per dur a terme aquestes funcions, diverses proteïnes interaccionen amb el DNA genòmic de manera específica a fi de regular l'expressió genètica o utilitzar la informació gènica per sintetitzar proteïnes. La seqüència de DNA determina en gran part el resultat d'aquestes interaccions i, en el cas dels gens codificants per proteïnes, la seqüència d'aquesta proteïna obtinguda al final. Per tant, la presència de mutacions, que són canvis en la seqüència de DNA, pot afectar el funcionament del genoma i, així, diverses característiques de l'organisme. Un exemple en són les diferències entre els trets físics dels humans, fruit d'un conjunt de petites variacions genètiques. Es calcula que els humans compartim un 99,9 % de la seqüència genòmica i que tan sols el 0,1 % restant determina les característiques individuals; aquest 0,1 % representa, però, tres milions de nucleòtids del conjunt del genoma.

Mentre que la majoria de mutacions no tenen pràcticament cap efecte en el funcionament de l'organisme, algunes poden ser lleugerament beneficioses i d'altres molt perjudicials. Per exemple, una sola mutació en el gen *DMD* pot

provocar el mal funcionament de la proteïna distrofina, i causaria així la distròfia muscular de Duchenne. Hi ha unes deu mil malalties produïdes per mutacions en un sol gen (monogèniques). Són la causa de malalties com l'albinisme, l'anèmia falciforme, la fibrosi quística, distròfies musculars o la malaltia de Huntington, entre d'altres. A més, hi ha condicions com la hipertensió, l'arterioesclerosi i l'esquizofrènia que són el resultat de variants en diversos gens (poligèniques) i la seva interacció amb factors externs; són els anomenats caràcters complexos, amb herència multifactorial.

Tot i que aquestes malalties solen conduir a associar el terme mutació a conseqüències negatives, és important entendre que la presència de mutacions aleatòries forma part de la dinàmica natural dels genomes. Els canvis en els genomes al llarg de les generacions són fonamentals per a la vida tal com la coneixem, ja que tota la diversitat d'espècies i característiques de cada una tenen el seu origen en les noves variants produïdes pels processos de mutació. Es calcula que cadascun de nosaltres és portador d'unes seixanta mutacions noves, trenta per part de cada progenitor. A més, una part significativa del genoma correspon a fragments de genomes d'altres organismes que s'hi han integrat i es transmeten al llarg de les generacions. Per tant, tots nosaltres som mutants i organismes transgènics, i portem una bona quantitat d'informació genòmica nova que podria arribar a determinar algunes de les nostres característiques biològiques.

Les tècniques d'edició genòmica són les eines que, per primera vegada, ens permeten alterar la informació genòmica dels organismes de manera precisa. La introducció deliberada de mutacions en regions genòmiques concretes permet estudiar la funció d'aquestes regions. La combinació d'aquest coneixement i les tècniques d'edició genòmica obren la porta a modificar les característiques dels organismes de manera accelerada i en la direcció que ens interressi. En aquest sol fet rau l'explicació de l'increment exponencial d'aplicacions de les tècniques d'edició genòmica arreu dels dominis de les ciències de la vida.

2. LES TECNOLOGIES D'EDICIÓ GENÒMICA

Els avenços recents en els mètodes d'edició de gens i genomes han tingut un gran impacte tant en recerca bàsica com aplicada. Fa més de seixanta anys que es coneix la importància del DNA per als éssers vius, però són els avenços en els mètodes d'edició de gens i genomes els que permeten modificar-lo i millorar la compressió de la informació que codifica. En aquesta secció es revisa el desenvolupament de les tècniques d'edició genòmica, començant per les primeres tècniques de modificació de DNA i acabant amb el sistema CRISPR-Cas9 i les seves variants.

2.1. PRECURSORS DE L'EDICIÓ GENÒMICA AMB CRISPR-Cas9

Les primeres tècniques desenvolupades per inserir nous elements genètics en posicions específiques del genoma es basaven en el mecanisme de recombinació homòloga que té lloc en algunes cèl·lules de manera natural. Per fer-ho, es flanqueja la seqüència de DNA d'interès amb la seqüència genòmica del lloc en què s'ha d'integrar i s'insereix a la cèl·lula. Aleshores, són els mecanismes de reparació del DNA propis de la cèl·lula els que poden utilitzar els extrems de la seqüència de DNA introduïda per realitzar la recombinació i integrar la seqüència d'interès al genoma. Tot i que aquesta tècnica s'ha utilitzat per crear múltiples soques de ratolins, l'eficiència és relativament baixa.¹

L'eficiència d'inserció de seqüències exògenes al genoma millora si es provoca un tall de doble cadena (DSB, de l'anglès *double-strand break*) just en el punt d'inserció. Com a resposta a aquest tall, es repara el DNA danyat per mantenir-ne la integritat mitjançant mecanismes cel·lulars de recombinació homòloga (HDR, de l'anglès *homology directed repair*) o recombinació no homòloga (NHEJ, de l'anglès *non-homologous end joining*).² En la recombinació homòloga, es repara el tall a partir d'una seqüència de nucleòtids homòloga als extrems trencats. Si la seqüència utilitzada com a model és la de la cromàtide germana, el tall es repara

i restaura la seqüència original. Ara bé, si s'ha introduït una seqüència exògena de DNA amb extrems homòlegs (com en la tècnica descrita anteriorment), els mecanismes de recombinació homòloga la poden utilitzar com a model. Així, el genoma incorporaria la seqüència exògena just a la regió especificada. Aquest mètode permet canviar regions genòmiques per una seqüència d'interès de manera precisa. En canvi, en la recombinació no homòloga, es repara el tall lligant els extrems adjacents al punt de tall sense utilitzar cap model amb homologia. Per tant, el resultat de reparació conté insercions petites o delecions de diverses mides. Les dues vies de reparació són útils per editar el genoma, però els resultats obtinguts difereixen (figura 1). Mentre que amb la recombinació homòloga es pot inserir una modificació específica, amb la recombinació no homòloga es generen insercions i delecions diverses. Tant l'una com l'altra poden comprometre el funcionament d'un element genètic, així que les dues vies de reparació són d'interès per a l'edició genòmica.

La possibilitat de provocar talls de doble cadena al DNA es va tornar factible a partir dels anys noranta del segle passat amb la identificació i caracterització de les meganucleases. Aquests enzims reconeixen una seqüència de DNA molt llarga, de fins a quaranta nucleòtids, com a punt de tall.³ La llargada del lloc

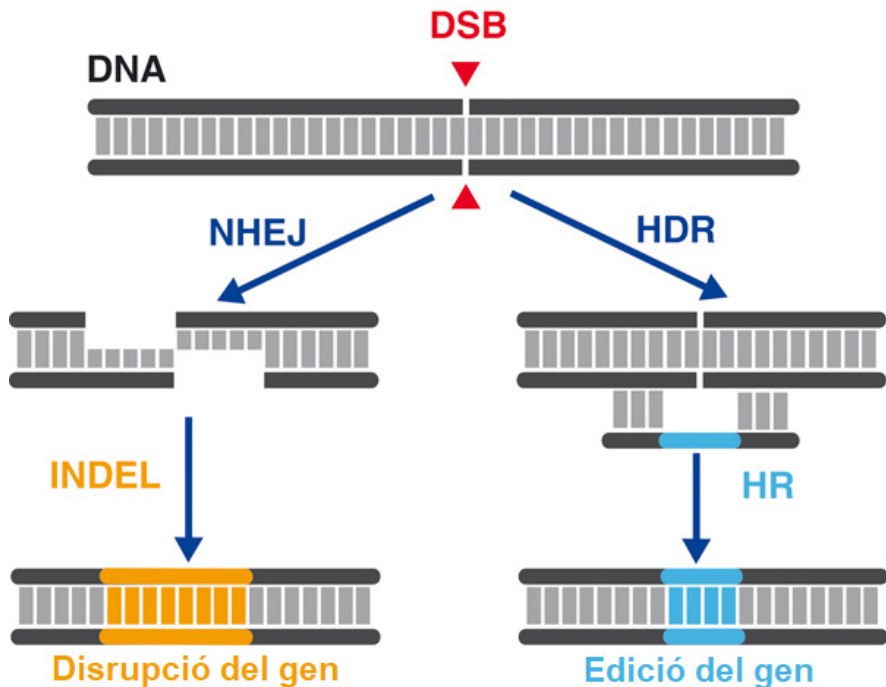


FIGURA 1. Mecanismes de reparació dels talls de doble cadena (DSB) al genoma. La reparació no homòloga (NHEJ) genera insercions i delecions (INDEL) que interrompen el gen, mentre que en la recombinació homòloga es canvia part del gen per una seqüència d'interès. Adaptada de Lluís Montoliu, 2019.⁴

de reconeixement fa que generalment tallin el genoma en un sol punt, fins i tot en genomes complexos com l'humà. La limitació en la utilització de les meganucleases com a mètode d'edició genòmica és identificar una meganucleasa que reconegui com a punt de tall la seqüència a editar d'interès. Tot i l'existència de centenars de meganucleases a la natura i mètodes que permeten modificar-ne l'estructura per canviar el seu punt de tall, el seu ús en edició genòmica no és gaire comú per la simplicitat dels mètodes alternatius.

Les nucleases dirigides solucionen les limitacions de les meganucleases perquè es poden dissenyar per tal que s'uneixin a una seqüència específica de DNA, la qual cosa permet introduir un punt de doble tall a qualsevol regió genòmica coneguda d'interès. Les nucleases dirigides inclouen les nucleases de dits de zinc (ZFN, de l'anglès *zinc-finger nuclease*), les nucleases d'activitat similar a activadors de transcripció (TALEN, de l'anglès *transcription activator-like effector nuclease*) (figura 2), i el sistema CRISPR-Cas9.

Les ZFN estan compostes per un domini d'unió al DNA, format per entre tres i sis dits de zinc, i un domini de tall de DNA, format pel domini de tall no específic de la nucleasa FokI.⁵ Cada dit de zinc reconeix tres nucleòtids de DNA i, per tant, combinant-los es pot dissenyar un punt d'unió de la ZFN únic en el genoma humà. Així, els dits de zinc determinen la unió de la ZFN a una seqüència específica de DNA, la qual cosa dirigeix la nucleasa FokI perquè introdueixi un tall en la doble cadena en un punt concret del genoma.

Les TALEN són semblants a les ZFN, ja que també combinen proteïnes que s'uneixen al DNA per dirigir la nucleasa FokI al punt de tall. En aquest cas, però, les proteïnes d'unió al DNA són els efectors similars a activadors de transcripció (TALE, de l'anglès *transcription activator-like effector*) en comptes dels dits de zinc.⁶ Els TALE reconeixen un sol nucleòtid de DNA, mentre que els dits de zinc en reconeixen tres. Per això, el disseny de les TALEN per introduir punts de doble tall en regions del genoma d'interès és més senzill que el de les ZFN.

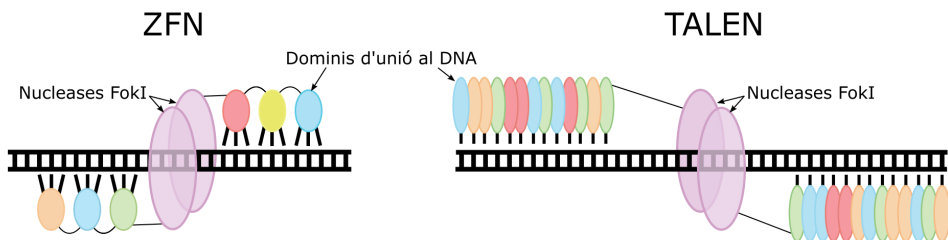


FIGURA 2. Les nucleases dirigides ZFN i TALEN. Tant les ZFN com les TALEN combinen diversos dominis d'unió al DNA per dirigir les nucleases FokI a una regió concreta del genoma i provocar un tall en la doble cadena. Mentre que en les ZFN els dominis d'unió són dits de zinc que reconeixen tres nucleòtids, en les TALEN els dominis d'unió són TALE que reconeixen un sol nucleòtid. Imatge adaptada de Beumer i Carroll, 2014.⁷

Les ZFN i les TALEN s'han utilitzat extensivament en recerca per generar models de malalties genètiques, tant en cèl·lules mare humanes com en organismes models,⁸ i en la modificació del genoma de plantes per desenvolupar variants amb propietats nutricionals millorades.⁹ Fins i tot, s'han utilitzat en diversos estudis clínics. Per exemple, s'han utilitzat per aconseguir la deleció del receptor *CCR5* en cèl·lules T CD4 que podria conferir resistència al VIH, l'administració d'una còpia correcta del factor IX per tractar pacients amb hemofília B, o per crear limfòcits T amb receptors d'antigen quimèrics (CAR, de l'anglès *chimeric antigen receptor*) per tractar la leucèmia limfoide aguda, entre d'altres.

Tot i això, des del primer ús descrit del sistema CRISPR per a l'edició genòmica l'any 2012,¹⁰⁻¹² el sistema CRISPR ha guanyat popularitat a un ritme molt més accelerat que la resta de nucleases dirigides. Mentre que les ZFN i TALEN es basen en la combinació de diverses proteïnes per reconèixer el DNA, el sistema CRISPR utilitza una molècula d'àcid ribonucleic (RNA). Com que és molt més senzill dissenyar un RNA que les proteïnes que guien les ZFN o TALEN a una regió concreta, el sistema CRISPR és més econòmic (un centenar d'euros) i ràpid (dies) d'aplicar que la resta de mètodes (milers d'euros i mesos). És precisament la senzillesa del sistema CRISPR, juntament amb la seva especificitat, eficiència i possibilitat de realitzar moltes edicions simultànies (multiplexar) el que ha facilitat i popularitzat l'ús de l'edició genòmica en recerca bàsica i en aplicacions com la biotecnologia, l'agricultura i la teràpia gènica.

2.2. EL SISTEMA CRISPR-Cas9

Originalment, el sistema CRISPR-Cas es va descobrir com un sistema procarionota d'immunitat adaptativa que confereix resistència a elements genètics forans com plasmidis i virus. Aquest descobriment va ser crític per reprogramar la tècnica CRISPR-Cas com a eina d'edició l'any 2012. Francisco J. M. Mojica va proposar el nom «CRISPR» per descriure una sèrie de repeticions palindròmiques curtes, agrupades i regularment espaiades (en anglès, *clustered regularly interspaced palindromic repeats*) que s'havien descrit el 1987 en bacteris i Mojica va identificar en arqueus el 1993,¹³ cosa que suggeria que la presència d'una estructura tan similar en microorganismes tan diferents podria indicar que CRISPR desenvolupava una funció important per als procarionotes. L'any 2000, Mojica havia identificat CRISPR en vint espècies de microbis, i dos anys després es descriuria la presència de gens associats a CRISPR (cas, de l'anglès *CRISPR-associated*), que es trobaven prop dels CRISPR i se sospitava que estiguessin relacionats amb la seva funció. Curiosament, el nom CRISPR apareix publicat per primera vegada en aquesta darrera obra

d'autors holandesos, que prèviament havien consultat amb Francisco Mojica el nom més adequat per a aquesta família de seqüències de DNA tan peculiar.¹⁴ La funció de CRISPR es va començar a intuir amb l'observació per part de Mojica que les seqüències de DNA que formen els espaiadors entre les repeticions CRISPR són idèntiques a fragments d'alguns plasmidis i genomes de virus. Aquesta, va portar-lo a suggerir que els loci CRISPR podrien codificar les instruccions d'un sistema d'immunitat adaptativa que protegia els microbis d'infeccions específiques.¹⁵

Durant els següents anys, el treball de múltiples autors¹⁶⁻¹⁸ va confirmar la funció de CRISPR com d'immunitat adaptativa que havia proposat Mojica. Breument, durant la infecció d'un element genètic com un virus o un plasmidi de conjugació, noves seqüències idèntiques a un fragment de l'element genètic invasor s'insereixen com a espaiadors entre les seqüències CRISPR del genoma de la cèl·lula compromesa (adquisició). Després, es transcriuen i processen petits fragments d'RNA CRISPR (crRNA, de l'anglès *CRISPR RNA*) derivats del conjunt CRISPR i que inclouen la seqüència espaiadora idèntica a un element genètic invasor (expressió). A continuació, aquests crRNA formen un complex amb les proteïnes Cas. Així, el complex ribonucleoproteic crRNA-Cas es dirigeix a una seqüència complementària en l'element genètic invasor i el talla per inactivar-lo (interferència). Per tant, les seqüències CRISPR contenen espaiadors que actuen com a memòria d'infeccions passades i que, com que es troben al genoma, es transmeten entre generacions. Mentre que les seqüències CRISPR tan sols emmagatzemen la informació, les proteïnes Cas són els efectors del sistema, que s'encarreguen tant d'emmagatzemar noves seqüències d'invasors com d'utilitzar la memòria per reconèixer i tallar àcids nucleics invasors (figura 3).

En aquest estadi, el sistema CRISPR ja es veia com un mecanisme interessant i sorprenent, però encara estava lluny d'assolir el nivell d'interès que té actualment com a tècnica d'edició genòmica. Per adaptar CRISPR com a tècnica d'edició genòmica van caler diversos estudis. Primer, es va veure que el sistema CRISPR de *Streptococcus thermophilus* tan sols utilitzava la proteïna enzimàtica Cas9 per reconèixer i tallar l'àcid nucleic complementari al crRNA.¹⁶ A més, el tall provocat és rom (sense un extrem sobresortint d'una de les cadenes del DNA), de doble cadena i sempre a la mateixa posició, a tres nucleòtids de la seqüència del motiu adjacent al protoespaiador PAM (PAM, de l'anglès *protospacer adjacent motif*). La seqüència PAM, que s'havia descrit prèviament, és un motiu que es troba al genoma a prop del punt de tall de les proteïnes Cas i que és essencial perquè aquestes es puguin unir al DNA i tallar-lo. Diferents proteïnes Cas reconeixen diferents PAM. Per exemple, la proteïna Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (la més utilitzada actualment) reconeix la PAM NGG, on N pot ser qualsevol nucleòtid.

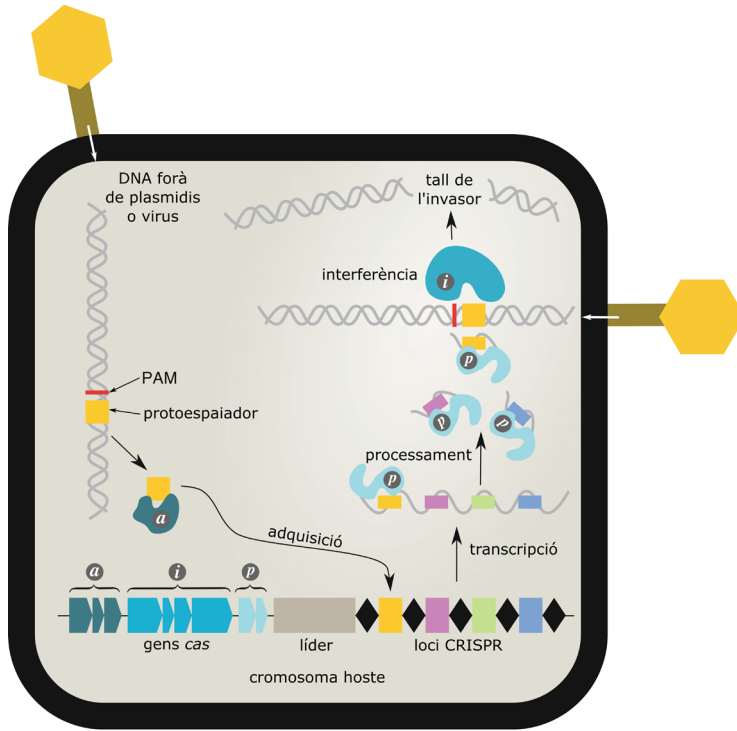


FIGURA 3. CRISPR com a sistema d'immunitat adaptativa. El sistema CRISPR-Cas està compost per diversos gens *cas* (fletxes blaves) que expressen proteïnes efectores involucrades en les fases d'adquisició (*a*), expressió (*p*) i interferència (*i*) del sistema. També està compost per les seqüències repetitives CRISPR (diamants negres) separades per espaiadors, la seqüència dels quals és idèntica a fragments d'elements invasors i s'ha incorporat en el procés d'adquisició. Els loci CRISPR estan precedits per un promotor (líder) que permet transcriure i processar els espaiadors i generar el crRNA. En el procés d'interferència, els complexos crRNA-Cas reconeixen i tallen seqüències dels elements genètics invasors complementàries al crRNA. Adaptada de Mojica i Garrett, 2013.¹⁴

A continuació, Emmanuelle Charpentier va identificar que Cas9 necessita tant el crRNA (que conté la seqüència complementària a l'element genètic a tallar) com un CRISPR RNA transactivador (tracrRNA, de l'anglès *trans-activating CRISPR RNA*) per tenir activitat de nucleasa (tallar el DNA). Així, amb tots els elements necessaris per a l'activitat nucleasa de Cas9 caracteritzats, l'equip format per Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna va demostrar que el sistema es podia utilitzar per tallar seqüències de DNA *in vitro*.¹⁰ A més, van simplificar el sistema a tan sols dos elements: la proteïna Cas9 i un RNA guia (sgRNA, de l'anglès *single guide RNA*) que és una fusió del crRNA amb el tracrRNA (figura 4). Uns mesos després, els equips de Feng Zhang i George Church van adaptar el sistema CRISPR-Cas9 per realitzar edicions genòmiques en cèl·lules de mamífer i humanes.^{11,12}

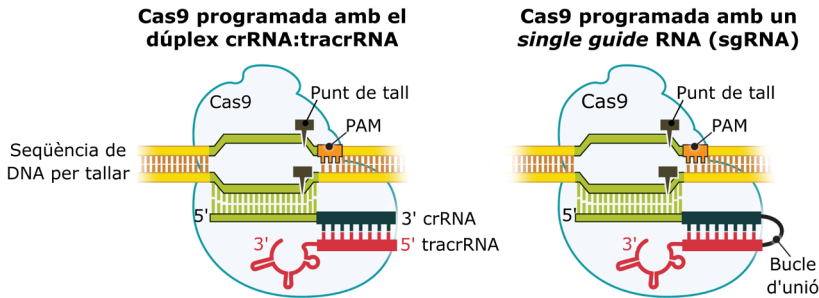


FIGURA 4. Reconeixement del DNA a tallar per l'enzim Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. La proteïna Cas9 s'uneix a una seqüència de DNA complementària a un RNA. L'RNA que determina el punt d'unió pot ser el dúplex crRNA:tracrRNA (esquerra) o una fusió entre els dos anomenada sgRNA (dreta). La seqüència PAM es troba a la seqüència a tallar i tres nucleòtids passat el punt de tall. Adaptada de Doudna i Charpentier, 2014.¹⁹

Els treballs de Charpentier, Doudna, Zhang i Church van ser essencials per convertir el sistema CRISPR-Cas9 en la primera tècnica d'edició genòmica programable amb una molècula d'RNA. A més, el seu mecanisme de funcionament és senzill: tan sols cal dissenyar un gRNA complementari al punt on es vol introduir al tall, sintetitzar-lo i introduir-lo a la cèl·lula a editar juntament amb la proteïna Cas9. Aquesta senzillesa, juntament amb la versatilitat i el baix cost, ha facilitat la ràpida adaptació de l'edició genòmica amb CRISPR-Cas9 a altres organismes i popularitzat el seu ús en recerca i desenvolupament tecnològic.

2.3. DARRERS AVENÇOS DERIVATS DEL CRISPR-Cas9

Des de l'aplicació del sistema CRISPR-Cas9 com a tècnica d'edició genòmica, la recerca bàsica sobre CRISPR està avançant ràpidament per crear nous sistemes d'edició genòmica derivats de CRISPR. Per una banda, s'ha utilitzat l'enginyeria de proteïnes per modificar la proteïna Cas9 per millorar l'eficiència d'edició o realitzar funcions que no requereixen tallar el DNA, com regular l'expressió gènica. Per l'altra banda, s'ha explorat les propietats dels sistemes CRISPR d'altres procarïotes que difereixen del sistema CRISPR-Cas9 de *S. pyogenes*, fet que ha expandit les possibilitats de l'edició genòmica a editar directament RNA, per exemple.

Molts avenços se centren a millorar l'especificitat i l'eficiència del tall de DNA de CRISPR-Cas9. Tot i que els vint nucleòtids del sgRNA permeten dirigir Cas9 a un punt concret del genoma, hi ha la possibilitat que CRISPR talli regions del genoma no desitjades (edicions *off-target*), sobretot si aquestes tenen una seqüència semblant al punt de tall desitjat. La freqüència d'edicions

no desitjades s'ha reduït a través d'eines computacionals que milloren l'elecció del disseny del gRNA per editar un gen. També s'han utilitzat eines d'optimització per obtenir variants de Cas9 amb més especificitat.^{20,21} Un altre repte en l'ús de Cas9 de *S. pyogenes* és el requeriment d'una PAM amb seqüència NGG adjacent al punt de tall, que limita les posicions genòmiques on es pot introduir un tall de doble cadena. Per això, s'ha creat variacions de Cas9 amb uns requisits més relaxats per a la seqüència PAM, com ara reconèixer tan sols la seqüència NG en comptes d'NGG amb el fi d'incrementar les regions genòmiques que es poden editar.

Una de les variants de Cas9 més utilitzada és la *dead Cas9* (dCas9), que no provoca un tall de doble cadena però manté l'especificitat que dirigeix dCas9 a una regió concreta del genoma. Els editors de bases (*base editors*) aprofiten aquesta propietat fusionant dCas9 a un enzim que modifica químicament els nucleòtids. Així, els editors de citosines (CBE, de l'anglès *cytosine base editor*) poden modificar citosines a timines en un punt concret del genoma,²² mentre que els editors d'adenines (ABE, de l'anglès *adenine base editors*) converteixen adenines en guanines sense tallar el genoma en cap moment.²³ D'una manera semblant, l'edició de qualitat (*prime editing*) fusiona una Cas9 que talla una sola cadena de DNA a una transcriptasa inversa per tal de copiar al genoma una seqüència especificada en el gRNA. Això permet modificar de manera precisa el lloc d'edició introduint-hi insercions, delecions o modificacions concretes. El desenvolupament dels editors de bases i de l'edició de qualitat permet controlar no només la regió a modificar, sinó que també permet controlar de manera precisa la mutació que s'hi introdueix.²⁴ Per això, aquestes tècniques tenen molt potencial com a teràpies genètiques, ja que podrien reparar gairebé el 90 % de les variants genètiques associades a malalties humanes.

La variant dCas9 també s'utilitza per regular l'expressió genètica. La unió de dCas9 per si sola a una regió de DNA reguladora impedeix que altres proteïnes (com activadors de transcripció) o l'RNA polimerasa s'hi uneixin. Així, es pot dirigir dCas9 a regions del genoma per investigar si estan implicades a regular l'expressió genètica o dirigir-la a regions reguladores ja conegudes per aconseguir la sobreexpressió o subexpressió d'un element genètic. Aquestes aproximacions es coneixen com a interferència CRISPR (CRISPRi) o activació CRISPR (CRISPRa), segons si l'activitat del gen s'activa o es reprimeix, respectivament. Fins i tot, es pot fusionar dCas9 amb activadors transcripcionals com el VP64 o repressors com el KRAB per potenciar-ne l'efecte.²⁵ La facilitat de CRISPR per multiplexar proves permet assajar els efectes del canvi en l'expressió de molts gens simultàniament, fet que ha permès avançar en la caracterització de la funció dels gens i en l'entesa dels mecanismes de regulació genètica.

A més de crear variants de la Cas9 de *S. pyogenes*, s'han estudiat i utilitzat sistemes CRISPR d'altres organismes procariotes amb propietats completament diferents. Els sistemes CRISPR-Cas es classifiquen en diferents tipus agrupats en dues classes, segons si l'activitat d'unió i tall del DNA la realitza un complex de diverses subunitats (classe 1) o una sola proteïna (classe 2). Per exemple, *S. pyogenes* té un sistema CRISPR-Cas de classe 1 perquè la proteïna Cas9 per si sola s'uneix i talla el DNA, mentre que *E. coli* té un sistema de classe 2 perquè l'activitat d'unió i tall la realitza un complex de proteïnes que rep el nom de Cascade. La majoria d'estudis utilitzen els enzims de classe 2, ja que l'expressió de múltiples subunitats requerides per la classe 1 pot resultar més complexa. Tot i això, s'han utilitzat alguns sistemes CRISPR-Cas de la classe 1 per editar cèl·lules humanes o plantes, i podrien tenir certs avantatges en determinades aplicacions.²⁶ L'estudi de sistemes CRISPR-Cas codificats en transposons ha demostrat que diverses subunitats de CRISPR-Cas de classe 1 es poden fusionar amb les integrases del transposó per dirigir amb un RNA guia la inserció de fragments llargs de DNA en regions específiques del genoma, que podria ser una eina important per a teràpia genètica.²⁷

La diversitat entre els sistemes CRISPR-Cas és gran fins i tot entre els sistemes de classe 2, que engloba els sistemes de tipus II, V i VI.²⁸ Per exemple, Cas9 de *S. pyogenes* és del tipus II i provoca talls en el mateix punt en cada una de les cadenes de DNA (talls roms), mentre que Cas12a del tipus V (abans coneguda com a Cpf1) talla el DNA en punts diferents en cada cadena. Encara resulta més sorprenent la proteïna Cas13 del tipus VI, que en comptes d'unir-se a molècules de DNA s'uneix a molècules d'RNA, i s'ha utilitzat tant per impedir la traducció de gens com per introduir modificacions directament a l'RNA.

En resum, el disseny de proteïnes de fusió amb dCas9 i la caracterització de sistemes CRISPR-Cas alternatius proporcionen noves eines de modificació genòmica amb propietats interessants tant per a recerca com per a aplicacions industrials i en teràpia genètica. Aquestes se sumen a la senzillesa i versatilitat del sistema CRISPR-Cas9, així que és d'esperar que en els anys vinents es pugui observar la utilització de sistemes derivats de CRISPR-Cas en àmbits molt diversos i per solucionar problemes que fins ara resultaven impossibles de resoldre.

3. L'EDICIÓ GENÒMICA EN RECERCA BIOMÈDICA

Les tecnologies d'edició genòmica són tant una eina de descobriment com una possible solució per a problemes fonamentals de les malalties genètiques humanes. La manipulació de gens i l'expressió genètica s'ha utilitzat en línies cel·lulars, teixits, gàmetes i embrions humans per entendre millor el seu funcionament, incloent-hi per què funcionen incorrectament en certes malalties. Per exemple, es poden crear models de malalties genètiques o recrear els canvis que apareixen durant el càncer per identificar la base molecular d'aquestes alteracions i provar fàrmacs per tractar-les. També es pot utilitzar l'edició genòmica per investigar el procés de diferenciació de les cèl·lules mare, la qual cosa milloraria el coneixement que tenim sobre medicina regenerativa i del desenvolupament embrionari humà. La utilització de les tècniques d'edició genòmica en cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC, de l'anglès *induced pluripotent stem cell*) o organoides ha permès un avenç sense precedents en la recerca biomèdica de malalties humanes.

3.1. CRISPR *SCREENS*

En els CRISPR *screens* (o assajos amb biblioteques de gRNA) s'utilitza CRISPR-Cas9 per modificar múltiples punts del genoma alhora. Això és possible gràcies a la versatilitat que té el gRNA per dirigir l'edició genòmica a qualsevol regió. Per fer-ho, es crea una biblioteca de gRNA en què cada gRNA dirigeix CRISPR-Cas9 a una regió d'interès diferent i s'introdueix a les cèl·lules a estudiar juntament amb l'enzim Cas9. El resultat és una població de cèl·lules editades en regions genòmiques diferents, que es pot utilitzar per determinar l'efecte de les edicions genòmiques. D'aquesta manera, es poden estudiar milers de gens per posar a prova diverses hipòtesis genètiques en paral·lel (figura 5).

La utilització de CRISPR *screens* ha permès accelerar la identificació d'elements genètics implicats en malalties. L'estudi de Shalem *et al.*, 2014²⁹ n'és un bon exemple. En aquest treball, s'utilitza una biblioteca de més de 60 000 gRNA per dirigir CRISPR-Cas9 a editar i causar la pèrdua de funció (*knock-out*) d'uns 18.000 gens humans. Com que cada cèl·lula ha incorporat un gRNA diferent, s'obté una població cel·lular que permet assajar l'efecte de la pèrdua de funció de cada un dels gens estudiats. A l'estudi s'utilitza la biblioteca per identificar gens la pèrdua de funció dels quals proporciona resistència a vemurafenib (PLX), un fàrmac que inhibeix la proteïna cinasa B-RAF utilitzat per tractar el melanoma. Per fer-ho, la biblioteca s'introdueix a una línia cel·lular de melanoma que es cultiva amb PLX per inhibir-ne el creixement. Després d'uns dies de cultiu, tan sols creixen aquelles cèl·lules amb un gRNA que ha causat la pèrdua de funció d'un gen que provoca resistència a PLX. Al final de l'experiment es compara per seqüenciació l'abundància dels gRNA entre les cèl·lules a l'inici del cultiu i al final. Els gRNA enriquits són els de les cèl·lules que han crescut i, per tant, les regions que editen aquests gRNA són les involucrades en la resistència al PLX. Així, es poden aclarir els mecanismes de resistència a PLX i millorar els tractaments de melanoma.

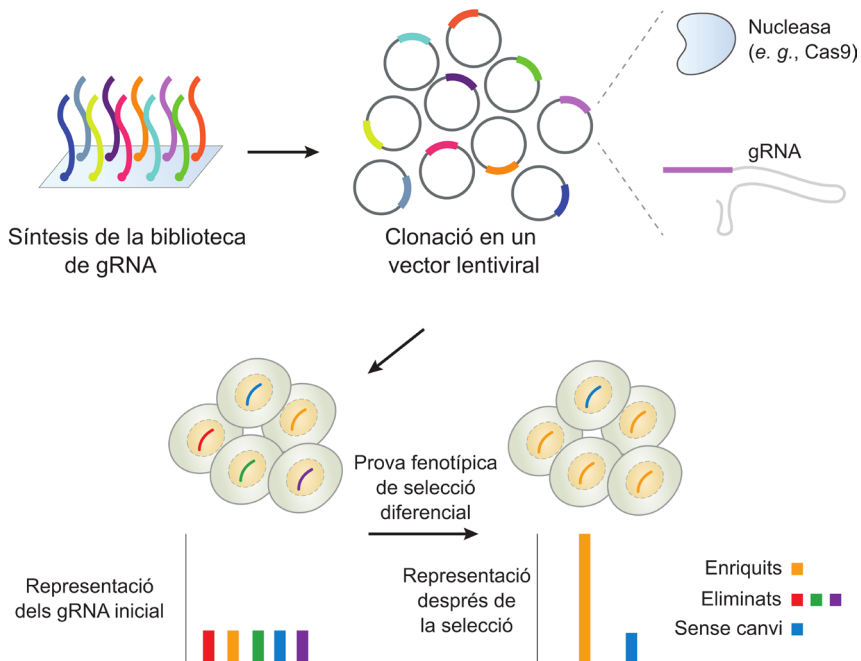


FIGURA 5. Esquema d'un assaig amb una biblioteca de gRNA (CRISPR *screen*). En un CRISPR *screen* es transfecten les cèl·lules amb una biblioteca de gRNA per editar moltes regions genòmiques diferents. S'utilitza una prova de selecció fenotípica per obtenir el conjunt de cèl·lules amb edicions d'interès. Finalment, es valora el canvi en l'abundància de cada gRNA per identificar els elements genètics associats al fenotip d'interès. Adaptada de Sanjana, 2017.³⁰

Encara que l'aplicació inicial dels CRISPR *screens* fos en assajos de pèrdua de funció, s'ha adaptat la tècnica per estudiar els efectes del canvi en l'expressió genètica (tant de sobreexpressió com de repressió) i la modificació d'amplificadors genètics (*enhancers*). També es pot adaptar per a estudis d'epigenètica a través de l'alteració de patrons de metilació del DNA i l'estat de la cromatina per la compactació d'histones.²⁵ Aquesta versatilitat i la facilitat d'assajar milers de condicions ha portat a utilitzar CRISPR *screens* tant en l'estudi del càncer com en malalties genètiques heretades o l'estudi de l'hoste enfront d'agents infecciosos.

Pel que fa al tractament del càncer, la medicina genòmica de precisió és una de les estratègies més prometedores atesa la importància de les variacions genòmiques provocades per la inestabilitat genòmica de les cèl·lules canceroses. Els CRISPR *screens* s'han utilitzat per identificar les variacions genòmiques responsables de la proliferació, bé siguin variants que mutin una proteïna o canviïn l'expressió genètica. Aquestes aproximacions permeten entendre el càncer en l'àmbit molecular i determinar els elements genètics que podrien ser l'objectiu de fàrmacs. Fins i tot, els CRISPR *screens* s'han utilitzat per estudiar la resistència als fàrmacs que desenvolupen algunes cèl·lules tumorals, tal com s'ha mostrat en l'exemple anterior, amb l'objectiu de combinar més d'un fàrmac per evitar la resistència.

En el context de les anomalies congènites de causa genètica, els CRISPR *screens* s'han utilitzat, per exemple, per identificar reguladors de l'expressió de diferents formes d'hemoglobina. Els trastorns de l'hemoglobina, com la β -talassèmia o l'anèmia falciforme, són relativament comuns. Aquests trastorns s'originen per defectes en la forma adulta de l'hemoglobina (hemoglobina A). Abans del naixement, el transportador d'oxigen principal no és l'hemoglobina A sinó l'hemoglobina fetal. S'ha demostrat que variacions naturals que provoquen l'expressió dels components de l'hemoglobina fetal en l'adult prevenen les conseqüències greus dels trastorns de l'hemoglobina A més comuns. Per això, s'ha utilitzat CRISPR *screens* per identificar elements reguladors que controlen l'expressió de diverses formes d'hemoglobina.³¹ Així, es podrien dissenyar fàrmacs per inhibir o activar gens reguladors o utilitzar l'edició genòmica directament per activar l'expressió de formes alternatives d'hemoglobina amb l'objectiu de pal·liar els efectes dels trastorns.

Respecte a l'estudi d'agents infecciosos com bacteris, paràsits i virus, els CRISPR *screens* s'han utilitzat principalment en l'hoste per identificar els factors que el fan vulnerable o resistent a la infecció. En són un bon exemple diversos estudis que han identificat gens involucrats en la degradació de proteïnes essencials per a la infecció i replicació de flavivirus com el virus del Dengue.³² La caracterització de factors de resistència o sensibilitat a la infecció de l'hoste ofereix noves opcions per al desenvolupament de teràpies

antimicrobianes i antivirals. Tanmateix, en alguns casos s'ha utilitzat CRISPR *screens* estudiant directament els patògens enfront de l'actuació de nous antibiòtics.³³

En resum, l'ús de CRISPR *screens* en recerca biomèdica ha millorat l'entesa de la base genètica de les malalties i la identificació de noves dianes moleculars per al seu tractament. La possibilitat d'estudiar milers d'edicions en una sola prova analítica aporta informació útil que facilita l'ús de la medicina personalitzada en el tractament del càncer. A més, les variants de CRISPR-Cas9 permeten estudiar els efectes de l'expressió genètica i els seus mecanismes de regulació, i han proporcionat coneixement sobre el gran nombre de variants associades a malalties que es troben fora de regions genòmiques que codifiquen per un gen.

3.2. EDICIÓ GENÒMICA EN CÈL·LULES MARE HUMANES

Les cèl·lules mare pluripotents humanes (hPSC, de l'anglès *human pluripotent stem cell*) s'utilitzen àmpliament en recerca biomèdica perquè es poden cultivar *in vitro* i es divideixen indefinidament; a més, es poden diferenciar en qualsevol tipus cel·lular del cos humà. Segons el seu origen, es poden classificar entre cèl·lules mare embrionàries (ESC, de l'anglès *embryonic stem cell*) i cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC, de l'anglès *induced pluripotent stem cell*). Les primeres s'obtenen de blastocists humans, mentre que les darreres es reprogramen a partir de cèl·lules somàtiques adultes a través de factors de transcripció específics i molècules químiques petites, amb la qual cosa s'evita l'ús d'embrions humans. Les hPSC es poden cultivar *in vitro* i diferenciar per formar cèl·lules neuronals, musculars o de la pell, entre d'altres. Els coneixements adquirits amb aquestes cèl·lules i el potencial del seu ús formen la base del camp de la medicina regenerativa, que té per objectiu reemplaçar les cèl·lules danyades de teixits humans o generar nous teixits per recuperar-se després d'una malaltia o ferida. A més, les hPSC tenen certs avantatges respecte als models animals que les fan molt útils en recerca.

Els mètodes d'edició genòmica permeten generar un gran ventall de modificacions genètiques en les ESC i iPSC humanes. L'eficiència de recombinació de les ESC humanes és més baixa que la de ratolí, així que les tècniques tradicionals basades en recombinació homòloga que s'utilitzen en ratolins no són eficaces per a ESC humanes. Per això, el desenvolupament de nucleases dirigides com les ZFN, TALEN o CRISPR-Cas9 ha estat essencial per poder editar els genomes d'hPSC. En aquest context, aquestes tècniques s'han utilitzat per crear models de malalties, descobrir nous fàrmacs, individualitzar tractaments i estudiar el desenvolupament humà.

3.2.1. Models de malalties

Tot i els avenços en el desenvolupament d'animals model (com el ratolí o el peix zebra) per recrear malalties humanes, els models animals no poden recapitular del tot la patologia d'algunes malalties humanes. En aquests casos, l'ús de línies cel·lulars extretes de pacients com a models de malaltia resulta molt útil. Les iPSC resulten especialment útils perquè es poden diferenciar en tipus cel·lulars que són difícils d'obtenir dels pacients directament, com les neurones. Així, s'han utilitzat per modelitzar malalties humanes i poder entendre el mecanisme responsable de la patogènia.³⁴

Abans de les tècniques d'edició genòmica, els models de malaltia comparaven cèl·lules derivades d'iPSC de pacients malalts i donants sans. Com que les cèl·lules procedien de dues persones diferents, les diferències fenotípiques i genotípiques observades no es podien atribuir totalment a la malaltia perquè hi ha factors de confusió, com la variabilitat genètica entre individus, l'edat i el sexe. Les tècniques d'edició genòmica solucionen el problema en permetre la creació de cèl·lules que tan sols difereixen en les mutacions causants de la malaltia estudiada, conegudes com a controls isogènics (amb el mateix origen genètic). Es fa tant a partir de la introducció de la mutació causant de la malaltia en cèl·lules de donant sa com corregint la mutació en cèl·lules de pacients.³⁵ Per exemple, la correcció de la mutació G2019S del gen *LRRK2* en cèl·lules mare neurals diferenciades a partir d'iPSC d'un pacient amb Parkinson evita l'aparició de les aberracions nuclears que caracteritzen el Parkinson. Així mateix, la introducció de la mateixa mutació en hESC (ESC humanes) d'un donant sa indueix el mateix fenotip que el de les cèl·lules del pacient amb Parkinson, cosa que confirma que la mutació G2019S és necessària i suficient per causar el fenotip de la malaltia de Parkinson.³⁶ Controls isogènics com aquest s'han aplicat per crear models d'un ampli rang de malalties, incloent la distròfia muscular de Duchenne, la malaltia de Tangier o la síndrome de Rett, i crear variants al·lèliques de *CCR5* resistents al virus de la immunodeficiència humana (VIH).³⁷ Fins i tot, la possibilitat de modificar més d'un al·lel amb CRISPR-Cas9 ha permès crear models de malalties poligèniques.³⁸

Un inconvenient dels models de malalties basats en cultius d'hPSC respecte als models animals és que els primers no poden reproduir les condicions fisiològiques d'un individu. Per solucionar-ho, s'han desenvolupat sistemes de cocultiu de diversos tipus cel·lulars en tres dimensions com els organoides i els òrgans en un xip.³⁹ Els organoides són estructures tridimensionals formades per diversos tipus cel·lulars i que mantenen l'organització i funció relativament semblant a la d'un òrgan del cos humà i, per tant, s'utilitzen com a models de teixits humans en un entorn controlat i modificable, com són els cultius cel·lulars o els models *in vitro*. Igual que amb les cèl·lules hPSC,

les tècniques d'edició genòmica s'han utilitzat en organoides per crear models o corregir mutacions de malalties com la fibrosi quística, la poliquistosi renal i diversos tipus de càncer.^{40,41} Una alternativa als organoides que guanya pes progressivament és la incorporació de cèl·lules derivades d'hPSC a animals per construir models animals humanitzats, tal com trasplantar hepatòcits derivats d'hPSC a un fetge danyat de ratolí i observar els efectes de la variació genètica humana en el context de les condicions fisiològiques del ratolí.⁴²

3.2.2. *Descoberta de fàrmacs*

A més d'estudiar els mecanismes responsables de la patogènesi, els models de malaltia basats en hPSC es poden utilitzar per descobrir nous fàrmacs amb acció terapèutica. La identificació de fàrmacs es pot fer seguint dues estratègies: provant un fàrmac candidat o utilitzant un cribratge d'alt rendiment (HTS, de l'anglès *high-throughput screening*). En el primer, es prova un petit grup de molècules definides comparant la seva acció en un model de malaltia i un control isogènica. En canvi, en un HTS es prova un elevat nombre de compostos amb petites variacions i es valoren els efectes fenotípics de manera automàtica utilitzant robots. En qualsevol dels dos casos, els candidats seleccionats en el primer assaig *in vitro* passaran a assajos de validació secundària per caracteritzar les seves propietats de seguretat i farmacocinètica (absorció, distribució, metabolisme i eliminació dels fàrmacs dins l'organisme). L'ús dels models de malaltia humana basats en hPSC millora l'eficiència i precisió del procés de descobriment de fàrmacs, ja que ofereixen una representació *in vitro* molt directa de les condicions patogèniques, redueixen el nombre de candidats a provar en les fases següents i acceleren el procés de cribratge. A més, quan s'automatitzin les tècniques de cultiu i el procés de cribratge d'alt rendiment, es podran desenvolupar models a partir d'iPSC derivades d'un pacient en concret i utilitzar-los per provar l'efecte de fàrmacs en el genotip concret de l'individu donador, la qual cosa possibilita el pas del potencial de la medicina personalitzada a la pràctica clínica.⁴³

Els models basats en hPSC també es poden utilitzar per valorar la toxicitat d'un fàrmac i descartar-lo en cas que no sigui segur. En aquest cas, les hPSC no actuen com a models de malaltia sinó com a models d'un teixit per comprovar que el fàrmac no hi té cap efecte advers. Així, es poden preveure fets com la retirada de fàrmacs en ús o en estudi causada per efectes adversos severos relacionats amb la toxicitat a certs teixits, tal com ha ocorregut en alguna ocasió.⁴⁴ Per exemple, s'ha vist que es poden utilitzar cardiomiòcits derivats d'ESC per provar la citotoxicitat de fàrmacs i obtenir resultats semblants als dels estudis de toxicitat en animals en la fase preclínica.⁴⁵ Per això, aquests models són vàlids per assajar la citotoxicitat en un estadi inicial del desenvolupament de fàrmacs i poder descartar tots aquells fàrmacs tòxics abans de passar a proves en animals.

3.2.3. Estudi del desenvolupament humà

Tot i la seva importància biològica i clínica, els mecanismes moleculars que regulen les primeres decisions de diferenciació cel·lular no es coneixen amb detall. Les tècniques d'edició genòmica es poden utilitzar per modificar gens en l'estadi de zigot, i observar l'efecte d'aquestes mutacions directament en embrions modificats genèticament. Per exemple, un estudi de l'any 2017 descriu la microinjecció en zigots humans de la proteïna Cas9 complexada amb un gRNA que dirigeix el trencament del gen que codifica per OCT4, un factor de transcripció involucrat a mantenir la pluripotència. Els resultats indiquen que la pèrdua del factor OCT4 en embrions humans impedeix el correcte desenvolupament del blastocist. L'estudi també identifica diferències entre la funció del factor OCT4 en els primers estadis de desenvolupament entre embrions humans i de ratolí, en què subratlla la importància de realitzar proves en embrions humans que difereixen dels de ratolí en alguns aspectes.⁴⁶ Recentment (2019), la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida ha autoritzat els investigadors Anna Veiga, Montse Boada i Àngel Raya a poder estudiar les fases inicials del desenvolupament humà en embrions humans durant catorze dies, previs a la implantació a l'úter.

Cal destacar que els estudis del desenvolupament humà realitzats en embrions no involucren la seva implantació ni el naixement, així que cap dels canvis realitzats en la línia germinal seria heretable. A més, els zigots utilitzats són embrions sobrants de la fecundació *in vitro* de parelles que han decidit no implantar-los i han donat el seu consentiment informat per al seu ús en recerca. El desenvolupament dels embrions de l'estudi anterior es va aturar al límit màxim legal de set dies, tot i que en alguns països com Espanya es permet el desenvolupament fins als catorze dies després de la fecundació. Encara que els estudis s'aturin abans del moment en què hi hauria la implantació, l'experimentació amb embrions humans modificats genèticament aporta el coneixement necessari per entendre els primers passos de desenvolupament i les seves diferències amb els de la resta d'animals.⁴⁷ El coneixement obtingut en aquests estudis podria ser útil per millorar els processos de fecundació *in vitro*, desenvolupar nous mètodes anticonceptius i entendre millor la plasticitat cel·lular per avançar en el camp de la medicina regenerativa. A més, la millora de les tècniques utilitzades per modificar genèticament embrions humans es podria utilitzar algun dia per tractar malalties genètiques abans del naixement. La recerca bàsica en aquest àmbit aporta informació essencial sobre la factibilitat de fer canvis heretables en el genoma, com ara la importància dels errors d'edició *off-target* i del mosaïcisme, que es discuteixen més endavant.

4. L'EDICIÓ DE GENOMES MICROBIANS

Els microorganismes procariotes han estat utilitzant el sistema CRISPR-Cas des de ben abans que se'n popularitzés l'ús per als humans. D'una manera natural, el sistema CRISPR-Cas actua com a sistema d'immunitat adaptativa, protegint bacteris i arqueus d'elements genètics forans com plasmidis i virus. En canvi, des de la seva reformulació com a tècnica d'edició genòmica el 2012, els humans l'hem utilitzat per provocar canvis precisos als genomes. Com a tècnica d'edició genòmica, el seu ús no es limita a procariotes, ja que s'ha utilitzat també en eucariotes microbians com fongs i microalgues i organismes complexos com plantes i animals. En aquesta secció es comenten les aplicacions de les tècniques d'edició genòmica en bacteris, arqueus, fongs i microalgues.

En aquest conjunt de microbis, el sistema CRISPR-Cas9 és la tècnica d'edició més utilitzada per la seva capacitat de modificar més d'una regió genòmica alhora. Això permet alterar de manera significativa el metabolisme d'un microorganisme —pràctica coneguda com a enginyeria metabòlica— per tal que produeixi nous metabòlits d'interès industrial o obtingui un major rendiment de producte per quantitat de substrat (figura 6). A més, les tècniques derivades de CRISPR-Cas9 com l'edició de bases o el *prime editing* permeten canviar el genoma de manera precisa per millorar les propietats dels enzims del mateix microorganisme.

4.1. APLICACIONS DE L'EDICIÓ GENÒMICA EN PROCARIOTES

Els bacteris poden utilitzar matèries primeres simples i econòmiques, com biomassa renovable o residus d'altres processos, per sintetitzar productes químics de valor afegit. Per això, s'utilitzen en l'àmbit industrial com a fàbriques cel·lulars i, sovint, se'n milloren les propietats a través de l'edició genòmica. En concret, el sistema CRISPR-Cas facilita l'edició de desenes de regions

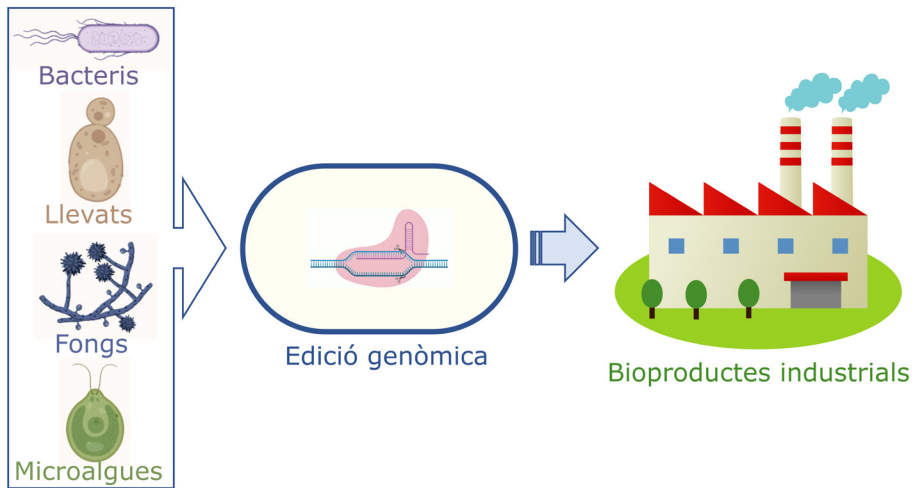


FIGURA 6. Edició genòmica de microbis per a la producció de compostos biològics d'interès industrial. El metabolisme de bacteris, llevats, fongs i microalgues es pot ajustar utilitzant les tècniques d'edició genòmica (en aquest cas es representa CRISPR-Cas9) per millorar la seva aplicació industrial. Adaptada d'Abdelaal i Yazdani, 2020.⁴⁸

genòmiques, fet que s'ha aprofitat per crear centenars de soques bacterianes amb propietats metabòliques úniques i assajar-les per identificar les que milloren el rendiment d'obtenció de productes. La variant CRISPRi, que s'empra per reprimir l'expressió de gens específics, permet disminuir l'activitat de les vies metabòliques que no són prioritàries i redirigir el flux de nutrients cap a la via metabòlica d'interès per produir més quantitat de producte. Aquestes estratègies d'enginyeria metabòlica s'han aplicat en *E. coli* per millorar el rendiment de producció de biofuels com l'isopropanol, fitoquímics com el carotè i polihidroxialcanoats (PHA) que es podrien utilitzar com a plàstics renovables i biodegradables.⁴⁹

El sistema CRISPR-Cas també facilita l'edició genòmica en organismes d'interès industrial que no són tan coneguts com ho és *E. coli*. N'és un exemple l'edició de clostridis (*Clostridium*), un gènere difícil de modificar genèticament que requereix tècniques d'edició eficients com CRISPR-Cas9. Les modificacions genètiques en clostridis han millorat la producció de biofuels, com el butanol a partir de fonts de carboni renovables. Els estreptomices (*Streptomyces*) s'utilitzen per produir metabòlits secundaris amb activitat biològica com antibiòtics o herbicides, i l'ús de CRISPR-Cas9 ha permès activar vies metabòliques que es trobaven silenciades, i ha generat així nous metabòlits secundaris que podrien tenir funcions biològiques interessants. L'espècie *Bacillus subtilis* s'utilitza industrialment per produir proteïnes recombinants i, a més, està designada per l'FDA (US Food and Drug Administration) com a «generalment reconeguda com a segura» (GRAS, de

l'anglès *generally recognized as safe*). Mitjançant CRISPR-Cas s'ha aconseguit produir compostos biològics d'interès mèdic en *B. subtilis*, com àcid hialurònic i l'N-acetilglucosamina. Així mateix, el sistema CRISPR-Cas ha millorat les propietats d'altres bacteris d'interès industrial com els cianobacteris, els bacteris de l'àcid làctic (BAL) i les espècies dels gèneres *Corynebacterium* i *Pseudomonas*.⁵⁰

L'edició genòmica en bacteris també es podria utilitzar com a tractament de les infeccions bacterianes. Les tècniques d'edició genòmica són tan específiques que permeten editar i eliminar una soca bacteriana particular d'un consorci bacterià mixt. Aquesta precisió ofereix l'avantatge d'afectar tan sols la població patogènica, mentre la comensal roman intacte. Per exemple, s'ha aconseguit utilitzar CRISPR-Cas9 per tallar un gen de virulència de *Staphylococcus aureus*, que anul·la la funció virulenta i atura la colonització d'aquest patogen. També s'ha utilitzat CRISPR-Cas9 per eliminar els gens de resistència als antimicrobians que es troben en plasmidis dins *S. aureus* o *E. coli*.⁵¹ Així es podrien tractar infeccions resistents als antibiòtics i s'aconseguiria que els patògens es tornin sensibles als antibiòtics de nou. Per introduir el sistema CRISPR-Cas9 als bacteris patògens se solen utilitzar bacteriòfags. A mesura que avancin les investigacions per millorar l'especificitat i la capacitat d'emmagatzematge dels bacteriòfags, és d'esperar que les tècniques d'edició genòmica es comencin a utilitzar clínicament per tractar infeccions bacterianes.⁵²

Els arqueus sovint són difícils d'estudiar amb les tècniques d'edició genòmica tradicionals, així que el sistema CRISPR-Cas resulta molt prometedor. Com que un 85 % dels genomes d'arqueus conté sistemes CRISPR-Cas i alguns arqueus viuen en ambients extrems on no es podria utilitzar el sistema CRISPR-Cas9 més comú, en aquests casos se sol reprogramar el sistema CRISPR-Cas dels mateixos arqueus com a tècnica d'edició. L'edició genòmica en algunes espècies d'arqueus ha donat lloc a patrons de reparació homòloga i no homòloga ben diferents dels dels bacteris o eucariotes. Com que en certs casos la reparació homòloga és el resultat desitjat de l'edició, es planteja utilitzar algunes de les proteïnes d'arqueus involucrades en els mecanismes de reparació del DNA en un altre organisme per intentar afavorir la reparació homòloga tal com passa en els arqueus.⁵³ Una altra aplicació de les tècniques d'edició genòmica és l'ús de CRISPRi per silenciar diversos gens dels arqueus. Així, s'ha caracteritzat els gens implicats en una via de fixació de nitrogen d'una espècie d'arqueus.⁵⁴ a simple and efficient CRISPR interference (CRISPRi) Similarment, aquesta tècnica es podria aplicar per estudiar les propietats característiques dels arqueus extremòfils i descobrir proteïnes amb propietats úniques.

4.2. APLICACIONS DE L'EDICIÓ GENÒMICA EN FONGS I MICROALGUES

Tant els fongs com les microalgues són microorganismes rellevants per a diversos processos industrials. Els fongs (*Fungi*) se subdivideixen en llevats i fongs filamentosos, que inclouen floridures i bolets. Dins els llevats, *Saccharomyces cerevisiae* destaca pel seu ús en la indústria alimentària i com a organisme model en recerca. Tot i que el mecanisme de recombinació homòloga de *S. cerevisiae* és tan eficaç que permet modificar el genoma sense haver d'utilitzar les tècniques d'edició modernes, l'ús de CRISPR-Cas ha permès millorar la precisió de les edicions i realitzar un elevat nombre de modificacions alhora. Per exemple, s'ha emprat CRISPR-Cas9 per crear un mutant de *S. cerevisiae* resistent a les altes temperatures i als inhibidors de la fermentació que seria molt adequat per a les indústries de begudes alcohòliques com la cervesa i les de fermentació d'àcids orgànics o glucosa.⁵⁵

Així mateix, les tècniques d'edició genòmica faciliten l'edició en altres espècies de fongs que no tenen un mecanisme de recombinació homòloga tan eficaç com *S. cerevisiae*. Aquest és el cas dels fongs filamentosos, que constitueixen una font important de compostos farmacèutics actius que inclou els antibacterians més utilitzats (penicil·lina i cefalosporina), alguns antifúngics i les estatines utilitzades per abaixar els nivells de colesterol en sang. Les tècniques d'edició genòmica fan factible modificar el metabolisme dels fongs filamentosos d'interès industrial per millorar la síntesi d'aquests compostos bioactius complexos.⁴⁹ A més, permeten estudiar els mecanismes bioquímics responsables de la patogènesi d'alguns fongs que infecten plantes, amb la qual cosa faciliten així el desenvolupament de nous compostos antifúngics.

Les microalgues s'utilitzen per a la producció industrial de diversos productes naturals com carotenoides, àcids grassos i pectines. Tot i això, l'aplicació més prometedora és la d'utilitzar la biomassa de les microalgues per produir biodièlsels. A diferència de l'ús de plantes com a font de biomassa, les microalgues tenen més eficiència fotosintètica, creixen més de pressa, toleren millor els estressos biòtics i abiòtics i, molt important, el seu cultiu no interfereix en la producció d'aliment. En condicions de cultiu normals, les microalgues acumulen tant reserves de carbohidrats com de lípids. Per a la producció de biofuels, es cultiven en condicions d'estrès per incrementar la quantitat de lípids acumulats (que constitueixen el biofuel) i disminuir la de carbohidrats, però això provoca que disminueixin la velocitat de creixement i la productivitat. Idealment, caldria una soca que incrementés la composició de lípids de les microalgues sense comprometre'n el creixement. Per això, les tècniques d'edició genòmica s'han utilitzat per millorar les propietats de les soques de microalgues, redirigint el flux de nutrients cap a la producció de lípids sense afectar el seu creixement.^{49,56}

5. L'EDICIÓ DE GENOMES DE PLANTES I ELS OMG

Les tècniques d'edició genòmica acceleren la creació de noves varietats vegetals. A diferència de les tècniques clàssiques basades en la hibridació o mutagènesi induïda, l'edició genòmica permet la introducció de modificacions específiques per aconseguir millorar una característica d'interès. Les noves varietats vegetals poden resistir més bé els estressos abiòtics com la sequera i biòtics com les infeccions, així com oferir un creixement més ràpid o amb més rendiment. L'ús d'organismes modificats genèticament (OMG) en alimentació és un tema polèmic i regulat de manera diferent arreu del món. Tot i això, cal destacar que l'ús de plantes modificades no només es redueix a l'alimentació sinó que també és important en la producció de biofuels i altres productes d'interès industrial o en jardineria.

Per entendre l'impacte de les tècniques d'edició genòmica en la modificació de plantes, en aquesta secció es repassa l'evolució de la creació de variants vegetals al llarg de la història, els usos que tindrien les tècniques d'edició genòmica i els reptes ecològics, ètics i legals que comporten.

5.1. PERSPECTIVA HISTÒRICA

Els humans han estat manipulant el genoma de les plantes i domesticant-les durant, com a mínim, els darrers deu mil anys.⁵⁷ La domesticació de plantes inicial consistia a seleccionar plantes individuals que mostressin característiques d'interès. Aquests trets d'interès incloïen millor gust o morfologia de les llavors o fruits, menor toxicitat de les parts comestibles, i més retenció de les llavors a les plantes per facilitar la seva collita. A través del procés de selecció artificial, les variants genètiques responsables dels trets d'interès es van tornar presents a la població de cultiu domesticat de manera uniforme.

Un bon exemple n'és la domesticació del blat de moro que es va iniciar entre sis mil i deu mil anys enrere a Amèrica, al sud de l'actual Mèxic. Originalment, aquest deriva d'una varietat primitiva amb nombroses branques laterals i panotxes de cinc a dotze grans que cauen quan són madurs. A través de la selecció humana de variants rares i d'interès, causades per mutacions que ocorren naturalment, es va obtenir la varietat actual amb una sola tija i panotxes amb dotzenes de grans voluminosos i envoltats per una fulla (figura 7A).⁵⁸ De manera similar, el tomàquet actual deriva d'una variant petita i sense gust, la pastanaga era llenyosa, plena de nusos i blanca, i la maduixa actual és un híbrid entre una espècie valorada pel bon gust i una altra de valorada per la seva mida.⁵⁹

Els coneixements de genètica adquirits durant el principi del segle xx van millorar l'entesa del procés de selecció. Així, es podia canviar l'expressió de trets d'interès deliberadament per mitjà de l'encreuament de progenitors específics, tècnica que encara s'utilitza actualment per obtenir variants d'interès (figura 7B). Com que la diversitat genètica és essencial per al procés de millora, es van desenvolupar mètodes de mutagènesi induïda utilitzant productes químics o raigs X per accelerar la freqüència de mutacions.⁶⁰ Aquests processos causen mutacions aleatòries arreu del genoma, per això cal un procés de cribratge i selecció de diverses generacions per identificar els mutants d'interès. La base de dades global FAO/IAEA Mutant Variety Database registra més de 3.300 varietats mutants en més de 230 espècies de plantes que s'han creat per mutagènesi induïda o creuament i selecció artificial des del 1950.⁶¹

Tot i la popularitat de l'ús de tècniques de mutagènesi induïda per crear noves varietats vegetals, l'extens procés de cribratge i selecció de les mutacions aleatòries favorables fa que sigui un procés lent i costós. Per això, el desenvolupament de les tècniques d'enginyeria genètica a la dècada del 1970 va despertar un gran interès per introduir mutacions de manera dirigida a les plantes i evitar el procés de selecció. La combinació de la transformació mitjançant biobalística (injecció de cèl·lules amb partícules amb informació genètica) o fent servir les propietats d'inserir seqüències de DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* amb l'avantatge que dona la regeneració de plantes a partir de cèl·lules en cultiu, tot plegat permet inserir un gen específic d'interès en una posició aleatòria del genoma de les plantes. La majoria de les varietats creades per enginyeria genètica que es cultiven actualment utilitzen aquesta tècnica per inserir un gen provinent d'una altra espècie a totes les cèl·lules de les plantes, la qual cosa crea un organisme transgènic. N'és un exemple la resistència als insectes conferida per un gen originari del bacteri *Bacillus thuringiensis* (Bt). El caràcter genètic Bt s'ha introduït en plantes com el blat de moro, soja, cotó o albergínia per evitar infeccions d'insectes i, així, reduir l'ús de pesticides químics (figura 7C).⁶²

Tot i això, els mètodes més habituals de transformació amb biobalística o amb *Agrobacterium tumefaciens* introdueixen les seqüències transgèniques aleatòriament al genoma de la planta, fet que comporta el risc de trencar un gen endogen o alterar-ne l'expressió. Per això, el desenvolupament de les nucleases dirigides (SDN, de l'anglès *site-directed nuclease*) com les ZFN, TALEN o sobretot CRISPR-Cas9 ha despertat un interès encara més gran en la creació de noves varietats vegetals. Les diverses formes d'utilitzar les SDN es classifiquen en tres categories establertes per l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) amb l'objectiu de definir una regulació específica per a cada una.⁶³ D'una banda, la categoria SDN1 inclou la modificació de la funció d'un gen a través de la reparació no homòloga del tall de doble cadena. De l'altra, la categoria SDN2 inclou el canvi precís d'una variant genètica per una altra a través de la recombinació homòloga amb un fragment curt de DNA que actua com a motlle. Finalment, la categoria SDN3 inclou la inserció al punt de tall per recombinació homòloga d'un fragment llarg de DNA que pot incloure més d'un gen.

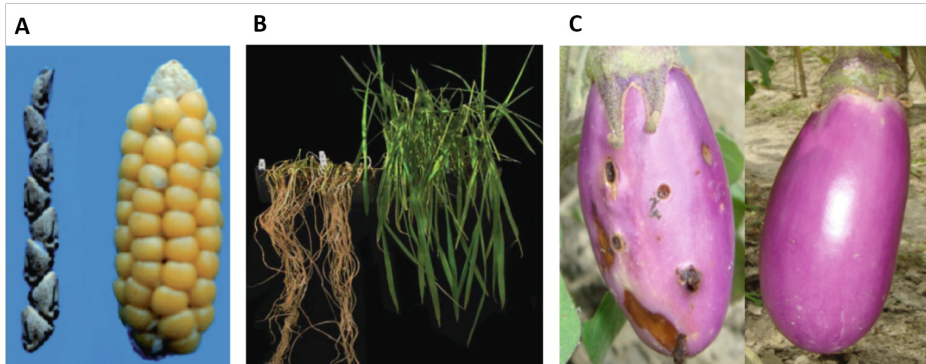


FIGURA 7. Plantes abans i després de la modificació genètica: A) el blat de moro actual (dreta) es va obtenir d'una varietat primitiva (esquerra) a través de la selecció de varietats d'interès per part dels humans. B) els coneixements bàsics de genètica van permetre la creació intencionada de noves varietats a partir del creuament de varietats d'interès, exemplificat aquí amb el resultat del creuament d'una varietat d'arròs no tolerant a la immersió amb una altra de tolerant (dreta) respecte a la varietat no tolerant abans del creuament (esquerra). C) les tècniques d'enginyeria genètica es poden utilitzar per introduir gens d'altres espècies al genoma i conferir noves propietats a les plantes, com la introducció d'un gen de *Bacillus thuringiensis* (Bt) al genoma de l'albergínia que impedeix la infecció de les arnes a les variants transgèniques (dreta) i evita els danys aparents que causen en la variant natural (esquerra).

Qualsevol de les tres categories d'edició genòmica té avantatges tècnics respecte a les tècniques predecessores. Per exemple, l'ús de SDN1 permet trencar o silenciar l'expressió de gens endògens específics amb l'objectiu d'eliminar trets no desitjables. A més, com que les mutacions de SDN1 no incorporen material

genètic extern, les plantes modificades no són transgèniques i són virtualment indistingibles de les plantes que es podrien crear amb els mètodes de mutagènesi induïda. Per això, en alguns països aquests productes estan exempts de ser regulats com a productes transgènics. L'avantatge respecte a la mutagènesi induïda és que amb SDN1 la mutació és dirigida, cosa que estalvia el procés de selecció. Així, per exemple, es pot escurçar un procés de millora del cultiu de cafè que duraria trenta anys utilitzant hibridació tradicional a tan sols sis anys.⁶⁴ Similarment, les modificacions SDN3 dirigeixen la inserció del gen foraster a una regió concreta del genoma, la qual cosa evita l'alteració del material genètic endogen que pot ocórrer amb la inserció aleatòria dels mètodes anteriors.

5.2. APLICACIONS DE L'EDICIÓ GENÒMICA EN CONREUS AGRÍCOLES

La majoria de varietats vegetals editades genèticament s'han creat utilitzant CRISPR-Cas9 per introduir modificacions puntuals del tipus SDN1.⁶⁵ Aquestes varietats ofereixen millores tant en el seu cultiu (*e. g.*, més eficiència en l'ús de l'aigua) com en el producte obtingut al final (*e. g.*, millora de les propietats nutricionals). Les seves aplicacions es troben en àmbits tan diversos com l'alimentació, la jardineria o la producció de fàrmacs i biocombustibles.⁵⁹

Gran part de les varietats milloren la tolerància dels cultius a factors d'estrès biòtic i abiòtic. Els factors d'estrès biòtic són aquells causats per la infecció d'un altre organisme viu, com ara un fong, bacteri, virus o insecte. La modificació genètica més comuna per tolerar l'estrès biòtic consisteix en la introducció d'un gen de resistència, tal com s'ha descrit anteriorment per les plantes que incorporen una toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) per resistir la infecció d'insectes. Les aplicacions d'aquesta tècnica no es limiten a l'alimentació, ja que també s'ha utilitzat per crear una variant de castanyer resistent al xancre del castanyer (*Cryphonectria parasitica*) que permetria la reintroducció del castanyer americà (*Castanea dentata*) als terrenys que ocupava als Estats Units abans de la devastació provocada per l'arribada del xancre del castanyer.⁶⁶

Pel que fa als factors d'estrès abiòtic, s'ha creat varietats que toleren millor la sequera, les temperatures extremes o els sòls amb alta concentració de salts, característiques que podrien ser molt útils per fer front al canvi climàtic.⁵⁹ Per exemple, s'ha utilitzat CRISPR-Cas9 per alterar un gen de blat de moro que li permet seguir creixent encara que l'aigua sigui escassa i per eliminar un gen de l'arròs que resulta en més tolerància a les concentracions de sals elevades. Els transgènics resistents a herbicides, tan estesos com polèmics, també es podrien considerar una manera de fer front a un estrès abiòtic. En són un exemple els cultius modificats genèticament perquè siguin resistents al glifosat, que permeten l'ús d'aquest herbicida arreu del cultiu per prevenir el creixement d'altres plantes i maximitzar el creixement de la llavor resistent d'interès.⁶⁷

Una altra aplicació de les tècniques d'edició genòmica en plantes és l'obtenció de variants amb més rendiment i eficiència de producció, és a dir, plantes que creixin més amb menys nutrients i plantes que produeixin més fruits o més grans. La comprensió del metabolisme de les plantes permet modificar-lo per destinar més metabòlits als processos d'interès, així com millorar l'eficiència de la fixació de nitrogen i la fotosíntesi. Tot i això, la millora d'aquests trets amb edició genòmica segueix sent difícil per la falta de coneixement sobre la regulació genòmica del metabolisme vegetal, sobretot en espècies que no reben tanta atenció com l'arròs o el blat de moro. L'obtenció d'aquest coneixement també permetrà la creació de varietats vegetals que facin sostenible, tant ambientalment com econòmicament, l'ús de biocombustibles. Per exemple, es podria millorar el rendiment del procés modificant els polímers de la paret cel·lular per facilitar l'alliberació dels sucres fermentables que s'utilitzen per formar etanol.⁶⁸

L'edició genòmica en plantes no es limita a optimitzar el seu cultiu, sinó que també permet millorar les propietats del producte final. La biomassa lignocel·lulòsica (e. g., userda o alfals) és l'aliment principal utilitzat en la producció de llet i carn. A través de l'edició genòmica, s'ha modificat la userda per crear variants de més fàcil digestió per als animals i variants que podrien reduir la producció de metà per als animals. Les possibilitats de millora són encara més àmplies pel que fa als aliments humans. Les propietats nutricionals dels fruits i vegetals es podrien millorar utilitzant enginyeria genètica per incrementar la seva quantitat de vitamines, antioxidants, micronutrients i aminoàcids essencials.⁶⁹ Es pot exemplificar amb l'arròs daurat, modificat perquè produeixi betacarotè que es torni vitamina A un cop consumit. Així, el seu ús en països en desenvolupament podria prevenir la mort de centenars de milers d'infants que causa la deficiència de vitamina A.⁷⁰

En el futur, les plantes transgèniques es podrien utilitzar per produir vacunes comestibles. Aquestes són parts comestibles d'una planta modificades genèticament per produir un component específic d'un patògen i generar protecció contra una malaltia. El concepte de distribuir ràpidament les llavors d'aquestes plantes i cultivar-les per al consum directe de les persones es planteja com una possible solució a la propagació de malalties en països en desenvolupament. De moment, s'està estudiant, entre altres, una vacuna contra l'hepatitis B en patates i una contra el coronavirus que causa la SARS en tomàquet.⁷¹

5.3. REPTES ECOLÒGICS, ÈTICS I LEGALS

L'ús comercial de cultius modificats genèticament ha despertat preocupacions ètiques, legals i de bioseguretat, ja que pot tenir implicacions per a la vida dels

individus presents i futurs, incloent-hi l'entorn no humà. Moltes d'aquestes preocupacions se centren especialment en l'ús de cultius transgènics. Tot i això, les darreres tècniques d'edició genòmica, com CRISPR-Cas9, plantegen reptes diferents de les tècniques clàssiques de transgènesi.

Els primers cultius modificats genèticament eren transgènics que incorporaven un gen d'una altra espècie, la qual cosa resultava en una varietat que difícilment es crearia de manera natural. En canvi, CRISPR-Cas9 es pot utilitzar per generar petites insercions i delecions en un punt concret del genoma (modificacions SDN1). Aquestes mutacions podrien tenir lloc de manera espontània, així que la varietat modificada genèticament és pràcticament indistingible d'una varietat natural o creada per mutagènesi induïda. L'única diferència és que amb CRISPR-Cas9 la mutació es genera amb alta especificitat i eficàcia, mentre que els altres mètodes introdueixen mutacions aleatòries al genoma i cal un procés de triatge fenotípic llarg i costós per seleccionar les millors variants.

El nombre de mutacions espontànies naturals per generació és relativament alt en els cultius d'interès agroalimentari, així que la introducció d'una sola mutació amb CRISPR-Cas9 incrementa molt poc la velocitat de mutació global (figura 8). En canvi, els processos de mutagènesi induïda per compostos químics o raigs X introdueixen entre centenars i milers de mutacions aleatòries en diversos punts del genoma. Per tant, des del punt de vista dels canvis fets al DNA, les mutacions puntuals introduïdes per CRISPR-Cas9 són indistingibles de les naturals i fins i tot es podrien considerar més segures que les variants creades per mutagènesi induïda, ja que es modifica un sol punt del genoma i no centenars o milers de punts aleatoris. Cal remarcar que la presència de mutacions de CRISPR-Cas9 fora del punt d'interès (*off-target*) és pràcticament nul·la, tot i que sempre s'estudia per garantir-ne l'absència. Així doncs, caldria esperar que les mutacions puntuals introduïdes amb CRISPR-Cas9 es reguessin legalment de manera similar a les tècniques d'hibridació i mutagènesi induïda. Tot i això, a la pràctica, la legislació sobre plantes modificades genèticament té enfocaments completament diferents en diversos països.

La legislació de països com els Estats Units d'Amèrica o l'Argentina es basa en el producte final i no en el procés utilitzat per obtenir-lo. Com que la introducció de petites mutacions SDN1 amb CRISPR-Cas9 produeix modificacions indistingibles de les que es podrien obtenir amb mutagènesi induïda o naturalment, les varietats creades amb aquesta tècnica no es consideren ni regulen com un organisme modificat genèticament (OMG). En canvi, si la varietat obtinguda conté el motlle petit que s'utilitza en modificacions SDN2 o un element transgènic inserit per SDN3, es considera que és un OMG. Així doncs, les modificacions SDN1 de CRISPR-Cas9 es poden utilitzar per crear varietats que no es consideren OMG, cosa que estalvia les anàlisis de riscos

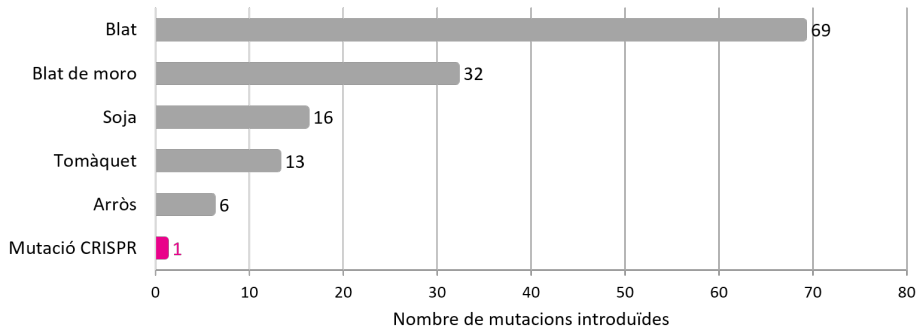


FIGURA 8. Nombre estimat de mutacions naturals i espontànies en cada generació segons la planta (gris) comparat amb el canvi hipotètic d'una sola base introduïda amb CRISPR-Cas9 (rosa). Adaptada de Charpentier *et al.*, 2019.⁷²

que això comportaria i redueix el cost i temps de portar el producte al mercat. Aquest punt de vista tècnic considera la seguretat i l'eficàcia, però deixa poc espai a consideracions morals, culturals i socioeconòmiques.⁷³

Per contra, la legislació de la Unió Europea, el Regne Unit i Nova Zelanda es basa en el procés utilitzat per obtenir el producte. Així, considera que els productes obtinguts per mutagènesi SDN1 amb CRISPR-Cas9 han de ser regulats com a OMG, ja que el procés de mutagènesi altera el material genètic de l'organisme d'una manera que no succeeix naturalment. En conseqüència, l'ús de CRISPR-Cas9 no és tan avantatjós com en altres països perquè el procés d'aprovació com a OMG retarda i encareix l'entrada del producte al mercat.⁷⁴ En el cas de la Unió Europea, fins i tot una vegada el producte ha estat aprovat per a la seva comercialització pel Consell Europeu, és probable que diversos països prohibeixin el seu ús per l'oposició pública als OMG. A més, la Unió Europea requereix als fabricants etiquetar aquests productes com a OMG. Un inconvenient d'aquesta aproximació és assegurar el compliment de la llei, ja que resulta difícil identificar el mètode emprat per introduir una mutació que a nivell de seqüència és idèntica a les que podrien tenir lloc de manera natural.⁷⁵ Recentment, s'ha plantejat introduir canvis a la legislació vigent per tal que es basi en el producte en comptes del procés i es puguin aprofitar els avantatges de les noves tècniques d'edició genòmica.⁷⁶

6. L'EDICIÓ GENÒMICA EN ANIMALS

L'ús de les tècniques d'edició genòmica en animals obre la porta a aplicacions molt diverses. Per una banda, l'edició genòmica en animals permet crear models de malaltia que, a diferència dels models basats en iPSC o organoides, són d'organisme sencer. D'altra banda, tal com en el cas dels cultius agrícoles, l'edició genòmica es pot utilitzar en bestiar per millorar les propietats alimentàries o conferir resistència a malalties. Fins i tot, l'edició genòmica en animals planteja aplicacions innovadores però que requereixen un debat ètic, com el seu ús en xenotrasplantaments, la desextinció d'espècies o l'impuls genètic (*gene drive*).

6.1. L'EDICIÓ EN MODELS DE MALALTIA *IN VIVO*

Els models animals de malalties són essencials per entendre el mecanisme de les malalties que afecten els humans i provar fàrmacs per tractar-les. A diferència dels models *in vitro* basats en cèl·lules mare o organoides, els models *in vivo* d'animals permeten estudiar els efectes de la malaltia i/o el fàrmac en l'organisme sencer. Així, es pot investigar la toxicologia dels fàrmacs i els efectes en diferents òrgans de les malalties recreades.

Les tècniques d'edició genòmica amb nucleases com CRISPR-Cas9 ofereixen molts avantatges respecte als mètodes de mutagènesi dirigida tradicionals, com ara la possibilitat d'editar múltiples gens alhora i la de generar animals model editats genèticament en una sola generació. Això no només redueix el cost i temps necessari per crear un nou model de malaltia, sinó que contribueix a realitzar el principi de les 3R de l'experimentació animal (reemplaçar, reduir i refinar) i disminueix el nombre d'animals utilitzats per crear el model de malaltia.

El desenvolupament de nous models animals no humans amb CRISPR-Cas9 consisteix normalment en la injecció de Cas9 i un o diversos gRNA directament

a l'embrió de l'animal, o bé en la derivació a partir de cèl·lules mare embrionàries amb la mutació d'interès. Alternativament, també es poden crear models amb les mutacions en òrgans o teixits específics a través de la injecció sistèmica de la nucleasa en vectors virals amb tropisme per aquell òrgan o teixit concret. A més, la versatilitat del sistema CRISPR-Cas9 permet la manipulació genètica d'un rang d'espècies molt ampli, la qual cosa facilita la creació de models de malaltia més enllà dels organismes model en genètica (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, peix zebra i ratolins) a organismes no tradicionals com la xinxa roja (*Pyrrhocoris apterus*), escarabats, formigues i calamars.⁷⁷

Els ratolins destaquen especialment per la similitud del seu genoma amb l'humà i una cria relativament ràpida i senzilla, característiques que els converteixen en models molt utilitzats per a la recerca biomèdica. En aquest context, les tècniques d'edició genòmica resulten útils per crear ratolins com a models de diversos tipus de càncer, una malaltia causada per mecanismes que involucren diverses mutacions genètiques. La possibilitat de modificar diversos gens alhora permet generar models amb tumors de complexitat similar a la dels pacients de càncer, com ara tumors cerebrals⁷⁸ o la leucèmia mieloide aguda.⁷⁹ Aquests models s'utilitzen per identificar gens importants en la regulació del càncer i responsables del fenotip del tumor. Per exemple, la identificació del paper dels gens *p53*, *LKB1* i *KRAS* en el càncer de pulmó va ser en un ratolí model d'adenocarcinomes de pulmó creat amb CRISPR-Cas9.⁸⁰

Depenent de la malaltia a modelar, alguns organismes resulten més convenients que d'altres. L'edició de la línia germinal amb CRISPR-Cas9 ha facilitat la creació de models de malalties amb mamífers com rates, conills, porcs i, fins i tot, primats no humans.⁸¹ Els porcs, per exemple, són més adequats que els ratolins en l'estudi de malalties cardiovasculars humanes (e. g., infart de miocardi, dislipèmies, desordres electrofisiològics) per la seva major similitud a la fisiologia, anatomia i genètica humana. Per exemple, la mutació de la fibril·lina 1 (*FBN1*) amb ZFN en la línia germinal de porc per transferència nuclear permet crear models de la síndrome de Marfan, que causa desordres cardiovasculars i del sistema osteomuscular, útils per estudiar la patogènesi i la base molecular de la malaltia i desenvolupar tractaments.⁸²

Així mateix, en alguns casos, és preferible utilitzar models animals més simples que el ratolí, com el peix zebra (*Danio rerio*) o el nematode *C. elegans*. Tant l'un com l'altre es crien més de pressa i ocupen menys espai que el ratolí, amb l'avantatge afegit que els seus embrions es desenvolupen a l'exterior (fora de la mare) i són transparents, cosa que facilita l'estudi de les primeres fases del desenvolupament. *C. elegans* es caracteritza per ser un animal invertebrat i de mida petita, així que no està subjecte a la Directiva Europea 2010/63/EU⁸³ i, consegüentment, es poden utilitzar milers d'individus de *C. elegans* per provar

l'efecte de diversos gens o fàrmacs en assajos preclínics. A més, tot i que *C. elegans* no té ni esquelet ni sistema circulatori, comparteix uns vint mil gens amb l'ésser humà i molts dels quals realitzen funcions similars. Per això, és un model molt pràctic per estudiar processos cel·lulars i moleculars a partir de l'alteració de gens concrets amb les tècniques d'edició genòmica.⁸⁴ El peix zebra, en canvi, és un animal vertebrat amb sistema circulatori i que comparteix la majoria de teixits i òrgans amb els humans (excepte pulmons, pròstata i glàndules mamàries). Com que els seus embrions són transparents i es poden observar amb microscopi, permet l'estudi dels processos d'angiogènesi i de desordres neurològics sense malmetre l'embrió. En aquest context, la modificació genètica s'ha utilitzat per crear peixos zebra models de càncer i de malalties musculars, per entendre els mecanismes de la malaltia i provar fàrmacs.^{85,86}

6.2. L'EDICIÓ GENÒMICA I LA RAMADERIA

La població humana no para d'augmentar en nombre i s'estima que caldrà incrementar la producció d'aliments un 60 % per igualar la demanda que hi haurà l'any 2050.⁸⁷ Per tant, cal trobar sistemes eficaços per produir més aliments i alhora reduir l'impacte ambiental de la ramaderia. La selecció artificial d'animals ha tingut un gran impacte en l'increment de la productivitat del bestiar i, avui dia, les tecnologies d'edició genòmica ofereixen l'oportunitat de produir bestiar més sa i productiu.

En els darrers anys, s'han desenvolupat diverses estratègies basades en l'edició genòmica que facilitarien el control de les malalties infeccioses en bestiar. N'és un bon exemple la creació de porcs resistents al virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina (PRRSV, de l'anglès *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*), la malaltia infecciosa de porcs més problemàtica arreu del món. La disrupció del gen *CD163*, utilitzant CRISPR-Cas9, va donar lloc a porcs completament resistents al PRRSV que no s'havien pogut aconseguir utilitzant les tècniques d'edició genètica tradicionals basades en la transgènesi.⁸⁸ Similarment, s'han desenvolupat porcs que podrien ser tolerants al virus de la pesta porcina africana,⁸⁹ bous tolerants a la tuberculosi⁹⁰ i altres animals resistents o tolerants a altres infeccions víriques o bacterianes.⁹¹

Una altra aplicació de l'edició genòmica és millorar la productivitat dels animals. La disrupció del gen de la miostatina (*MSTN*) amb nucleases dirigides ha donat lloc a porcs, bous i ovelles amb més massa muscular i menys greix. Tot i això, actualment, el salmó AquAdvantatge és l'únic animal modificat genèticament aprovat per al consum humà als Estats Units d'Amèrica i el Canadà.⁹² El salmó AquAdvantatge conté una modificació en la regulació de l'hormona del creixement que impedeix que el seu creixement s'interrompi durant l'estació freda, així que el seu creixement es redueix de

tres anys a només entre setze i divuit mesos. A diferència dels animals amb alteracions en la miostatina, el salmó modificat genèticament té la mateixa mida i propietats que la variant sense modificar, fet que explica la seva aprovació per al consum humà.

Un altre cas es tracta d'un vedell editat genèticament amb CRISPR-Cas9 per introduir una còpia al cromosoma X del gen *SRY*, que normalment es troba al cromosoma Y determinant el sexe masculí de l'individu.⁹³ El vedell modificat genèticament seria de sexe masculí tot i tenir dos cromosomes X, ja que un dels dos cromosomes X conté el gen *SRY* que activa el desenvolupament de l'embrió com a mascle. A més, la seva progènie donaria lloc a un 75 % de mascles i un 25 % de femelles. L'objectiu final d'aquesta modificació és incrementar la proporció de vedells mascles que neixen, ja que requereixen un 15 % menys d'energia per incrementar el seu pes muscular que una femella i, per tant, són més eficients en l'ús de l'aliment.

Altres aplicacions de l'edició genòmica en bestiar són la millora de la seguretat alimentària o del benestar animal. La regulació i el possible ús d'aquests animals modificats genèticament és un repte ètic i requereix un debat plural. Un bon exemple n'és la introducció d'una variant al genoma de bou que impedeix la formació de les banyes,⁹⁴ fet que estalvia el dolorós procés d'eliminar les banyes a les cries. En aquest cas, a més, es va detectar la inserció de DNA plasmídic al genoma dels bous, subratllant la importància de definir bé els riscos i conseqüències de l'aplicació de les tècniques d'edició genòmica.

6.3. APLICACIONS FUTURES DE L'EDICIÓ GENÒMICA EN ANIMALS

A més del desenvolupament de models animals de malaltia i la millora de les propietats del bestiar, les tècniques d'edició genòmica aplicades a animals obren la porta a noves aplicacions que plantegen debats ètics, socials, econòmics i de regulació. En aquesta secció es comenten tres d'aquestes aplicacions: la millora dels xenotrasplantaments, la desextinció d'espècies i l'impuls genètic.

El xenotrasplantament és el procés de trasplantar cèl·lules, teixits o òrgans d'una espècie a una altra i, darrerament, la recerca en aquest tema ha guanyat popularitat per la davallada progressiva de disponibilitat de donants humans.⁹⁵ Els porcs es consideren els millors candidats com a donadors d'òrgans a humans per tenir una mida i fisiologia semblants, juntament amb una alta disponibilitat. Tot i això, hi ha diversos riscos relacionats amb la immunocompatibilitat i la transmissió de microorganismes i virus porcins al receptor humà. Les tècniques d'edició genòmica, en especial CRISPR-Cas9, ofereixen l'oportunitat de modificar genèticament els porcs destinats a la donació d'òrgans per evitar o eliminar alguns d'aquests riscos. Un exemple de riscos a evitar és la transmissió dels retrovirus endògens de porc (PERV, de l'anglès *porcine*

endogenous retrovirus), que són retrovirus integrats al genoma de porc i es podrien transmetre als humans a través d'un xenotrasplantament. Utilitzant CRISPR-Cas9 per introduir seixanta-dues modificacions al genoma de porc, es poden inactivar tots els PERV del genoma i eliminar el seu risc de transmissió a cèl·lules humanes.^{96,97} Actualment, s'estan duent a terme assajos preclínic per valorar la seguretat i efectivitat del xenotrasplantament d'òrgans de porcs modificats genèticament a primats no humans,⁹⁸ alhora que es treballa per crear una legislació que garanteixi la seguretat de futurs assajos clínics i es consideren les implicacions ètiques d'aquesta pràctica.

La desextinció és el procés de recrear o causar el renaixement d'una espècie prèviament extingida per complet. N'és un exemple la desextinció de la cabra pirinenca. El 1999 tan sols quedava un exemplar viu de l'espècie al Parc Natural d'Ordesa, als Pirineus, que es va capturar per extreure'n una mostra d'orella i es va alliberar de nou fins que es va trobar morta l'any següent. El 2003 es va utilitzar la mostra de teixit de l'últim exemplar de l'espècie per intentar clonar-lo i desextingir la subespècie. Per fer-ho, es va transferir el nucli d'una cèl·lula somàtica de la mostra de teixit a un òvul d'una cabra domèstica. Tot i implantar diversos embrions, tan sols va néixer un individu que va morir al cap de set minuts després del part per un problema respiratori. Tot i això, la cabra nascuda era idèntica genèticament a l'últim exemplar de cabra pirinenca, així que el seu naixement se sol considerar la primera desextinció.⁹⁹

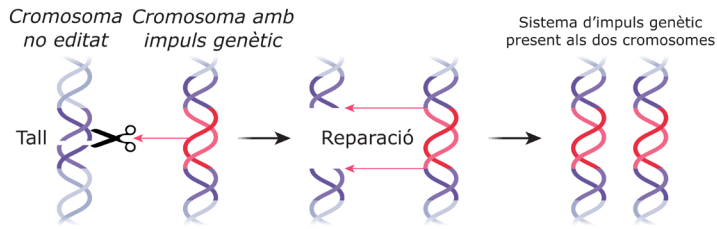
Actualment, es treballa per desextingir el mamut llanut a partir de restes congelades del seu DNA. A diferència de la cabra pirinenca, la quantitat de DNA de mamut conservada és insuficient per transferir un nucli a un òvul d'una espècie similar i clonar l'espècie directament. Per això, les tècniques d'edició genètica tenen un paper fonamental en la desextinció del mamut, ja que permetrien introduir gens de mamut a un genoma d'elefant actual per reproduir algunes de les característiques del mamut llanut com el pelatge espès o l'hemoglobina adaptada al fred.¹⁰⁰ Tot i que el treball en desextinció suposaria avenços molt significatius en les tecnologies d'edició del DNA i permetria millorar ecosistemes que l'ésser humà ha destruït, sovint es critica perquè rep finançament que alternativament es destinaria a programes de conservació de les espècies actuals.

L'impuls genètic és una altra aplicació de les tècniques d'edició genètica que podria tenir repercussions importants. L'impuls genètic és la idea de propagar un caràcter genètic alterat a través d'una població salvatge a una velocitat superior que la de l'herència convencional. De fet, és un procés fonamental per tal que canvis genòmics introduïts en un o pocs individus puguin estendre's a les poblacions. La tècnica es basa a utilitzar CRISPR-Cas9 perquè el 100 % dels descendents d'un encreuament entre un organisme modificat i un de salvatge heretin el caràcter alterat, a diferència del 50 % que s'obtidria en un

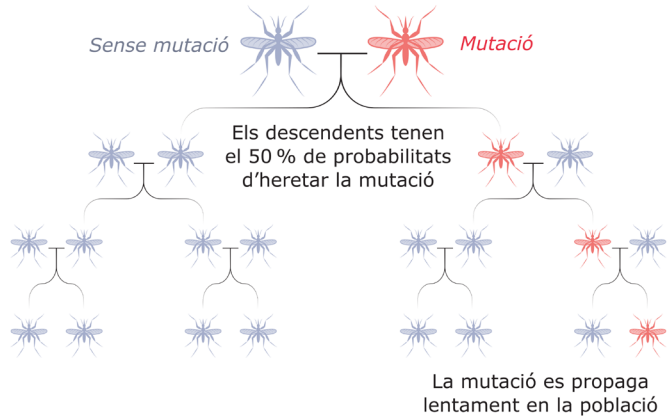
encreuament convencional. Així, a partir de la introducció d'un cert nombre d'organismes modificats genèticament amb el sistema d'impuls genètic, el caràcter alterat es propaga per la població salvatge a mesura que s'encreua amb la modificada.

Per aconseguir que el 100 % dels descendents tinguin el caràcter alterat, l'organisme amb el sistema d'impuls genètic conté CRISPR-Cas9 al seu genoma. Quan aquest s'aparella amb un organisme salvatge, els descendents adquireixen una còpia del sistema d'impuls genètic i una còpia normal de l'altre progenitor. Durant el desenvolupament primerenc, la còpia de CRISPR-Cas9 integrada al sistema d'impuls genètic talla la còpia normal. Aquest tall es repara utilitzant el sistema d'impuls genètic com a model, i resulta en descendents que tenen dues còpies de la variant modificada per impuls genètic. Com a resultat, els descendents passaran el sistema d'impuls genètic al 100 % de la propera generació (figura 9).

La tècnica de l'impuls genètic té el potencial d'alterar poblacions senceres i, per tant, modificar ecosistemes sencers. Un dels riscos és que els caràcters alterats es propaguin més enllà de la població objectiu,¹⁰¹ tot i que les tècniques més recents permeten controlar l'abast de l'impuls genètic a través d'eficiències de transmissió del caràcter alterat inferiors al 100 % i la introducció progressiva d'individus modificats a la població salvatge. S'ha proposat utilitzar l'impuls genètic per reduir o eliminar les malalties que es transmeten a través dels insectes (com la malària o el dengue), controlar les espècies invasores o revertir la resistència als insecticides de les plagues. De moment, s'han realitzat proves d'impuls genètic en poblacions controlades i aïllades de l'exterior i s'ha començat a assajar els efectes de l'alliberació de mosquits modificats genèticament però estèrils al medi exterior.¹⁰² Caldrà esperar uns anys per veure les primeres aplicacions de l'impuls genètic en el medi natural i si els resultats són tan prometedors com sembla d'entrada. Mentrestant, cal estudiar els efectes que l'impuls genètic tindria en els ecosistemes i la dinàmica evolutiva de les espècies a què afecta. De fet és una tècnica que podria permetre no tan sols modificar alguns individus, sinó dirigir l'evolució, per tant, representa un pas enorme en les implicacions de l'edició genòmica.



Herència estàndard



Herència amb impuls genètic

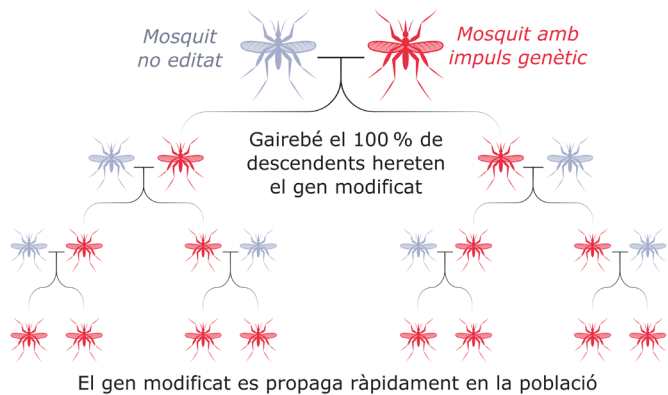


FIGURA 9. Funcionament de l'impuls genètic. Els descendents d'un mosquit amb impuls genètic i un de salvatge tenen una còpia amb el sistema d'impuls genètic i una altra normal. En les etapes primerenques de desenvolupament, el sistema CRISPR-Cas9 integrat a l'impuls genètic talla la còpia normal i aquest tall es repara utilitzant el sistema d'impuls genètic com a motlle. Com a resultat, el 100% dels descendents transmetran el sistema d'impuls genètic. D'altra banda, en l'herència estàndard els caràcters mutats es propaguen lentament perquè tan sols el 50% dels descendents l'hereten, en l'herència amb impuls genètic els caràcters modificats es propaguen ràpidament perquè el 100% dels descendents hereten el gen modificat. Adaptada de Scudellari, 2019.¹⁰²

7. L'EDICIÓ GENÒMICA EN ELS HUMANS

El ràpid desenvolupament de les tècniques d'edició genòmica planteja la possibilitat d'alterar trets humans de manera precisa, la qual cosa obre la porta a modificacions de la biologia humana que resultaven impracticables fins al moment. El potencial terapèutic d'aquestes tècniques és enorme i el seu àmbit va des de corregir o fer front a malalties genètiques a alterar certs receptors cel·lulars per prevenir, per exemple, infeccions com el VIH. Però, a més de les aplicacions terapèutiques, les tècniques d'edició genòmica possibiliten aplicacions que requereixen un debat ètic i una regulació estricta, com els anomenats bebès a la carta o la millora de les qualitats humanes.

A més, les conseqüències de l'edició varien molt segons l'elecció de la regió genòmica i les cèl·lules a modificar. L'edició de cèl·lules de la línia germinal (les que formaran els gàmetes) o de la línia somàtica és relativament semblant des del punt de vista tècnic però té implicacions que difereixen radicalment. Els canvis del genoma d'una cèl·lula somàtica tan sols es propaguen a la descendència d'aquella cèl·lula, cosa que dona lloc a teixits mosaic amb part de cèl·lules editades i part de cèl·lules no editades. En aquest cas, la persistència de les modificacions es limita a la durada de la vida de l'individu com a màxim, ja que no es transmet a la descendència. En canvi, la modificació del genoma d'una cèl·lula germinal té el potencial per crear un individu en què la major part de les cèl·lules tindran la mateixa modificació, incloent-hi les seves cèl·lules germinals, de tal manera que la manipulació es transmetrà a la descendència.

En aquesta secció s'exploren els beneficis i reptes de l'edició terapèutica de cèl·lules humanes segons si pertanyen a la línia somàtica o germinal i els riscos associats a la millora de trets humans.

7.1. L'EDICIÓ DE LA LÍNIA SOMÀTICA EN TERÀPIA

La teràpia gènica consisteix a transferir DNA a les cèl·lules d'un pacient per corregir un gen defectuós o els seus efectes per tal de tractar malalties que no es podrien curar amb fàrmacs convencionals. Els primers assajos clínics de teràpia gènica es van realitzar durant la dècada de 1990, però no va ser fins al 2017 que la FDA (seguida el 2018 per l'Agència Europea de Medicaments [EMA]) va aprovar la primera teràpia gènica, voretigen neparvovec. Aquesta, utilitza un vector víric per introduir una còpia correcta del gen *RPE65* a les cèl·lules de la retina, amb la qual cosa repara les mutacions que provoquen l'amaurosi congènita de Leber (ACL) i millora la visió de les persones afectades. De fet, les primeres teràpies gèniques desenvolupades es basen a usar vectors per introduir fragments genòmics correctes que reemplaçin els fragments mutats que causen malalties.^{103, 104} Els avenços en les tècniques d'edició genòmica permeten plantejar un altre tipus de teràpia gènica basada a utilitzar nucleases com CRISPR-Cas, ZFN o TALEN per reparar la mutació que causa la malaltia o els seus efectes. Aquesta secció se centra en aquest darrer tipus de teràpies, de les quals hi ha diversos assajos clínics en marxa i és previsible que algunes arribin al mercat en els propers anys.

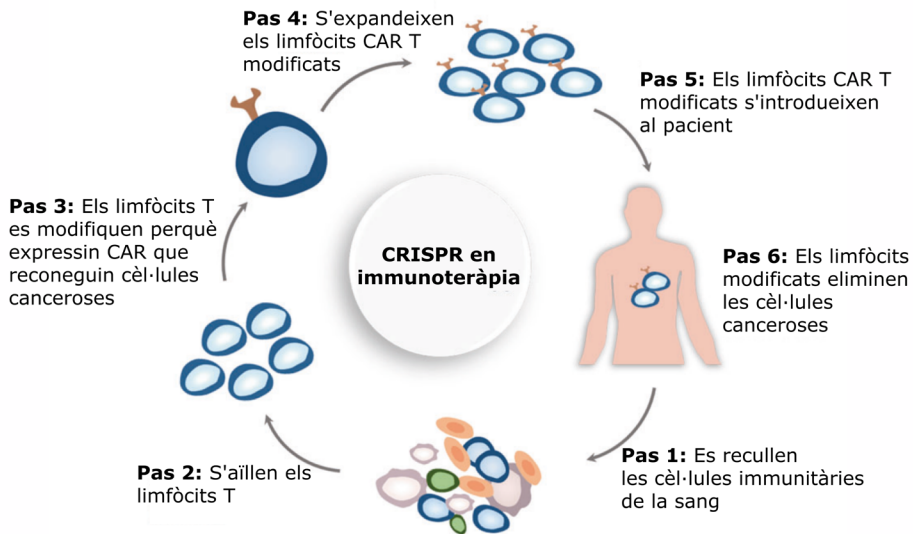


FIGURA 10. Teràpia gènica *ex vivo* basada en limfòcits CAR T modificats utilitzant CRISPR-Cas9. Adaptada de Li *et al.*, 2020.¹⁰⁵

La majoria d'assajos clínics són de teràpies gèniques *ex vivo*, és a dir, que involucren la modificació genètica de cèl·lules a l'exterior de l'organisme seguida pel trasplantament de les cèl·lules editades al pacient. L'edició *ex vivo* ofereix avantatges respecte a l'edició *in vivo*, com facilitar l'entrada dels enzims d'edició genòmica a les cèl·lules a editar o evitar respostes immunològiques que comprometin la seguretat del tractament. Així, no és sorprenent que els primers assajos clínics d'edició genòmica siguin *ex vivo* per tractar malalties de la sang com l'anèmia falciforme i la β -talassèmia. L'estratègia de tractament consisteix a obtenir cèl·lules mare hematopoètiques del pacient, editar-les amb ZFN o CRISPR-Cas9 perquè produeixin la forma fetal de l'hemoglobina (que normalment es deixa de produir durant els primers mesos de vida) i reintroduir-les al pacient per tal que la forma fetal de l'hemoglobina assumeixi la funció de l'hemoglobina adulta afectada per l'anèmia falciforme o la β -talassèmia.¹⁰⁵ Un altre tipus de teràpies *ex vivo* amb diversos assajos clínics en marxa és l'edició de limfòcits T, ja que són accessibles i tenen el potencial de ser utilitzats com a immunoteràpia contra el càncer. En concret, CRISPR-Cas9 s'utilitza per millorar les característiques de limfòcits T modificats amb un receptor d'antígens quimèric (cèl·lules T CAR) que reconeix un marcador tumoral i, per tant, dirigeix l'eliminació de tumors (figura 10).¹⁰⁶

En les teràpies d'edició genòmica *in vivo*, les nucleases que editen el DNA són el fàrmac en si mateixes. L'aplicació actual d'aquestes teràpies està limitada en bona part pels mètodes d'introducció dels enzims d'edició de DNA a les cèl·lules somàtiques a editar. Per això, els assajos clínics en marxa es limiten a malalties que es puguin tractar editant teixits de fàcil accés. Les malalties dels ulls, per exemple, són bones candidates per la facilitat d'accedir a la retina, pel privilegi immune de l'ull que redueix el risc de resposta immune als vectors o als gens externs, per la poca circulació entre l'ull i la resta del cos que redueix el risc d'editar altres teixits, i pel baix reemplaçament de les cèl·lules editades que millora la probabilitat que el tractament persisteixi més temps. L'assaig clínic d'edició genòmica *in vivo* més avançat avui dia és precisament per tractar l'amaurosi congènita de Leber, editant cèl·lules de la retina amb CRISPR-Cas9.¹⁰⁷

En els anys vinents, s'espera observar els primers assajos clínics basats en les tècniques d'edició genòmica més modernes com el *base editing* o el *prime editing*, que permetrien corregir cap a un 90 % de les 75.000 variants patogèniques humanes descrites a ClinVar.²⁴ Tot i això, no és previsible que se sobrepassi el marc d'actuació actual de malalties monogèniques. A més, fins que no hi hagi una millora en els sistemes d'introducció dels enzims d'edició de DNA a les cèl·lules somàtiques a editar, és previsible que es limitin a teràpies *ex vivo* o de teixits accessibles externament.¹⁰⁸ Aquestes limitacions són precisament les que desperten l'interès en l'edició de la línia germinal.

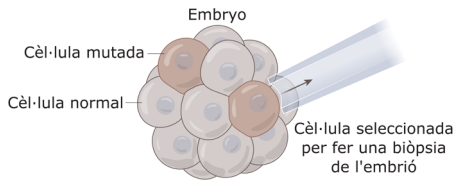
7.2. L'EDICIÓ GENÒMICA GERMINAL

Mentre que els tractaments basats en l'edició de la línia somàtica tenen problemes, sobretot tècnics, l'edició de la línia germinal requereix un debat ètic molt més complex. L'edició de la línia germinal consisteix a modificar genèticament o bé els gàmetes utilitzats per a la fecundació *in vitro* (FIV), o bé un zigot o un embrió en els primers estadis del desenvolupament. Si aquest embrió s'implanta, l'individu que en neixi tindrà l'edició en la majoria, o en tots, els teixits del cos, incloent-hi les cèl·lules germinals que transmetran la modificació als descendents de l'individu. Així, mentre que les conseqüències de l'edició somàtica es limiten a la vida de l'individu, les de l'edició germinal es transmeten generació rere generació, motiu pel qual cal tenir especial atenció a les possibles conseqüències negatives i les implicacions no estrictament biològiques.

L'edició d'embrions humans per a ús en recerca biomèdica ha demostrat que cal tenir en compte les limitacions de les tècniques d'edició genòmica actuals i que, per tant, l'edició germinal no es pot utilitzar com a tractament.¹⁰⁹ Així doncs, l'edició de la línia germinal per a qualsevol altre ús que no sigui recerca està prohibida arreu del món. Les limitacions tècniques inclouen que les mutacions provocades amb nucleases com CRISPR-Cas9 no són sempre les desitjades i que hi ha risc d'edicions fora de la regió d'interès. A més, com que l'eficiència d'aquestes tècniques no és total, hi ha el risc que algunes cèl·lules de l'embrió no es modifiquin i l'individu resultant sigui un mosaic en què no totes les cèl·lules tinguin la mutació que cura la malaltia (figura 11).¹¹⁰ L'edició de gàmetes en comptes de zigots o embrions permetria evitar algunes d'aquestes limitacions, ja que totes les cèl·lules de l'embrió format serien idèntiques (i s'evitaria el mosaïcisme) i això permetria seleccionar amb tota certesa aquells embrions amb la mutació correcta. Tot i això, les tècniques d'edició de gàmetes encara estan en desenvolupament.

Arribat el punt en què l'edició de la línia germinal fos prou eficaç i segura, caldria tenir una discussió pública i plural sobre el seu impacte social i ètic per limitar les seves aplicacions als casos en què fos estrictament necessari. L'àmbit més factible d'aplicació de l'edició germinal seria el de corregir mutacions que els progenitors volen evitar passar a la descendència. En aquest cas, però, hi ha alternatives com l'adopció o, si volen tenir un descendent relacionat biològicament, utilitzar el diagnòstic preimplantacional per seleccionar els embrions que no heretin la mutació. Així doncs, l'edició de la línia germinal es limitaria segurament a aquells casos en què la probabilitat de tenir un descendent biològicament relacionat sense la mutació sigui molt baixa, ja que es pot plantejar que és millor corregir els embrions que produir-ne molts per descartar-ne la majoria i trobar-ne algun sense la mutació.¹¹¹ D'altres casos en què l'edició germinal podria ser la resposta és en el tractament de malalties en què l'edició somàtica no fos del tot efectiva.

Problemes en el diagnòstic:



Problemes en l'edició genòmica:

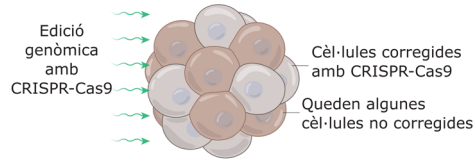


FIGURA 11. Mosaïcisme de les edicions genètiques en embrions. Els embrions poden ser un mosaic de cèl·lules amb diverses mutacions, fet que pot conduir a diagnòstics equivocats (esquerra). Quan s'editen embrions amb CRISPR-Cas9, com que el procés no és 100 % eficient, es crea mosaïcisme perquè part de les cèl·lules no s'ha editat. Adaptada de Ledford, 2019.¹¹⁰

Exemples en serien la fibrosi quística o la distròfia muscular, ja que les teràpies somàtiques que s'estan estudiant actualment actuen tan sols en alguns dels teixits afectats per aquestes malalties i, en canvi, l'edició de la línia germinal facilitaria curar la malaltia en tots els teixits.¹¹²

El primer intent d'editar la línia germinal en humans es va donar a conèixer el novembre de 2018 i tenia com a objectiu crear humans resistent a la infecció del VIH. Per fer-ho, un equip liderat per He Jiankui, aleshores membre de la Universitat de Ciència i Tecnologia del Sud de Shenzhen, a la Xina, va intentar recrear una mutació al gen *CCR5* que es troba naturalment en algunes persones i està associat a la resistència al VIH. L'objectiu era que els individus nascuts amb l'edició fossin resistent al virus, tot i que un estudi publicat uns mesos després de l'experiment va concloure de manera independent que la delecció introduïda podria escurçar la vida dels individus. Això subratlla un aspecte important de les teràpies gèniques: fins i tot quan s'ha introduït el canvi genètic desitjat, és difícil assegurar que l'alteració introduïda no té conseqüències inesperades que puguin afectar altres processos biològics. Per això, és important assegurar que el gen escollit i els efectes de la mutació introduïda es coneixen prou abans d'utilitzar-los com a teràpia.

A més, aquest estudi és polèmic per diversos motius. En primer lloc, les lleis de diversos països, la Xina inclosa, prohibeixen l'edició de la línia germinal com a teràpia. Que l'experiment es dugués a terme demostra la complexitat de regular estrictament l'ús de les tècniques d'edició genòmica i els possibles riscos del seu mal ús. En segon lloc, diversos científics han indicat que hi ha tècniques alternatives per aconseguir l'objectiu de la mutació introduïda i que, per tant, l'ús de l'edició genòmica com a darrera opció no està completament justificat. Finalment, també ha estat criticat per la falta de transparència en el procés i per no propiciar un debat públic sobre l'ètica de l'experiment abans de fer-lo.¹¹³ A causa d'aquest escàndol, diversos científics van proposar una moratòria global sobre l'edició genòmica en la línia germinal fins que s'aclareixin els aspectes ètics i tècnics, però al final no es va fer efectiva. Les conseqüències ètiques de l'edició genòmica en la línia germinal es tracten al capítol següent.

7.3. LA MILLORA DE LES QUALITATS HUMANES PER MITJÀ DE L'EDICIÓ GENÒMICA

Les teràpies d'edició genòmica tenen com a objectiu tractar una condició genètica, canviant de manera precisa el genoma per millorar els símptomes o, fins i tot, revertir els efectes patològics de la malaltia. En canvi, la millora genètica consisteix a «millorar» l'individu o els descendents per tal de proporcionar qualitats diferents que no estan codificades en el genoma i que es consideren beneficioses. El canvi de concepte entre tractar i millorar comporta un seguit de problemes ètics importants.

Primer, la distinció entre quines condicions són malalties i quines no es pot difondre en alguns casos i depèn del context. Les característiques humanes són fruit de moltes variants genètiques i abasten un espectre divers, de manera que el concepte de què és normal i què no ho és canvia per a cada persona. Per exemple, tothom estaria d'acord que la malaltia de Tay-Sachs no és normal i que s'hauria de classificar com a malaltia per les seves conseqüències indesitjables, però la distinció no és tan clara en el cas de la sordesa genètica. Malgrat que no és consistent amb el rang de capacitats associades típicament a l'espècie humana, aquesta característica inclou l'individu en una comunitat de persones també afectades per sordesa genètica, alguns dels quals rebutgen la idea que la sordesa hauria de ser curada o tractada. Un exemple en seria una parella de sords que preferirien que el seu fill també fos sord per compartir amb ells l'experiència de viure amb aquesta condició.¹¹⁴ El cas del daltonisme seria encara més clar, ja que és una condició que no ha de considerar-se una anomalia, tot i ser minoritari (7 % dels homes). Cal, doncs, tenir en compte que el concepte de malaltia no és objectiu ni neutre, sinó un resultat social que pot estar influït per factors més enllà de la biologia de la condició.

En segon lloc, la línia que separa teràpia i millora es pot arribar a desdibuixar en molts casos. La millora és alterar les capacitats humanes més enllà del nivell típic de l'espècie o el rang normal de funcionament, o qualsevol intervenció no terapèutica per canviar un tret humà. El tractament, en canvi, és restaurar el funcionament normal i si s'anés més enllà es consideraria millora. Per bé que la distinció sembla senzilla, en determinades ocasions resulta confusa. Per exemple, no està clar si s'hauria de considerar teràpia o millora el fet d'editar el genoma per introduir una variant que una petita part de la població té de manera natural i que redueix el nivell de colesterol en sang. Tampoc queda clar si la correcció de la mutació del gen *BRCA* per evitar el risc elevat de càncer s'hauria de considerar tractament per la seva naturalesa preventiva. Fins i tot, a vegades podria resultar impossible separar el tractament de la millora. Un exemple seria que, en el supòsit que es tractés un individu per restaurar la seva funció muscular normal, s'intentés anar una mica més enllà del que és restaurar

la funció normal per aconseguir millors resultats fins i tot en el cas que l'eficiència del tractament no fos del 100 %. En aquells casos en què l'eficiència fos més alta de l'esperada, s'hauria introduït una millora de manera involuntària.

L'exemple de l'hormona del creixement, tot i no ser del camp de l'edició genòmica, il·lustra la dificultat de separar clarament prevenció, teràpia i millora. Inicialment, el tractament amb hormona de creixement es restringia a aquelles persones amb nivells d'hormona inferior als normals. Més endavant, es va ampliar a les persones amb una estatura inferior al primer percentil d'altura per la seva edat, independentment dels nivells naturals de l'hormona en l'individu. Fins i tot, d'altres amb altura normal van utilitzar l'hormona de creixement per millorar la seva força i altura per sobre la mitjana. El fet que l'hormona de creixement se sol administrar a infants, massa joves per prendre decisions per si mateixos, s'afegeix a la complexitat de l'assumpte. Actualment, l'ús de l'hormona de creixement s'ha regulat estrictament i tan sols es permet si els nivells d'hormona són inferiors als normals o si l'altura és significativament inferior a la normal. Aquest ús per si sol requereix decisions complexes, ja que no està clar que la baixa estatura sigui una condició a tractar i més tenint en compte els possibles efectes adversos del tractament amb hormona de creixement.¹¹²

De manera similar, és possible que en un futur llunyà l'edició genòmica permeti alterar caràcters complexos per als quals encara no coneixem bé les bases biològiques i genètiques. Alguns exemples podrien ser la intel·ligència, els trets facials i la capacitat esportiva. El debat sobre els aspectes positius i negatius de la millora genètica d'aquestes característiques és un tema actiu de discussió en bioètica. Alguns filòsofs com Michael Sandel s'oposen a la millora genètica d'embrions, justificant que incrementaria les desigualtats entre els qui hi tenen accés i els que no, la qual cosa afegiria desigualtats biològiques a les socials que existeixen avui dia. A més, critiquen que pressionaria en excés tots els qui hi tinguessin accés a optar per la millora en comptes de l'opció natural.¹¹⁵ D'altres, com Julian Savulescu, justifiquen la millora genètica d'embrions igualant-ho amb l'ús de fàrmacs o participació en activitats extraescolars que milloren les capacitats cognitives i esportives dels infants, i alguns indiquen, fins i tot, que els progenitors tenen l'obligació moral de proporcionar la millor vida possible als seus descendents.¹¹⁶ En qualsevol cas, és important que hi hagi un debat plural i divers sobre la millora de les qualitats humanes utilitzant les tècniques d'edició genètica abans no sigui massa tard.¹¹⁷

8. IMPLICACIONS ECONÒMIQUES, LEGALS, ÈTIQUES I SOCIALS

Les aplicacions de les tècniques d'edició genòmica transcendeixen arreu dels dominis de les ciències de la vida. Així mateix, el seu potencial transformador impacta la societat en l'àmbit econòmic, ètic i cultural. Es preveu que aquest impacte vagi encara més enllà a mesura que se solucionin els problemes tècnics i es desenvolupin noves aplicacions basades en aquestes tècniques. Per això, és essencial començar a discutir l'impacte d'aquestes tècniques per assegurar que les millores introduïdes i la transformació de la societat sigui beneficiosa per a tots i eviti els possibles riscos que se'n puguin derivar. Com que la regulació legal de les tècniques d'edició genòmica en l'alimentació i l'agricultura s'han discutit anteriorment, aquesta secció se centra en l'impacte econòmic d'aquestes tècniques, la disputa per la patent de CRISPR-Cas9, l'impacte social de l'edició de la línia germinal i la seva percepció pública.

8.1. PANORAMA DE LES PATENTS DERIVADES DEL CRISPR-Cas9

Les tècniques d'edició genòmica es poden aplicar a gairebé totes les indústries que involucren sistemes biològics. A més, el seu ús clínic com a teràpies gèniques promet oferir la cura d'un bon nombre de malalties greus ben aviat. Juntament amb la resta d'avenços actuals en el camp de la biotecnologia, es preveu que els anys vinents s'hi observarà una biorevolució que transformarà l'agricultura, la salut i que incorporarà organismes vius en la creació de materials i energia. Les indústries que treballin en aquests camps podrien rebre un 30 % del total de la inversió privada en recerca i desenvolupament.¹¹⁸ Si bé a la propera dècada la majoria d'inversió es dedicarà a aplicar el coneixement biològic obtingut per les òmiques, gràcies a les tècniques d'anàlisi de dades i d'intel·ligència artificial, es calcula que els propers vint anys la importància de les tècniques d'edició genòmica els faci passar a captar del 30 % d'inversions al 70 %.¹¹⁸ Tot això acompanyat d'una

crescuda de l'impacte econòmic anual total de la bioindústria, que d'aquí a vint o trenta anys podria créixer d'1 bilió a 4 bilions (milions de milions) de dòlars nord-americans (figura 12).

Vist l'impacte econòmic que les tècniques d'edició genòmica podrien tenir en els anys que venen, les patents que asseguren l'exclusivitat del seu ús comercial tenen una importància cabdal. El procediment de patentar productes i tècniques biològiques difereix arreu del món. A la Unió Europea es poden patentar seqüències genètiques, encara que siguin naturals, sempre que s'indiqui l'ús i l'aplicació industrial. Als Estats Units, en canvi, no es poden patentar seqüències genètiques idèntiques a les que es troben a la natura, ja que es considera que el seu descobriment no és cap creació ni novetat perquè ja es trobaven a la natura.

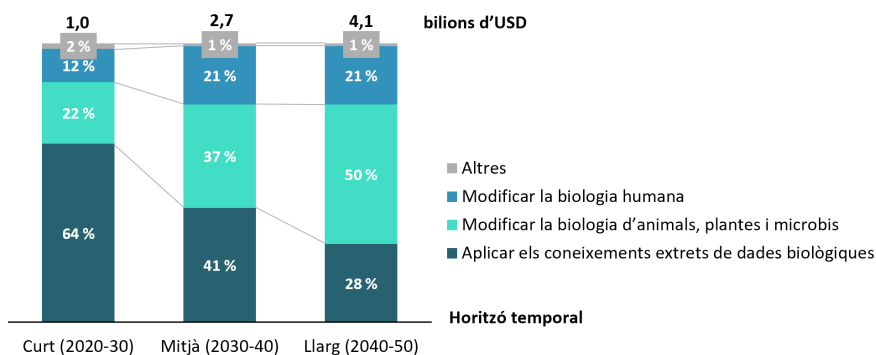


FIGURA 12. Distribució de l'impacte econòmic de les aplicacions biològiques segons la plataforma tecnològica. L'impacte total de les indústries basades en processos biològics creixeria d'un bilió a quatre bilions de dòlars nord-americans. Les aplicacions basades en el coneixement de dades biològiques representen la major part de l'impacte econòmic creat a curt termini, però les aplicacions basades en edició genòmica passarien de representar el 30 % del total al 70 % de l'impacte econòmic en un termini de vint a trenta anys. Adaptada de McKinsey Global Institute, 2020.¹¹⁸

Per tant, pel que fa al sistema CRISPR-Cas9, a Europa es podria patentar el gen que codifica l'enzim Cas9 tal com es troba a la natura si s'indica la seva aplicació industrial. En contrast, als Estats Units només es poden patentar els mètodes i components modificats específicament respecte a la seva forma natural per tal que el gen desenvolupi l'aplicació industrial patentada. El cas de les primeres patents de CRISPR-Cas9 als Estats Units involucra una disputa entre els dos actors principals de l'adaptació de CRISPR-Cas9 com a tècnica d'edició genètica que dura des del 2012. D'una banda, la patent sol·licitada per la Universitat de Califòrnia, a Berkeley, la Universitat de Viena i la científica Emmanuelle Charpentier (grup al qual se sol referir com a CVC) es basa en el treball de Jinek *et al.* publicat l'agost de 2012¹⁰ i demostra la fusió entre els

dos fragments d'RNA per formar el gRNA i l'ús de CRISPR-Cas9 per editar seqüències de DNA *in vitro*. De l'altra, la patent del Broad Institute, el MIT i el científic Feng Zhang (grup al qual se sol referir com a Broad) es basa en el treball de Cong *et al.* publicat el febrer de 2013¹² i patentava les modificacions del sistema CRISPR-Cas9 que permeten l'edició genòmica en eucariotes.

Tot i que la sol·licitud de patent de CVC es va fer el maig de 2012 i la del Broad el desembre de 2012, la patent del Broad es va concedir primer (l'abril de 2014) perquè el Broad havia sol·licitat la tramitació ràpida de la seva sol·licitud. Als Estats Units, quan dos grups d'inventors reclamen invencions que s'encavallen, té prioritat l'inventor que pugui demostrar que va ser el primer que va portar a la pràctica l'invent. Per això, el 2015, la CVC va demanar que es declarés una interferència entre la seva patent i la del Broad, justificant que l'edició de cèl·lules eucariotes és una extensió òbvia de la seva feina demostrant l'edició *in vitro* de DNA purificat i que, a més, la CVC havia plantejat l'edició en eucariotes abans que el Broad. La resolució de la interferència el 2017 va determinar que els clams de les dues patents es refereixen a dues invencions diferents (la patent de la CVC, a la creació del gRNA, i la del Broad, a l'adaptació de CRISPR-Cas9 per editar cèl·lules eucariotes) i que, per tant, l'adaptació de Cas9 per usar en cèl·lules eucariotes no és òbvia a partir de la feina feta per la CVC. Aleshores, la CVC va aportar nous clams que van derivar a declarar una segona interferència. Aquest cop, la junta d'avaluació es va centrar a comparar quin grup té l'evidència experimental més clara de la primera demostració que CRISPR-Cas9 funciona en cèl·lules eucariotes. El 10 de setembre de 2020, la junta va concedir prioritat a la patent del Broad perquè les evidències indiquen que van ser els primers. Tot i això, la CVC encara és a temps d'aportar més evidències per tal que la decisió canviï. De moment, però, tot fa pensar que el Broad aconseguirà mantenir la patent d'edició de cèl·lules eucariotes amb CRISPR-Cas9 i la CVC tindrà una patent menys específica dels usos de CRISPR *in vitro*.¹¹⁹

Al final, la importància pràctica de la decisió sobre aquestes patents en concret pot ser relativament baixa. Les innovacions relacionades amb CRISPR-Cas9 s'han anat diversificant en composicions alterades i usos nous que s'han patentat per separat, la qual cosa ha format un panorama de patents entorn CRISPR molt complex. Així, un bon nombre de les aplicacions comercials de les tècniques d'edició genòmica depenen de patents que no són les que estan en disputa entre el Broad i la CVC. A més, el panorama de patents relacionades amb CRISPR canvia molt a Europa (on la CVC té la prioritat sobre la patent original) i altres regions del món.

L'accés a les tecnologies d'edició genòmica relacionades amb CRISPR depèn en part del sistema de patents. Per això, la idea de patentar invencions desenvolupades en universitats a partir de finançament públic (com CRISPR-

Cas9) ha despertat dubtes sobre si és correcte. D'altra banda, en alguns casos aquestes patents són la base d'invençions biotecnològiques que acaben resultant en productes i serveis beneficiosos per a la societat. El repte és trobar el balanç entre proporcionar prou llibertat i transparència per promoure l'avenç de la investigació científica alhora que mantenir cert grau de control per incentivar la innovació privada i el desenvolupament comercial. L'objectiu del programa de patents de les universitats no ha de ser generar el màxim de beneficis sinó integrar-lo a la seva missió social i econòmica.

En la pràctica, això es tradueix en regulacions diferents segons el propòsit de l'ús de la tècnica. Pel que fa a recerca acadèmica i sense ànim de lucre, les institucions inventores solen compartir els materials biològics creats lliurement a través d'Addgene, una organització sense ànim de lucre. Ara bé, els usos comercials i en recerca privada estan regulats per patents. El Broad ha concedit llicències d'ús exclusiu per a aplicacions terapèutiques a Editas i altres *spin-offs* (empreses derivades) creades pel mateix institut. Similarment, la CVC ha concedit llicències d'ús exclusiu a la seva *spin-off* Caribou Biosciences. Aquestes *spin-offs*, al seu torn, proporcionen subllicències per a aplicacions concretes a diverses empreses no associades a la universitat.

El fet que les *spin-offs* amb llicències exclusives concedides per la universitat no es dediquin tan sols a proporcionar subllicències a altres empreses i, en canvi, tinguin com a objectiu desenvolupar nous productes a partir de les llicències podria limitar l'accés a aquestes tecnologies.¹²⁰ Després que aquest sistema fos criticat per endarrerir teràpies, les universitats comencen a proporcionar llicències no exclusives a altres empreses directament (sense una altra empresa com a intermediària) per tal d'accelerar la innovació en aquest sector.

8.2. CONSEQÜÈNCIES SOCIALS I ÈTIQUES DE L'EDICIÓ GENÒMICA EN HUMANS

Les implicacions de l'edició genòmica en humans canvien enormement segons el seu objectiu i la cèl·lula editada, així que cal distingir tres possibilitats ben diferents. En primer lloc, hi ha l'edició genòmica en cèl·lules somàtiques, que s'està utilitzant de manera regulada tant en recerca com en teràpia. En segon lloc, hi ha l'edició en embrions o cèl·lules germinals humanes. Aquesta, s'ha aprovat per a recerca en embrions sobrants de processos de fecundació *in vitro* i amb restriccions estrictes sobre el nombre de dies de desenvolupament embrionari permesos. En canvi, no es permet el seu ús en teràpia per problemes tècnics i socials. Tot i això, el novembre de 2018 He Jiankui va anunciar el naixement dels primers nadons modificats genèticament amb CRISPR-Cas9 en un experiment polèmic i que va comportar conseqüències legals, penat amb presó i multa per mala praxi. Finalment, hi ha la possibilitat d'aplicar les tècniques d'edició

genòmica per millorar l'espècie humana, que en el futur podria ser factible per alterar trets físics i, fins i tot, qualitats com la intel·ligència. Mentre que l'edició somàtica no representa més problemes ètics que aquells derivats de l'accés desigual a aquest tipus de teràpies, l'edició de la línia germinal per a teràpia i l'edició per a la millora de qualitats humanes comporten un seguit de conseqüències ètiques que es comenten a continuació.

Un dels reptes que planteja l'edició de la línia germinal és trobar el balanç adequat entre els beneficis individuals i els riscos socials i cultural. Per això, cal estimar els beneficis que aquestes tècniques comportarien als pares que decidissin utilitzar-les i als seus descendents en contra els riscos a ells mateixos i la societat en conjunt. Aquesta tasca és complexa, ja que els beneficis i riscos individuals són més immediats i específics, mentre que els efectes culturals, socials i en la percepció pública són més difusos, alguns d'ells estrictament filosòfics.

En l'àmbit individual, els riscos són en gran part tècnics, com el mosaïcisme i la incertesa de les possibles conseqüències de les variants genòmiques introduïdes. Aquest darrer punt és menys important en l'edició per teràpia, ja que per restaurar el funcionament normal de l'organisme se solen introduir variants genòmiques presents de manera natural a la població i les conseqüències de les quals, per tant, es coneixen o es poden estudiar. En canvi, quan es tracta de millorar les qualitats humanes, es podria arribar al punt que s'introdueixin variants genòmiques inexistents de manera natural i que podrien comportar conseqüències inesperades en el conjunt de l'organisme. Es tracta de caràcters complexos, la base genètica dels quals no es coneix prou bé. Fins i tot, és possible que, a causa de la complexitat dels trets humans, les millores anessin associades a un risc (*e. g.*, s'introduiria una modificació genètica que apuja el coeficient intel·lectual en trenta punts sabent que també incrementa el risc de patir un infart en un 20 %? O una mutació que incrementa la massa muscular però en un 15 % dels casos resulta en un deteriorament sever de les funcions cognitives?).¹¹⁷ En aquests casos, les decisions que haurien de prendre els pares sobre si acceptar la millora o no serien complexes. El consentiment dels descendents modificats genèticament també pot resultar problemàtic, ja que la modificació de la línia germinal requeriria assajos clínics a llarg termini que afecten múltiples generacions i requeririen el consentiment de tots ells (molts encara no nascuts) per poder seguir endavant.

En l'àmbit social, els reptes més grans són l'accés limitat als processos de tractament o millora genètica, les desigualtats que podrien comportar i el sentit moral del procés en si mateix. Cal reconèixer que, almenys inicialment, el procés de millora germinal tindria un cost elevat i només estaria disponible en algunes regions del món. Per això, alguns opinen que se sumaria a les

desigualtats socials que actualment ja causen l'accés desigual a les vacunes i a una bona alimentació. D'altres, pensen que inicialment l'accés seria restringit però que el preu baixaria progressivament fins a convertir-se en accessible per a tothom i que això, de fet, crearia una societat més igualitària en oferir un tractament per a aquells qui tenen trets que els situen a ells i als seus descendents en desavantatge. Fins i tot, argumenten que beneficiaria la salut pública en disminuir la prevalença de malalties greus com la distròfia muscular o la malaltia de Huntington, i que hi ha raons morals per modificar el genoma humà, fins i tot en casos de millorament.¹²¹

Les conseqüències socials podrien anar més enllà. Encara que es limiti a prevenir malalties serioses o discapacitats, l'ús de les tècniques d'edició genòmica desperta la preocupació que decisions voluntàries i individuals poden provocar canvis socials respecte a l'acceptació de discapacitats menys severes. Alguns membres de la comunitat de discapacitats indiquen que la prevenció (bé sigui a través del diagnòstic prenatal o l'edició genòmica) sembla reflectir la idea que les persones amb discapacitats són un problema per a les que els envolten i que evitar les discapacitats és una prioritat del sistema sanitari, cosa que exagera les dificultats que algunes discapacitats comporten. Altres membres reclamen que, si aquestes tècniques s'utilitzen per prevenir discapacitats, les polítiques que faciliten la seva inclusió i l'accessibilitat al món perdran suport en disminuir el nombre de persones amb discapacitats.

Una altra de les posicions socials en contra de l'edició de la línia germinal és la preferència per un genoma «natural» i «humà», sovint associada a la crítica que modificar els gens és «jugar a ser Déu». Aquesta darrera visió neix de l'opinió que els humans no tenim l'omnisciència divina que faria falta per fer canvis al genoma de manera segura o beneficiosa. Aquest argument implica la idea que les alteracions naturals i l'evolució són menys problemàtiques que la intervenció humana, encara que puguin fer el mateix: hi ha una visió «sacralitzada» del genoma, com si fos quelcom superior a la mateixa humanitat. Tot i això, es pot argumentar que les alteracions naturals són aleatòries mentre que les humanes es podrien limitar a una regió de la qual s'ha estudiat la seguretat, així que les naturals tenen més potencial per causar conseqüències no desitjades. A més, el genoma humà no és del tot «humà» perquè inclou DNA d'altres espècies (entre ells molts virus i una petita proporció de neandertal) i, com que canvia constantment, cada genoma és únic i no és compartit per tota la humanitat (vegeu el resum *La dinàmica natural dels genomes en evolució* al final de l'informe).

Les religions també tenen punts de vista diferents sobre l'edició genòmica. En la cristiana, el grau en què l'ésser humà hauria d'intervenir en la natura és un tema actiu de discussió. En la jueva, en canvi, hi ha l'obligació explícita de construir un món beneficiós per a les persones, així que les millores

genòmiques es veuen com una col·laboració positiva entre Déu i els humans, més que una interferència amb la creació. De manera similar, la musulmana i la budista consideren l'edició genòmica com una invenció més que redueix el sofriment que provoquen les malalties.¹¹²

Finalment, les aplicacions actuals de l'edició genòmica han rebut crítiques basades en l'argument del «pendent relliscós» (*slippery slope*), que argumenta que començar el camí de l'edició genòmica comporta el risc de no aturar-se en la producció de canvis i acabar recorrent totes les fases progressivament. Així, al principi s'acceptarien correccions terapèutiques i, a mesura que aquesta aplicació guanyi acceptació, es facilitaria el pas a la següent fase i així successivament fins a arribar a normalitzar la millora humana.¹²² D'altra banda, altres justifiquen que prohibir les tècniques en base a un «pendent relliscós» és un error, ja que la trajectòria d'acceptació progressiva és incerta i insuficient per justificar el bloqueig de les primeres etapes i, a més, es pot prevenir el pas a etapes següents imposant mesures fermes. I a més, serà responsabilitat d'altres temps futurs, que poden tenir concepcions diferents de les actuals.

Tenint en compte les conseqüències socials de les tècniques d'edició genòmica i l'estat de la tècnica, l'Observatori de Bioètica i Dret de la Universitat de Barcelona va publicar un document el 2016 que recomana prendre una posició gradualista emmarcada en el principi de precaució.¹²³ Així, indica que «en l'acceptació de les tècniques d'edició genòmica s'ha de procedir per passos: permetre la recerca bàsica, aprovar-ne l'ús terapèutic en cèl·lules somàtiques, avaluar la possibilitat d'aprovar la teràpia germinal en certs casos i aturar-ne l'ús per al millorament humà». En especial, subratlla la importància d'aturar l'ús del millorament a l'espera de dades de les dues fases prèvies i d'una reflexió seriosa dels riscos i beneficis basada en evidències de les fases anteriors. Sobre l'argument del «pendent relliscós» indica que fer-ne cas «comporta en si mateix el risc de restringir l'avenç científic i l'accés als beneficis que aquestes tecnologies puguin oferir en el futur».

Finalment, l'informe destaca la importància de «la implicació dels mitjans de comunicació i la ciutadania en general en un debat inclusiu, anticipatiu i informat». El debat ha de ser públic i incloure ciutadans, científics (amb finançadors de recerca i empreses biotecnològiques), els responsables de fer polítiques públiques i els mitjans de comunicació. Aquests darrers han de procurar ser curosos en transmetre els avenços científics per evitar alarmismes i expectatives exagerades sobre les seves bondats. Els i les científiques, per la seva banda, cal que donin especial importància a les repercussions socials dels seus avenços i treballin per mitigar els riscos que comporten. Així mateix, són els responsables de fer partícip la ciutadania en la seva recerca en la mesura que puguin i els responsables últims de donar a conèixer els seus avenços de manera rigorosa, clara i entenedora.

BIBLIOGRAFIA

1. CAPECCHI, M. R. «Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century». *Nat. Rev. Genet.*, 6 (2005), p. 507-512.
2. McVEY, M.; LEE, S. E. «MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings». *Trends in Genetics*, 24 (2008), p. 529-538.
3. STODDARD, B. L. «Homing endonuclease structure and function». *Quart. Rev. Biophys.*, 38 (2005), p. 49-95.
4. MONTOLIU, L. «What is CRISPR-Cas9?». A: *The CRISPR page at CNB* [en línia]. 2019. <<http://wwwuser.cnb.csic.es/~montoliu/CRISPR/#1>>.
5. MAEDER, M. L. [et al.]. «Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification». *Molecular Cell*, 31 (2008), p. 294-301.
6. BOCH, J. «TALEs of genome targeting». *Nat. Biotechnol.*, 29 (2011), p. 135-136.
7. BEUMER, K. J.; CARROLL, D. «Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*». *Methods*, 68 (2014), p. 29-37.
8. SANDER, J. D. [et al.]. «Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs». *Nat. Biotechnol.*, 29 (2011), p. 697-698.
9. HAUN, W. [et al.]. «Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family». *Plant Biotechnol. J.*, 12 (2014), p. 934-940.
10. JINEK, M. [et al.]. «A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity». *Science*, 337 (2012), p. 816-821.

11. MALI, P. [et al.]. «RNA-guided human genome engineering via Cas9». *Science*, 339 (2013), p. 823-826.
12. CONG, L. [et al.]. «Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems». *Science*, 339 (2013), p. 819-823.
13. MOJICA, F. J. M.; FERRER, C.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. «Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning». *Molecular Microbiology*, 17 (1995), p. 85-93.
14. MOJICA, F. J. M.; GARRETT, R. A. «Discovery and seminal developments in the CRISPR field». A: BARRANGOU, R.; OOST, J. van der (ed.). *CRISPR-Cas systems: RNA-mediated adaptive immunity in Bacteria and Archaea*. [S. ll.]: Springer, 2013, p. 1-31. DOI: 10.1007/978-3-642-34657-6_1.
15. MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. «Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements». *J. Mol. Evol.*, 60 (2005), p. 174-182.
16. BARRANGOU, R. [et al.]. «CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes». *Science*, 315 (2007), p. 1709-1712.
17. MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. «CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA». *Science*, 322 (2008), p. 1843-1845.
18. GARNEAU, J. E. [et al.]. «The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA». *Nature*, 468 (2010), p. 67-71.
19. DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. «The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9». *Science*, 346 (2014).
20. SLAYMAKER, I. M. [et al.]. «Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity». *Science*, 351 (2016), p. 84-88.
21. DOENCH, J. G. [et al.]. «Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9». *Nat. Biotechnol.*, 34 (2016), p. 184-191.
22. KOMOR, A. C.; KIM, Y. B.; PACKER, M. S.; ZURIS, J. A.; LIU, D. R. «Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage». *Nature*, 533 (2016), p. 420-424.
23. GAUDELLI, N. M. [et al.]. «Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage». *Nature*, 551 (2017), p. 464-471.
24. ANZALONE, A. V. [et al.]. «Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA». *Nature*, 576 (2019), p. 149-157.

25. ADLI, M. «The CRISPR tool kit for genome editing and beyond». *Nature Communications*, 9 (2018), art. 1911.
26. YOUNG, J. K. [et al.]. «The repurposing of type I-E CRISPR-Cascade for gene activation in plants». *Communications Biology*, 2 (2019), p. 1-7.
27. KLOMPE, S. E.; VO, P. L. H.; HALPIN-HEALY, T. S.; STERNBERG, S. H. «Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration». *Nature*, 571 (2019), p. 219-225.
28. KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. «Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems». *Curr. Opin. Microbiol.*, 37 (2017), p. 67-78.
29. SHALEM, O. [et al.]. «Genome-Scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells». *Science*, 343 (2014), p. 84-87.
30. SANJANA, N. E. «Genome-scale CRISPR pooled screens». *Analytical Biochemistry*, 532 (2017), p. 95-99.
31. CANVER, M. C. [et al.]. «Variant-aware saturating mutagenesis using multiple Cas9 nucleases identifies regulatory elements at trait-associated loci». *Nat. Genet.*, 49 (2017), p. 625-634.
32. ZHANG, R. [et al.]. «A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses». *Nature*, 535 (2016), p. 164-168.
33. PETERS, J. M. [et al.]. «A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria». *Cell*, 165 (2016), p. 1493-1506.
34. GARRETA, E.; MARCO, A.; IZPISÚA BELMONTE, J. C.; MONTSERRAT, N. «Genome editing in human pluripotent stem cells: a systematic approach unrevealing pancreas development and disease». *Stem Cell Investigation*, 4 (2016), p. 1-4.
35. VOLPATO, V.; WEBBER, C. «Addressing variability in iPSC-derived models of human disease: guidelines to promote reproducibility». *Disease Models & Mechanisms*, 13 (2020).
36. LIU, G.-H. [et al.]. «Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2». *Nature*, 491 (2012), p. 603-607.
37. BEN JEHUDA, R.; SHEMER, Y.; BINAH, O. «Genome editing in induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9». *Stem Cell Rev. and Rep.*, 14 (2018), p. 323-336.
38. HOCKEMEYER, D.; JAENISCH, R. «Induced pluripotent stem cells meet genome editing». *Cell Stem Cell*, 18 (2016), p. 573-586.
39. LIU, C.; OIKONOMOPOULOS, A.; SAYED, N.; WU, J. C. «Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond». *Development*, 145 (2018).

40. ARTEGIANI, B. [et al.]. «Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing». *Nature Cell Biology*, 22 (2020), p. 321-331.
41. MONTSERRAT, N.; GARRETA, E.; BELMONTE, J. C. I. «Regenerative strategies for kidney engineering». *The FEBS Journal*, 283 (2016), p. 3303-3324.
42. YUSA, K. [et al.]. «Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells». *Nature*, 478 (2011), p. 391-394.
43. WU, S. M.; HOCHEDLINGER, K. «Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine». *Nat. Cell Biol.*, 13 (2011), p. 497-505.
44. REDFERN, W. S. [et al.]. «Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development». *Cardiovasc. Res.*, 58 (2003), p. 32-45.
45. BRAAM, S. R. [et al.]. «Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes». *Stem Cell Res.*, 4 (2010), p. 107-116.
46. GABDOULLINE, R. [et al.]. «Differences in the early development of human and mouse embryonic stem cells». *PLOS ONE*, 10 (2015). DOI: e0140803.
47. PLAZA REYES, A.; LANNER, F. «Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos». *Development*, 144 (2017), p. 3-7.
48. ABDELAAL, A. S.; YAZDANI, S. S. «Development and use of CRISPR in industrial applications». A: SINGH, V.; PAWAN, K. D. (ed.). *Genome engineering via CRISPR-Cas9 system*. [S. ll.]: Elsevier, 2020, p. 177-197. DOI: 10.1016/B978-0-12-818140-9.00016-7.
49. SINGH, V.; DHAR, P. K. *Genome engineering via CRISPR-Cas9 system*. [S. ll.]: Academic Press, Elsevier, 2020.
50. YAO, R. [et al.]. «CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria». *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3 (2018), p. 135-149.
51. BIKARD, D. [et al.]. «Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials». *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014), p. 1146-1150.
52. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; LU, T. K. «CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects». *Int. Biol.*, 9 (2017), p. 109-122.

53. GOPHNA, U.; ALLERS, T.; MARCHFELDER, A. «Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox». *Trends in Microbiology*, 25 (2017), p. 430-432 .
54. DHAMAD, A. E.; LESSNER, D. J. «A CRISPRi-dCas9 system for archaea and its use to examine gene function during nitrogen fixation by *Methanosarcina acetivorans*». *bioRxiv* (2020). DOI: 10.1101/2020.06.15.153874.
55. ZHANG, G.-C. [et al.]. «Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease». *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (2014), p. 7694-7701.
56. DINAMARCA, J.; LEVITAN, O.; KUMARASWAMY G. K.; LUN, D. S.; FALKOWSKI, P. G. «Overexpression of a diacylglycerol acyltransferase gene in *Phaeodactylum tricornutum* directs carbon towards lipid biosynthesis». *Journal of Phycology*, 53 (2017), p. 405-414.
57. MEYER, R. S.; DUVAL, A. E.; JENSEN, H. R. «Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops». *New Phytol.*, 196 (2012), p. 29-48.
58. DOEBLEY, J. «The genetics of maize evolution». *Annu. Rev. Genet.*, 38 (2004), p. 37-59.
59. COMMITTEE ON GENETICALLY ENGINEERED CROPS. «Past experience and future prospects, board on agriculture and natural resources, division on earth and life studies & national academies of sciences, engineering, and medicine». A: *Genetically engineered crops: Experiences and prospects*. [S. Il.]: National Academies Press, 2016. DOI: 10.17226/23395.
60. ROYCHOWDHURY, R.; TAH, J. «Mutagenesis—A potential approach for crop improvement». A: HAKEEM, K. R.; AHMAD, P.; OZTURK, M. (ed.). A: *Crop improvement: New approaches and modern techniques*. [S. Il.]: Springer US, 2013, p. 149-187. DOI: 10.1007/978-1-4614-7028-1_4.
61. FAO/IAEA. *Mutant variety database* [recurs electrònic]. <<https://mvd.iaea.org>>.
62. ABBAS, M. S. T. «Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety». *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28 (2018), art. 52.
63. EFSA Panel on Genetically modified organisms (GMO). «Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function». *EFSA Journal*, 10 (2012), art. 2943.
64. BREITLER, J. C. [et al.]. «CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134 (2018), p. 383-394.

65. MODRZEJEWSKI, D. [et al.]. «What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map». *Environ Evid.*, 8 (2019), art. 27.
66. ZHANG, B. [et al.]. «A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces *Cryphonectria parasitica*-induced necrosis in a transgenic american chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay». *Transgenic Res.*, 22 (2013), p. 973-982.
67. KUMAR, R.; KAUR, A.; PANDEY, A.; MAMRUTHA, H. M.; SINGH, G. P. «CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects». *Mol. Biol. Rep.*, 46 (2019), p. 3557-3569.
68. LIU, C.-J.; CAI, Y.; ZHANG, X.; GOU, M.; YANG, H. «Tailoring lignin biosynthesis for efficient and sustainable biofuel production». *Plant Biotechnology Journal*, 12 (2014), p. 1154-1162.
69. WANG, T.; ZHANG, H.; ZHU, H. «CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops». *Horticulture Research*, 6 (2019), p. 1-13.
70. STEIN, A. J.; SACHDEV, H. P. S.; QAIM, M. «Potential impact and cost-effectiveness of golden rice». *Nature Biotechnology*, 24 (2006), p. 1200-1201.
71. WAHEED, M. T. [et al.]. «Need of cost-effective vaccines in developing countries: What plant biotechnology can offer?» *Springerplus*, 5 (2016).
72. ETHICS COUNCIL OF THE MAX PLANCK SOCIETY [et al.]. *Discussion paper focusing on the scientific relevance of genome editing and on the ethical, legal and societal issues potentially involved*, 2019.
73. GLOBUS, R.; QIMRON, U. «A technological and regulatory outlook on CRISPR crop editing». *J. Cell Biochem.*, 119 (2018), p. 1291-1298.
74. CALLAWAY, E. «CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union». *Nature*, 560 (2018), p. 16.
75. GROHMANN, L. [et al.]. «Detection and identification of genome editing in plants: challenges and opportunities». *Front. Plant Sci.*, 10 (2019).
76. ZHANG, D. [et al.]. «Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective». *Plant Biotechnology Journal*, 18 (2020), p. 1651-1669.
77. KOTWICA-ROLINSKA, J. [et al.]. «CRISPR/Cas9 genome editing introduction and optimization in the non-model insect *Pyrrhocoris apterus*». *Front. Physiol.*, 10 (2019).

78. ZUCKERMANN, M. [et al.]. «Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling». *Nat. Commun.*, 6 (2015).
79. HECKL, D. [et al.]. «Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing». *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014), p. 941-946.
80. PLATT, R. J. [et al.]. «CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling». *Cell*, 159 (2014), p. 440-455.
81. WHITELAW, C. B. A.; SHEETS, T. P.; LILICO, S. G.; TELUGU, B. P. «Engineering large animal models of human disease». *The Journal of Pathology*, 238 (2016), p. 247-256.
82. UMEYAMA, K. [et al.]. «Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts». *Sci. Rep.*, 6 (2016).
83. EUROPEAN PARLIAMENT. «Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Text with EEA relevance». *Official Journal of the European Union*, L 276 (2010).
84. DICKINSON, D. J.; GOLDSTEIN, B. «CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering». *Genetics*, 202 (2016), p. 885-901.
85. LIU, J. [et al.]. «CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling». *Hum. Genet.*, 136 (2017), p. 1-12.
86. KHAN, F. R.; ALHEWAIIRINI, S. S. «Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism». *Current Trends in Cancer Management* (2018). DOI: 10.5772/intechopen.81517.
87. ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. *World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision*. [S. ll.]: FAO, 2012.
88. BURKARD, C. [et al.]. «Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection». *Journal of Virology*, 92 (2018).
89. SÁNCHEZ-TORRES, C. [et al.]. «Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection». *Arch. Virol.*, 148 (2003), p. 2307-2323.
90. GAO, Y. [et al.]. «Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects». *Genome Biology*, 18 (2017), art. 13.

91. BHARATI, J. [et al.]. «Genome editing in animals: an overview». A: YASHPAL, S. M.; DEBMALYA, B.; AZEVEDO, V.; KHURANA, S. M. P. (ed.). *Genomics and biotechnological advances in veterinary, poultry, and fisheries*. [S. l.]: Elsevier, 2020, p. 75-104. DOI: 10.1016/B978-0-12-816352-8.00003-5.
92. GROSSMAN, M. R. «Genetically engineered animals in the United States: the AquAdvantage Salmon». *Eur. Food & Feed L. Rev.*, 11 (2016), p. 190-200.
93. GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; BEHBOODI, E.; MURRAY, J. D.; ANDERSON, G. B. «Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos». *Mol. Reprod. Dev.*, 48 (1997), p. 246-250.
94. YOUNG, A. E. [et al.]. «Genomic and phenotypic analyses of six offspring of a genome-edited hornless bull». *Nature Biotechnology*, 38 (2020), p. 225-232.
95. SHAFRAN, D.; KODISH, E.; TZAKIS, A. «Organ shortage: the greatest challenge facing transplant medicine». *World J Surg*, 38 (2014), p. 1650-1657.
96. YANG, L. [et al.]. «Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)». *Science*, 350 (2015), p. 1101-1104.
97. NIU, D. [et al.]. «Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9». *Science*, 357 (2017), p. 1303-1307.
98. LU, T.; YANG, B.; WANG, R.; QIN, C. «Xenotransplantation: current status in preclinical research». *Front. Immunol.*, 10 (2020).
99. PIÑA-AGUILAR, R. E. [et al.]. «Revival of extinct species using nuclear transfer: hope for the mammoth, true for the Pyrenean ibex, but is it time for “conservation cloning”?» *Cloning Stem Cells*, 11 (2009), p. 341-346.
100. SHULTZ, D. «Should we bring extinct species back from the dead?» *Science* (2016). DOI: 10.1126/science.aah7343.
101. NOBLE, C.; ADLAM, B.; CHURCH, G. M.; ESVELT, K. M.; NOWAK, M. A. «Current CRISPR gene drive systems are likely to be highly invasive in wild populations». *eLife* (2018), art. 7.
102. SCUDELLARI, M. «Self-destructing mosquitoes and sterilized rodents: the promise of gene drives». *Nature*, 571 (2019), p. 160-162.
103. SHAHRYARI, A. [et al.]. «Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders». *Front. Genet.*, 10 (2019).
104. DUNBAR, C. E. [et al.]. «Gene therapy comes of age». *Science*, 359 (2018).

105. LI, H. [et al.]. «Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects». *Sig. Transduct. Target Ther.*, 5 (2020), art. 1.
106. LI, C.; MEI, H.; HU, Y. «Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy». *Brief Funct Genomics*, 19 (2020), p. 175-182.
107. MULLARD, A. «Gene-editing pipeline takes off». *Nature Reviews Drug Discovery*, 19 (2020), p. 367-372.
108. ELVERUM, K.; WHITMAN, M. «Delivering cellular and gene therapies to patients: solutions for realizing the potential of the next generation of medicine». *Gene Therapy* (2019), p. 1-8. DOI: 10.1038/s41434-019-0074-7.
109. LEDFORD, H. «CRISPR gene editing in human embryos wreaks chromosomal mayhem». *Nature*, 583 (2020), p. 17-18.
110. LEDFORD, H. «CRISPR babies: when will the world be ready?». *Nature*, 570 (2019), p. 293-296.
111. LEDFORD, H. «‘CRISPR babies’ are still too risky, says influential panel». *Nature* (2020). DOI: 10.1038/d41586-020-02538-4.
112. COMMITTEE ON HUMAN GENE EDITING: SCIENTIFIC, MEDICAL, AND ETHICAL CONSIDERATIONS; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES; NATIONAL ACADEMY OF MEDICINE; NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. [S. ll.]: National Academies Press, 2017. DOI: 10.17226/24623.
113. CYRANOSKI, D. «The CRISPR-baby scandal: what’s next for human gene-editing». *Nature*, 566 (2019), p. 440-442.
114. DENNIS, C. «Deaf by design». *Nature*, 431 (2004), p. 894-896.
115. SANDEL, M. J. «The case against perfection». *The Atlantic* (abril 2004).
116. SAVULESCU, J.; BOSTROM, N. *Human enhancement*. [S. ll.]: Oxford Univ. Press, 2010.
117. MURRAY, T. H. «Reflections on the ethics of genetic enhancement». *Genetics in Medicine*, 4 (2002), p. 27-32.
118. MCKINSEY GLOBAL INSTITUTE [et al.]. *The bio revolution: Innovations transforming economies, societies, and our lives*. [en línia]. 2020. <<https://www.mckinsey.com/industries/pharmaceuticals-and-medical-products/our-insights/the-bio-revolution-innovations-transforming-economies-societies-and-our-lives>>.

119. COHEN, J. «The latest round in the CRISPR patent battle has an apparent victor, but the fight continues». *Science* (2020). DOI: 10.1126/science.abe7573.
120. EGELIE, K. J.; GRAFF, G. D.; STRAND, S. P.; JOHANSEN, B. «The emerging patent landscape of CRISPR–Cas gene editing technology». *Nature Biotechnology*, 34 (2016), p. 1025-1031.
121. GYNGELL, C.; BOWMAN-SMART, H.; SAVULESCU, J. «Moral reasons to edit the human genome: picking up from the Nuffield report». *Journal of Medical Ethics*, 45 (2019), p. 514-523.
122. FRIEDMANN, T. «Genetic therapies, human genetic enhancement, and... eugenics?» *Gene Therapy*, 26 (2019), p. 351-353.
123. SANTALÓ, J.; CASADO, M. *Document sobre bioètica i edició genòmica en humans*. [Barcelona]: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2016.

10. RESUMS DE LES PRESENTACIONS DEL CICLE DE CONFERÈNCIES

10.1. PER QUÈ L'EDICIÓ GENÈTICA HA REVOLUCIONAT LA BIOLOGIA?

LLUÍS MONTOLIU. Centro Nacional de Biotecnología
(CNB), Madrid

16 de setembre de 2019

Modificar la informació genètica d'un organisme viu per canviar-ne les característiques és possible. Mitjançant diverses tècniques d'edició genètica, podem seleccionar una regió del genoma i alterar-la. En el futur, aquests mètodes podrien servir per curar malalties, però, actualment, encara no són prou segurs per fer-los servir en humans.

El DNA es troba al nucli de les cèl·lules eucariotes en forma de doble cadena. El conjunt de DNA d'un organisme s'anomena *genoma*, i una regió concreta d'aquest genoma, que conté una informació determinada, s'anomena *gen*. Per poder editar un gen, primer de tot el que necessitem és localitzar-lo dins del genoma. En el cas de CRISPR-Cas9, que és la tècnica d'edició genètica que més s'utilitza avui en dia, una molècula d'RNA fa de guia i busca el gen que volem trobar. Un cop localitzat, la proteïna Cas talla la doble cadena de DNA i s'introdueixen les modificacions que ens interessin. La mateixa maquinària cel·lular completa la seqüència i torna a tancar la doble hèlix.

L'edició genètica en general, i CRISPR en particular, és molt útil per fer recerca al laboratori, ja que permet generar models animals de manera molt senzilla. Així, per investigar una malaltia humana causada per una alteració en un gen determinat, podem copiar la mateixa alteració genètica en un animal i fer-lo servir per provar tractaments. Fins i tot es poden crear avatars animals

d'una persona concreta i estudiar de manera específica quin és el millor tractament per a ella. En el camp de la biotecnologia, també pot ser molt útil, ja que pot permetre augmentar la producció d'animals i vegetals, o adaptar òrgans animals perquè puguin ser trasplantables a humans.

Abans de CRISPR-Cas9 ja hi havia altres tècniques d'edició, com els dits de zinc o les meganucleases, però CRISPR és la que permet fer-ho de manera més precisa, econòmica i senzilla. Totes aquestes tècniques van descobrir-se a partir d'estudiar microorganismes que les utilitzen com a estratègia de defensa davant infeccions víriques. Actualment, s'estan investigant gran varietat de bacteris amb l'objectiu de trobar tècniques encara més eficients que CRISPR, ja que té algunes limitacions. La primera és que pot ser que s'equivoqui a l'hora de localitzar el gen i en canviï un altre que no sigui el que ens interessa, i la segona, que només actuï sobre el genoma d'algunes cèl·lules i en d'altres no, fent que l'organisme presenti un fenomen anomenat *mosaicisme*.

Per tot això, encara caldrà esperar un temps per poder fer servir CRISPR en terapèutica humana de manera segura. L'any passat, a la Xina, es van modificar embrions humans de dues bessones perquè no s'infectessin del virus del VIH, del qual el pare era portador. Aquest tractament, però, va ser irresponsable, ja que no era la millor alternativa de la qual es disposava (risc de mosaicisme, possibilitat d'alterar els gens del costat, etc.). També, s'estan duent a terme diversos estudis clínics *ex vivo*, en què s'extreuen cèl·lules de pacients, es modifiquen i es tornen a introduir. Aquesta opció seria més segura, però de moment no se n'han vist resultats prometedors.

L'Associació europea ARRIGE treballa perquè es reguli l'ús i la comercialització de les eines per fer edició genètica, i perquè es plantegin les qüestions ètiques que es deriven de la seva utilització. A Espanya, la llei permet fer servir aquestes tècniques només per fer recerca dirigida a prevenir o curar malalties, i no per millorar capacitats, però cada país té la seva legislació. A més, el fet que es puguin comprar els components per internet pot donar lloc que se'n faci un mal ús.

Bibliografia

MONTOLIU, LLUÍS. *Editando genes: recorta, pega y colorea*. [S. ll.]: Next Door, 2019.

10.2. L'EDICIÓ EN CÈL·LULES SOMÀTIQUES I CÈL·LULES MARE PLURIPOTENCIALS. APLICACIONS TERAPÈUTIQUES

NÚRIA MONTSERRAT. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), The Barcelona Institute of Technology (BIST), Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Madrid

16 de desembre de 2019

Les cèl·lules mare pluripotencials, derivades a partir d'embrions humans o obtingudes de manera artificial mitjançant reprogramació somàtica, tenen la capacitat de donar lloc a totes les cèl·lules del nostre organisme. Aquesta propietat inherent, anomenada *pluripotència*, ha sigut explotada durant dues dècades per tal de generar coneixement fonamental en el camp del desenvolupament i la regeneració d'òrgans. I és que en els darrers anys, diversos estudis han pogut demostrar que és possible emular les instruccions que les cèl·lules mare embrionàries reben durant el desenvolupament. D'aquesta manera, s'ha pogut descriure quins són els senyals bioquímics i, en alguns casos, físics que dicten l'especificació dels teixits i el seu correcte desenvolupament.

Aquest coneixement combinat amb l'enginyeria genètica ha fet possible que en la placa de cultiu ara es puguin derivar de manera artificial cèl·lules en què es poden introduir mutacions genètiques específiques de pacients i generar plataformes per realitzar aplicacions en medicina de precisió. Al mateix temps, quan les cèl·lules reprogramades de pacients se sotmeten a edició genètica, podem corregir les mutacions i establir plataformes «pacientoespecífiques» per a aplicacions en medicina personalitzada.

Donat que ara les investigadores i investigadors podem també generar microòrgans a partir de les cèl·lules mare pluripotencials, en l'actualitat, la combinació de les tecnologies d'edició genètica conjuntament amb aquesta tecnologia està obrint les portes a estudis per tal d'estudiar mecanismes més complexos en l'àmbit multicel·lular. En aquest sentit, l'aplicació de tecnologies pròpies de la bioenginyeria, tals com la bioimpresió 3D o els sistemes de microfluídica, estan donant lloc a la generació de microòrgans o organoides que presenten característiques i funcions complexes. En la nostra xerrada parlarem de com totes aquestes troballes estan acostant l'aplicació de tot aquest coneixement fonamental a la pràctica clínica.

10.3. L'EDICIÓ EN CÈL·LULES SOMÀTIQUES. APLICACIONS TERAPÈUTIQUES

ÁNGEL RAYA. Professor d'investigació ICREA, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

16 de desembre de 2019

Si bé des del punt de vista tècnic l'edició del genoma en cèl·lules de línies somàtiques o germinals pot no presentar grans diferències, les conseqüències i implicacions d'ambdues manipulacions difereixen radicalment. Un canvi en el genoma de qualsevol cèl·lula somàtica tan sols es propaga a la seva descendència, la qual cosa dona lloc, quan el procés es porta a terme en una persona (com en el cas de la teràpia gènica que es comenta a continuació), a un òrgan o teixit mosaic, en el sentit que conté tant cèl·lules modificades com no modificades. En qualsevol cas, la persistència de la modificació estarà limitada, com a màxim, a la duració de la vida de l'individu. Per contra, la manipulació del genoma d'una cèl·lula germinal tindrà com a resultat que totes les cèl·lules de l'individu que se'n derivin tindran la manipulació, incloent-hi les seves cèl·lules germinals (o, almenys, la meitat), motiu pel qual la manipulació serà transmesa a la seva descendència. En aquesta presentació tractarem fonamentalment l'edició genètica de cèl·lules somàtiques i les seves implicacions terapèutiques, i deixarem per a un altre moment les associades a l'edició de cèl·lules germinals.

Tècnicament, la introducció de gens «extra» en el genoma d'una cèl·lula és relativament senzilla. Aquests gens «extra» es coneixen com a transgens, i els organismes que els contenen, transgènics. La tecnologia que permet la generació d'organismes transgènics es va desenvolupar al laboratori a principis dels 1980 (Brinster *et al.*, 1981; Costantini i Lacy, 1981; Gordon i Ruddle, 1981) utilitzant ratolins. Mitjançant aquesta tecnologia, la injecció dels transgens (en forma de DNA nu) en embrions de ratolí molt primerencs, quan encara tenen una sola cèl·lula, fa que s'integrin a l'atzar en el genoma de les cèl·lules de l'animal. En la majoria dels casos, l'animal és un mosaic de cèl·lules que contenen el transgèn i altres que no. No obstant això, si el transgèn s'ha integrat en cèl·lules de la línia germinal de l'animal (les que donen lloc als espermatozoides i òvuls), la seva descendència serà completament transgènica.

Aquesta tecnologia ha sortit del laboratori per convertir-se en una aplicació mèdica com és la teràpia gènica. En aquest cas, no s'intenta generar un individu completament transgènica, sinó només algunes de les seves cèl·lules, a les quals s'afegeix el transgèn usant un tipus especial de virus. Després d'una llarga i accidentada fase de desenvolupament, l'eficàcia i seguretat de la teràpia gènica per tractar malalties mitjançant la inserció a l'atzar de transgens en el genoma

de cèl·lules somàtiques han estat finalment demostrades amb èxit (Aiuti *et al.*, 2013; Biffi *et al.*, 2013).

Si la introducció de transgens a l'atzar en el genoma d'una cèl·lula sembla relativament senzilla, la seva eliminació presenta dificultats tècniques extraordinàries. Això és així perquè es requereix actuar sobre un lloc concret dels 3 000 milions de parells de bases que formen el genoma; és a dir, de manera dirigida. La tecnologia necessària per dur aquesta fita a terme tan sols va ser possible gràcies a la conjunció de dos desenvolupaments veritablement revolucionaris. D'una banda, l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries de ratolí, que es poden mantenir en cultiu al laboratori i són capaces de generar un ratolí sencer (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981). D'altra banda, la possibilitat de dur a terme modificacions dirigides en el genoma d'una cèl·lula, mitjançant un procés anomenat «recombinació homòloga» (Smithies *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986). Si unim tots dos desenvolupaments, serem capaços de modificar de manera dirigida el genoma de cèl·lules mare embrionàries de ratolí i, per tant, generar ratolins a partir d'aquestes cèl·lules, que tindran el genoma modificat. Per aquests descobriments, que van fer possible la generació d'animals amb modificacions dirigides al seu genoma (habitualment anomenats ratolins *knockout*), Mario Capecchi, Martin Evans i Oliver Smithies van rebre el premi Nobel de Fisiologia i Medicina el 2007. Aquesta tecnologia s'ha utilitzat per esbrinar la funció (mitjançant experiments de pèrdua de funció) de milers de gens. Amb el temps, s'ha anat perfeccionant per no eliminar tan sols gens, sinó introduir qualsevol classe de modificació que es desitgi al genoma.

La gran limitació d'aquesta tecnologia és que la seva aplicació fins fa poc ha estat pràcticament exclusiva a ratolins de laboratori. Això és així, en essència i de manera molt simplificada, perquè el procés de recombinació homòloga és extraordinàriament infreqüent. El desenvolupament de mètodes per augmentar la probabilitat que es produeixi recombinació homòloga està eliminant aquestes limitacions de manera radical. Per fer-ho, es genera un trencament en les cadenes de DNA just al lloc del genoma que volem modificar, i s'aprofita la maquinària que normalment repara aquests trencaments en la cèl·lula, a la qual enganyem perquè repari el tall de la manera que ho desitgem. Durant els darrers vint anys, s'ha desenvolupat diverses eines per tallar el DNA de manera dirigida, entre les quals destaquen les nucleases enginyades amb dits de zinc i els TALEN (un relat de la història del seu desenvolupament es pot trobar a Baker, 2012). No obstant això, l'arribada en escena de CRISPR-Cas9 (Doudna i Fuster, 2014) ha proporcionat una manera eficaç, molt més versàtil i senzilla per provocar trencaments de DNA en pràcticament qualsevol lloc del genoma de manera específica. Resulta tan senzill, de fet, que ara és possible introduir canvis de manera dirigida («editar») en el genoma, no només de cèl·lules mare embrionàries de ratolí, sinó de virtualment qualsevol cèl·lula i de qualsevol espècie.

La possibilitat d'editar fàcilment el genoma d'una cèl·lula somàtica augmenta en gran manera les aplicacions terapèutiques de la teràpia gènica. Així, no només es podrien tractar les malalties causades per la pèrdua de funció d'un gen (com es fa actualment amb el guany de funció transgènic), sinó que podria abordar-se també un gran nombre de malalties provocades per altres causes genètiques. No és esperable que la implementació d'aquestes estratègies per tractar pacients, probablement usant eines basades en CRISPR-Cas9, trobi més obstacles que els derivats del seu desenvolupament tècnic i d'aplicació en éssers humans. Tenint en compte la velocitat a la qual s'estan succeint els avenços en aquest camp, és molt probable que en els pròxims cinc anys ja es trobin disponibles clínicament aquest tipus de tractaments basats en l'edició genètica de cèl·lules somàtiques per a diverses malalties.

Atesos els desenvolupaments bàsics en els assajos preclínic i clínic en marxa, es pot pronosticar de manera raonable quines seran les primeres malalties que es beneficiaran de teràpies d'edició gènica en cèl·lules somàtiques. A hores d'ara, les eines basades en CRISPR-Cas9 aconseguixen eficàcies d'edició genòmica baixes o moderades i, mentre això segueixi així, les estratègies terapèutiques més ràpidament transportables a la pràctica clínica seran de «pèrdua de funció». En aquestes es persegueix tallar el DNA de la cèl·lula en un lloc concret d'un gen específic, per tal que aquest trencament es repari a l'atzar introduint canvis aleatoris que probablement destruiran la funció del gen. S'han dissenyat estratègies d'aquest tipus per a malalties com l'anèmia falciforme i la β -talassèmia (Wu *et al.*, 2019), i en l'actualitat s'està duent a terme un assaig clínic de fase I/II per a anèmia falciforme, liderat per Vertex Pharmaceuticals i CRISPR Therapeutics, els resultats finals del qual s'esperen el maig de 2022. També es pot aplicar aquest tipus de reparació a l'atzar en situacions en què les cèl·lules que tinguin el gen editat correctament aconseguixin un avantatge selectiu enfront de les no corregides, com en el cas de l'anèmia de Fanconi (Román-Rodríguez *et al.*, 2019). Finalment, es pot esperar que aquest tipus d'estratègia s'apliqui clínicament a curt termini en malalties monogèniques en què les cèl·lules afectades siguin particularment accessibles a les eines existents de teràpia gènica, com l'amaurosi congènita de Leber, en la qual ja s'ha tractat el primer pacient d'un assaig clínic en marxa (Ledford, 2020).

En la mesura en què les eines basades en CRISPR-Cas9 vagin millorant i s'aconsegueixi més eficàcia en l'edició gènica dirigida mitjançant recombinació homòloga, és previsible que aquesta estratègia substitueixi la reparació a l'atzar per a les malalties esmentades, així com que pugui aplicar-se a un nombre molt més gran de condicions similars. No obstant això, no és probable que la seva utilització sobrepassi el marc d'actuació de la teràpia gènica actual de malalties minoritàries monogèniques. El motiu d'aquest relatiu pessimisme és que la introducció d'eines d'edició gènica basades en CRISPR-Cas9, encara que és una innovació destacada, en el context en què s'aplica a cèl·lules somàtiques continua

estant condicionada per la limitació principal de la teràpia gènica convencional; és a dir, com fer arribar aquestes eines de manera específica al nombre més gran de cèl·lules somàtiques rellevants per a la malaltia. Mentre aquesta limitació no se solucioni, el camp d'aplicació es veurà restringit a cèl·lules somàtiques en què l'edició gènica pugui dur-se a terme *ex vivo*, com les cèl·lules de la sang, o especialment accessibles a la introducció de complexos d'àcids nucleics o proteïnes, com les cèl·lules de la retina.

En resum, la possibilitat d'editar de manera eficaç i dirigida el genoma cel·lular ha suposat una revolució en la nostra capacitat d'interrogar les bases genètiques de multitud de processos de biologia cel·lular i de desenvolupament, així com de generar individus modificats genèticament gràcies a l'edició de cèl·lules de la línia germinal. No obstant això, les aplicacions terapèutiques de l'edició gènica dirigida de cèl·lules somàtiques no destaquen tant i es veuen restringides en gran manera per les limitacions actuals de la teràpia gènica convencional.

Bibliografia

- AIUTI, A.; BIASCO, L.; SCARAMUZZA, S.; FERRUA, F.; CICALESE, M. P.; BARICORDI, C.; DIONISIO, F.; CALABRIA, A.; GIANNELLI, S.; CASTIELLO, M. C. [et al.]. «Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome». *Science*, 341 (2013). DOI: 1233151.
- BAKER, M. Gene-editing nucleases. *Nat Methods*, 9 (2012), p. 23-26.
- BIFFI, A.; MONTINI, E.; LORIOLI, L.; CESANI, M.; FUMAGALLI, F.; PLATI, T.; BALDOLI, C.; MARTINO, S.; CALABRIA, A.; CANALE, S. [et al.]. «Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy». *Science*, 341 (2013). DOI: 1233158.
- BRINSTER, R. L.; CHEN, H. Y.; TRUMBAUER, M.; SENEAR, A. W.; WARREN, R.; PALMITER, R. D. «Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs». *Cell*, 27, núm. 1 (1981), p. 223-231.
- COSTANTINI, F.; LACY, E. «Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line». *Nature*, 294 (1981), p. 92-94.
- DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. «Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9». *Science*, 346 (2014). DOI: 1258096.
- EVANS, M.J.; KAUFMAN, M.H. «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292 (1981), p. 154-156.
- GORDON, J.W.; RUDDLE, F.H. «Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei». *Science*, 214 (1981), p. 1244-1246.
- LEDFORD, H. «CRISPR treatment inserted directly into the body for first time». *Nature*, 579 (2020), p. 185.
- MARTIN, G.R. «Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981), p. 7634-7638.

- ROMÁN-RODRÍGUEZ, F. J.; UGALDE, L.; ÁLVAREZ, L.; DÍEZ, B.; RAMÍREZ, M. J.; RISUEÑO, C.; CORTÓN, M.; BOGLIOLO, M.; BERNAL, S.; MARCH, F. [et al.]. «NHEJ-mediated repair of CRISPR-Cas9-induced DNA breaks efficiently corrects mutations in HSPCs from patients with Fanconi anemia». *Cell Stem Cell*, 25 (2019), p. 607-621.27.
- SMITHIES, O.; GREGG, R. G.; BOGGS, S. S.; KORALEWSKI, M. A.; KUCHERLAPATI, R. S. «Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination». *Nature*, 317 (1985), p. 230-234.
- THOMAS, K. R.; FOLGER, K. R.; CAPECCHI, M. R. «High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome». *Cell*, 44, (1986), p. 419-428.
- WU, Y.; ZENG, J.; ROSCOE, B. P.; LIU, P.; YAO, Q.; LAZZAROTTO, C. R.; CLEMENT, K.; COLE, M. A.; LUK, K.; BARICORDI, C.; [et al.]. «Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells». *Nat. Med.*, 25 (2019), p. 776-783.

10.4. L'EDICIÓ GENÒMICA EN PLANTES: LA SEVA APLICACIÓ A LA MILLORA GENÈTICA I LA SEVA REGULACIÓ A EUROPA

JOSEP M. CASACUBERTA. CRAG (CSIC-IRTA-UAB-UB),
Barcelona

20 de gener de 2020

La possibilitat de modificar de manera específica la seqüència genòmica dels organismes pot tenir aplicacions en molts camps diferents. El seu ús en medicina per intentar corregir mutacions lligades a malalties genètiques és probablement el que més interès desperta en la societat. Però són les aplicacions a la millora genètica de plantes les que arribaran primer a les nostres vides, als nostres mercats, en aquest cas.

En aquesta comunicació, explicar malgrat que manera que la ratiquestes plantes ja han arribat als mercats en alguns paé l'interès de les tècniques d'edició gènica per a la millora genètica de plantes, comparant-les amb altres tècniques utilitzades com ara la millora clàssica, la mutagènesi per radiació o la transgènia. Les plantes editades genèticament ja són una realitat als laboratoris de tot el món, i els productes obtinguts d'aquestes plantes ja han arribat als mercats en alguns països. Però el pas dels laboratoris als mercats no és fàcil, i les anàlisis dels possibles riscos derivats de l'ús d'aquestes tècniques poden suposar inversions importants en temps i diners. Això pot limitar de manera significativa tant el tipus de planta o caràcter a millorar com el tipus d'empresa que ho pot fer. Per això, en aquesta comunicació revisaré la regulació a què està sotmesa la comercialització de productes derivats de plantes obtingudes per les noves tècniques de millora en diverses parts del món i analitzaré amb més detall la situació concreta d'Europa.

10.5. L'EDICIÓ GENÈTICA I EL SEU IMPACTE EN EL FUTUR DE L'AGRICULTURA

DIEGO ORZÁEZ. Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes (IBMCP), CSIC-UPV, València

20 de gener de 2020

El canvi climàtic i el creixement de la població suposen amenaces per a la sostenibilitat mediambiental i la seguretat alimentària a què cal respondre des de tots els angles possibles. Un d'ells és sens dubte la millora genètica de plantes. L'adaptació genètica dels nostres cultius a les noves demandes mediambientals és un dels principals triomfs al nostre abast per respondre a aquestes amenaces. Amb la millora genètica de plantes es pot contribuir, entre altres, a disminuir l'ús de substàncies potencialment nocives com ara els plaguicides, a augmentar els rendiments dels cultius, reduir-ne l'ús d'aigua, facilitar la substitució dels plàstics per polímers biodegradables o produir molècules de valor afegit de manera sostenible i amb una menor empremta de carboni.

En els últims temps, els límits entre la millora tradicional basada en encreuament sexual i la mutagènesi a l'atzar d'una banda, i la millora transgènica basada en tècniques de biologia molecular per l'altra, s'han anat esvaint amb l'aparició de les anomenades noves tècniques de millora genètica (NPBT, de les seues sigles en anglès), que van des de la cisgènesi (transferència de gens entre espècies molt properes) fins a la biologia sintètica, la qual cosa ha ofert una àmplia escala de grisos. La més impactant d'aquestes NPBT és sens dubte l'edició genètica basada en les anomenades nucleases específiques del lloc (SSN, de les seues sigles en anglès), i molt especialment la tecnologia CRISPR-Cas, que s'ha aplicat amb èxit com a agent mutagènic guiat per l'RNA a moltes espècies de cultiu.

De la potència de CRISPR-Cas com a eina de millora parlen per si soles les dotzenes d'exemples d'objectius de millora assolits amb èxit en els tot just sis anys que fa que s'aplica la tècnica a les plantes. De fet, a banda de millorar cultius tradicionals, la tecnologia CRISPR-Cas9 també es fa servir per dissenyar ràpidament nous cultius per a aplicacions innovadores relacionades amb la sostenibilitat, com ara l'ús de plantes per a la fabricació de medicaments o l'adaptació de cultius de camp obert a les necessitats de l'agricultura urbana. A més, l'intens esforç de recerca que va seguir el descobriment inicial de CRISPR-Cas9 i les seves prometedores aplicacions biotecnològiques ha propiciat, com en una profecia autocomplerta, el desenvolupament de noves eines basades en CRISPR-Cas9 amb usos i aplicacions expandits. Això ha estat possible gràcies a la sorprenent capacitat de les ribonucleoproteïnes CRISPR-Cas d'acceptar l'adhesió de nous mòduls que li proporcionen funcions addicionals.

En aquesta xerrada repassarem alguns dels més recents i innovadors exemples de millora genètica basats en CRISPR, alguns dels quals haurien estat difícils o fins i tot impossibles d'assolir mitjançant tècniques de millora tradicionals. A més, discutirem algunes de les funcions expandides de les proteïnes CRISPR-Cas i les seues aplicacions a la biotecnologia vegetal, des de la mutagènesi múltiple fins a la regulació transcripcional programable.

10.6. ENGINYERIA PRECISA DEL GENOMA DE MAMÍFERS

MARC GÜELL. Universitat Pompeu Fabra (UPF),
Barcelona

20 d'abril de 2020

Durant la darrera dècada, la nostra capacitat de modificar genomes ha crescut significativament i ha causat un fort impacte en la recerca i la medicina. Tot i el progrés realitzat, l'edició genòmica de mamífers encara planteja reptes com una capacitat per multiplexar limitada i dificultat per generar edicions genòmiques llargues. En aquest sumari, presentaré el nostre treball en utilitzar les tecnologies CRISPR-Cas9 per crear porcs lliures de retrovirus porcins endògens (PERV, de l'anglès *porcine endogenous retrovirus*) per xenotrasplantament després de desenes d'edicions simultànies.

Tan sols als Estats Units, vint persones moren cada dia esperant un òrgan (United Network for Organ Sharing, UNOS, 2020). La falta d'òrgans per xenotrasplantar és una de les necessitats mèdiques més grans no satisfetes. Dos problemes frenen l'avenç del xenotrasplantament: la presència de PERV en els genomes de porcs i la compatibilitat dels òrgans de porc en humans. Les tècniques d'edició genòmica actuals s'estan utilitzant per solucionar els dos reptes amb l'objectiu de produir una font inesgotable d'òrgans en porcs modificats genèticament. El progrés fins ara és impressionant. S'han produït porcs lliures de retrovirus endògens (I) i els òrgans de porcs modificats genèticament poden durar anys en models primats no humans (II).

- I. Els PERV són una preocupació important per a les aplicacions de xenotrasplantament, ja que poden ser transferits de porc a humà (Güell *et al.*, 2017). Com que estan integrats en el genoma, existeixen en tots els teixits i òrgans i es transmeten verticalment de pares a descendents. L'edició del genoma ens permet eliminar o inactivar els PERV, la qual cosa fa que els òrgans de porcs modificats genèticament siguin adequats per al xenotrasplantament. El 2015, vam informar de l'ús de CRISPR-Cas9 per eliminar seixanta-dues còpies de PERV en el genoma del porc (Yang *et al.*, 2015) i vam demostrar la reducció de la transmissió de PERV a cèl·lules humanes en un factor de més de mil. Aquesta

troballa mostra que CRISPR-Cas9 pot generar desenes d'edicions simultànies i que els PERV es poden desactivar per a l'aplicació clínica de xenotrasplantament de porc a humà. El 2017, vam produir porcs amb tots els PERV desactivats (Niu *et al.*, 2017), que van resultar sans i fèrtils amb òrgans que funcionen. Recentment, l'equip ha començat a trasplantar òrgans dels porcs altament editats a primats no humans per valorar la seva seguretat i longevitat.

- II. L'enginyeria immunològica i fisiològica per incrementar la compatibilitat d'òrgans de porc en humà també es duu a terme per enginyeria genòmica. Per fer-ho, s'afegeixen gens humans al genoma de porc i es retiren gens que els porcs tenen i els humans no. En aquest sentit, ja s'ha produït porcs que produeixen cors (Längin *et al.*, 2018), ronyons (Iwase *et al.*, 2017) i illots pancreàtics (Aristizabal *et al.*, 2017) que duren anys en primats no humans.

Aquests avenços fan que l'edició de genomes de porcs a utilitzar en xenotrasplantaments sigui una de les estratègies més prometedores per proporcionar una font il·limitada d'òrgans per a pacients que ho necessiten, cosa que soluciona una de les necessitats mèdiques més importants.

Bibliografia

- ARISTIZABAL, A. M. [*et al.*]. «Clinical xenotransplantation, a closer reality: literature review», *Cirugía Española* (edició en anglès), 95, núm. 2 (2017), p. 62-72. DOI: 10.1016/j.cireng.2017.03.007.
- GÜELL, M. [*et al.*]. «PERV inactivation is necessary to guarantee absence of pig-to-patient PERVs transmission in xenotransplantation», *Xenotransplantation*, 24, núm. 6 (2017). DOI: 10.1111/xen.12366.
- IWASE, H. [*et al.*]. «Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts», *Xenotransplantation*, 24, núm. 2 (2017). DOI: 10.1111/xen.12293.
- LÄNGIN, M. [*et al.*]. «Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation», *Nature*, 564, núm. 7736 (2018), p. 430-433. DOI: 10.1038/s41586-018-0765-z.
- NIU, D. [*et al.*]. «Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9», *Science* [New York, NY], 357, núm. 6357 (2017), p. 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING (UNOS). *Transplant trends* [en línia]. <<https://unos.org/data/transplant-trends>> [Consulta: 1 setembre 2020].
- YANG, L. [*et al.*]. «Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)», *Science*, 350, núm. 6264 (2015), p. 1101-1104. DOI: 10.1126/science.aad1191.

10.7. EDICIÓ GÈNICA EN EMBRIONS DE RATOLÍ MITJANÇANT LA TECNOLOGIA CRISPR-Cas9

LAURA BATLLE-MORERA. Centre de Regulació Genòmica, Barcelona

20 d'abril de 2020

L'ús de ratolins genèticament modificats com a models de malalties humanes i per investigar la funció de gens i mecanismes específics que ocorren *in vivo* és una eina molt emprada en projectes de recerca. Es generen ratolins transgènics des dels anys vuitanta. Recentment, gràcies a la utilització de les tècniques d'edició gènica CRISPR-Cas9, la creació de ratolins transgènics es pot realitzar d'una manera més eficient i ha obert la porta a emprar noves metodologies per a la generació de ratolins transgènics. Actualment aquest sistema és tan eficient que és possible generar ratolins transgènics sense la realització de complicades tècniques de microinjecció. Més recentment s'ha demostrat que es poden generar ratolins transgènics, emprant les eines CRISPR-Cas9, *in vivo* quan els embrions són encara en l'oviducte abans d'implantar-se. Això obre la possibilitat de generar animals transgènics d'altres espècies d'interès. Explicarem la nostra experiència en la generació de ratolins transgènics gràcies a la tecnologia CRISPR-Cas9.

10.8. L'EDICIÓ GENÒMICA EN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

JEREMY VICENCIO. Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

20 d'abril de 2020

El nematode *C. elegans* es va adoptar per primera vegada el 1974 com a organisme model i, des d'aleshores, ha estat essencial en l'avenç de la genètica i la biologia del desenvolupament. Va ser el primer animal a tenir seqüenciat tot el seu genoma i aproximadament el 42 % dels seus vint mil gens tenen ortòlegs humans, molts dels quals estan associats a malalties. Per tant, el seu ús també s'ha expandit recentment cap a la investigació biomèdica i la medicina personalitzada.

Diverses característiques fan de *C. elegans* un organisme atractiu per a l'edició de gens. En primer lloc, té un cicle de vida curt, de tres a cinc dies, dependent de la temperatura de cria (normalment, de 15 °C a 25 °C). En segon lloc, com que principalment existeixen com a hermafrodites, no calen encreuaments

genètics per aïllar la descendència homozigot dels pares heterozigots. En tercer lloc, la seva línia germinal sincicial (cèl·lules amb diversos nuclis) permet l'edició simultània de molts nuclis cel·lulars en una sola microinjecció.

Els canvis precisos en el genoma del nematode es poden aconseguir en dues o tres setmanes amb relativa facilitat utilitzant el sistema CRISPR-Cas, que van des de mutacions puntuals, eliminacions o la inserció de grans fragments de DNA, com en el cas de seqüències codificades per proteïnes de fluorescència verda (GFP) o altres proteïnes fluorescents. L'aplicació d'aquest darrer és de gran interès en *C. elegans* a causa de la transparència del nematode, cosa que permet als investigadors seguir els nivells d'expressió i la localització subcel·lular de les proteïnes al llarg del temps, fent que l'ús de reporters fluorescents sigui una eina útil per a l'anàlisi de les funcions genètiques.

C. elegans és susceptible a la transgènesi, que normalment es duia a terme a través de la microinjecció de DNA exogen per formar matrius extracromosomals o a través de la integració mitjançant transformació biolística. No obstant això, l'adveniment de la tecnologia CRISPR-Cas pràcticament ha eliminat aquests mètodes. L'edició de gens a través de CRISPR-Cas facilita l'edició de gens en loci endògens, la qual cosa afavoreix l'estudi de l'expressió gènica a nivells nadius. Les mutacions aleatòries es poden crear a través del mecanisme de reparació no homòloga (NHEJ), i canvis específics com la substitució de gens o la introducció d'etiquetes es poden aconseguir mitjançant la reparació dirigida per homologia (HDR). A més, tot això es pot fer de manera reproduïble, ja que la majoria dels materials i reactius necessaris estan disponibles comercialment.

D'acord amb el principi de les 3R (reemplaçar, reduir, refinar) per a un ús més ètic dels animals en proves preclíniques, *C. elegans* és una alternativa plausible als models animals vertebrats. Per tal com és un invertebrat, no entra dins de l'àmbit de la Directiva Europea 2010/63/UE i, per tant, les preocupacions ètiques no constitueixen una barrera per utilitzar milers d'individus de *C. elegans* en assajos de biblioteques genètiques i de fàrmacs en estudis preclínics.

En resum, la facilitat per modificar el sistema genètic de *C. elegans*, juntament amb el seu curt cicle de vida, permet la generació de mutants homozigots en un nombre baix de dies, una característica inigualable per a altres organismes model com *Drosophila*, peix zebra (*Danio rerio*) o ratolins. Els nematodes modificats genèticament es poden utilitzar com a avatars per imitar mutacions humanes, la qual cosa proporciona accés al diagnòstic i tractament personalitzats de manera ràpida, escalable i a baix cost.

10.9. LA DINÀMICA NATURAL DELS GENOMES EN EVOLUCIÓ

JAUME BERTRANPETIT. Institut de Biologia Evolutiva,
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

4 de maig de 2020

Un dels punts de reflexió en tractar les modificacions artificials dels genomes és la mateixa dinàmica dels genomes, el que en podríem dir la seva dinàmica natural o, millor, espontània. Els genomes canvien al llarg del temps i de les generacions i aquesta característica dinàmica és la base fonamental per a l'existència de la vida tal com la coneixem: tota la diversitat que existeix de la vida (incloent-hi tota la diversitat que s'ha perdut) ha tingut els seus orígens en la producció de noves variants per processos de mutació. La mutació, com a fenomen consubstancial de la vida, es produeix activament al llarg de les generacions cel·lulars, afectant de diferent maneres els genomes, incloent-hi substitucions, insercions, delecions, translocacions, etc. Sempre hem de considerar de manera ben diferenciada les mutacions somàtiques (que afecten qualsevol cèl·lula no reproductora dels organismes), de les germinals (que afecten cèl·lules reproductores i per tant afectaran la totalitat de l'organisme a la següent generació). Les primeres són importants per a l'individu, les segones per a l'evolució.

El que ens importa és que hi ha una dinàmica dels genomes que els afecta a totes les escales temporals: si bé és evident que al llarg de l'evolució hi ha hagut canvis en els genomes, no ho és menys que aquests es produeixen també a cada generació. En aquesta petita escala temporal ara podem observar i mesurar el canvi. Així, si considerem tan sols les substitucions de nucleòtids (que afecten tan sols una unitat de la informació genètica que portem), diversos estudis han permès calcular la taxa de mutació que hi ha en una única generació (que és de l'ordre de 10^{-8} per nucleòtid) i que, atesa la grandària del nostre genoma (3×10^9 nucleòtids) ens permet fer una estimació que cadascú de nosaltres és portador, com a mitjana, d'unes seixanta variants noves, trenta per part de cada progenitor. Som, doncs, mutants i cadascú de nosaltres és portador d'una bona quantitat de novetat genòmica que pot tenir diferents futurs: gran part no tenen efecte en l'individu i les variacions al llarg de les generacions seran exclusivament a l'atzar, amb altes probabilitats de perdre's; altres tindran efectes perjudicials i estaran a la base de la malaltia genètica, amb la selecció purificadora fent-ne disminuir la freqüència, i finalment molt poques poden estar a la base d'una adaptació nova i la selecció positiva les farà augmentar de freqüència.

En el nostre genoma no hi ha només aquestes substitucions, sinó que hi ha una dinàmica interna molt rica que afecta parts més àmplies de genoma. Tenim en el nostre genoma gairebé un 50 % de regions repetitives. Entre elles, els transposons o elements transposables (TE, de l'anglès *transposable element*)

són seqüències de DNA que tenen la capacitat de canviar la seva posició dins d'un genoma. Es pot considerar el genoma com un ecosistema habitat per diverses comunitats de TE que pretenen propagar-se i multiplicar mitjançant interaccions sofisticades. Aquestes interaccions abasten processos familiars per als ecòlegs, com ara el parasitisme, la cooperació i la competència. La transposició representa un potent mecanisme d'expansió del genoma que, amb el pas del temps, es contraresta amb l'eliminació de DNA per supressió. L'equilibri entre els dos processos és un dels principals motors de l'evolució de la mida del genoma en eucariotes.

La taxa de transposició en la línia germinal en humans s'ha pogut estudiar per diferents tipus d'elements repetitius del nostre genoma a través de la seqüència d'altíssima qualitat en successives generacions d'individus i s'ha pogut observar l'aparició de noves regions repetitives en llocs nous del genoma. Així, considerant exclusivament les seqüències Alu (un tipus molt freqüent de seqüència de DNA de només dos-cents vuitanta parells de bases) és aproximadament un de cada vint-i-un naixements, amb molts altres elements en freqüències més baixes. Així doncs, comencem a conèixer la taxa i la dinàmica de la retrotransposició humana i ens mostra que és un fenomen corrent: molts de nosaltres inaugurem en la nostra espècie alguna reorganització del genoma.

Aquestes reorganitzacions inclouen fragments de DNA d'origen molt variat i molts d'ells de provenença d'altres espècies molt allunyades de nosaltres com bacteris o virus. Recordem, a tall d'exemple, que la quantitat de DNA de provenença vírica en el genoma humà és d'unes cinc vegades superior al DNA que inclouen els nostres gens, els humans. Un genoma no és un producte de disseny, optimitzat per complir unes funcions concretes d'una espècie concreta. És un conjunt d'elements que inclouen restes evolutives d'altres temps i que canvien en el transcurs de les generacions. Tots nosaltres som mutants i tots nosaltres som transgènics. El que estem aprenent en les tecnologies de l'edició dels genomes són només els elements més elementals del que fan servir de manera natural els genomes per tal de posar una certa dosi de canvi en la permanència que impregna la vida.

10.10. EL GERMEN DE L'EDICIÓ GENÈTICA

FRANCISCO J. MARTÍNEZ MOJICA. Departament de
Fisiologia, Genètica i Microbiologia de la Universitat
d'Alacant

4 de maig de 2020

Les tècniques d'edició genètica utilitzen components de llevats, algues microscòpiques o, sobretot, procariotes (bacteris i arqueus) per portar a terme

un procés que culmina amb la modificació de regions específiques de DNA al genoma d'un ésser viu. Aquestes estratègies d'edició comencen generalment amb la interrupció de la continuïtat de la seqüència on es pretén dur a terme la inserció, deleció o substitució de material genètic. En tots els casos, des de la tecnologia basada en les meganucleases fins a la que utilitza les proteïnes Cas (*CRISPR associated*) passant per les basades en ZFN (*zinc finger nuclease*) i TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*), el tall el realitzen proteïnes d'origen microbià la missió de les quals en el seu hoste natural difereix del propòsit pel qual s'han redissenyat al laboratori. Les meganucleases probablement serveixen a l'element genètic que les codifica per la seva multiplicació i propagació, mentre que l'activitat de les nucleases associades a ZFN, TALEN o CRISPR produeix la destrucció d'àcids nucleics invasors, protegint d'aquesta manera el procariota portador front a invasors, tal com els virus.

En aquest context, els sistemes nadius CRISPR-Cas constitueixen un mecanisme de defensa excepcional, present en la majoria d'arqueus i una mica menys de la meitat dels bacteris coneguts. Els elements CRISPR (repeticions curtes, palindròmiques, agrupades i regularment interespaiades) foren els primers components d'aquests sistemes a ser descoberts, fa més de tres dècades. A principis d'aquest segle s'identificaren les proteïnes Cas i poc després es va establir la funció que realitzen, assistides per la informació continguda en les agrupacions CRISPR. Gran part de les seqüències espaiadores localitzades entre les repeticions CRISPR procedeix de genomes vírics, en què actuaven com a registres d'infeccions passades. Els RNA generats a partir d'aquestes regions guien les proteïnes Cas per reconèixer aquests agents infecciosos i neutralitzar-los tallant el seu genoma.

Es tracta, per tant, d'un sistema d'immunitat basat en un reconeixement de seqüències d'àcids nucleics, amb capacitat d'adaptació mitjançant la incorporació en una agrupació CRISPR d'espaiadors procedents del genoma de nous invasors. La generació artificial d'aquesta memòria, mitjançant la síntesi *in vitro* de RNA guia que conté la seqüència coincident amb la de la regió genètica on es desitja enviar les proteïnes Cas, ha donat lloc a un conjunt extraordinari d'eines conegudes en conjunt com tecnologia CRISPR, utilitzades amb diverses finalitats relacionades amb la interacció amb àcids nucleics i la seua manipulació *in vitro* i *in vivo*. Entre les nombroses aplicacions d'aquesta tecnologia posades en pràctica en ciències de la vida i salut, cal destacar la regulació de l'expressió gènica, el diagnòstic molecular i l'edició genètica, en qualsevol tipus cel·lular, des de bacteris fins a cèl·lules humanes, amb una precisió, eficàcia i facilitat sense precedents.

L'enorme diversitat de microorganismes existents en la naturalesa suposa una font inesgotable d'eines de laboratori. Potser, entre elles, hi ha algunes eines tan útils com la tecnologia CRISPR i tan sorprenents com el sistema immunitari del qual deriva.

10.11. ORGANOIDES I EDICIÓ GENÒMICA EN L'ESTUDI DE LA DIVERSITAT FENOTÍPICA DEL CÀNCER COLORECTAL

ELENA SANCHO i EDUARD BATLLE. Institut de Recerca Biomèdica (IRB, Barcelona); The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), ICREA

4 de maig de 2020

Els càncers són amalgames de poblacions de cèl·lules tumorals fenotípicament diferents. Com a resultat de la inestabilitat genòmica, els càncers adquireixen centenars d'alteracions genètiques i epigenètiques que imposen diferents fenotips a les cèl·lules tumorals. Aquest fenomen explica la capacitat del càncer d'adaptar-se a diferents entorns, colonitzar òrgans aliens i resistir a la teràpia. Tot i això, amb els anys, ha quedat clar que l'heterogeneïtat del tumor no només sorgeix de la càrrega mutacional, sinó també de la seva pròpia arquitectura fenotípica. En aquest sentit, el càncer colorectal (CCR) és un paradigma del paper de les cèl·lules mare en el càncer. L'epiteli del còlon es troba en constant renovació gràcies a una població de cèl·lules mare que resideixen a la base de cada cripta. Cada dia es generen milions de cèl·lules que experimenten una diferenciació funcional a prop del lumen intestinal. El nostre laboratori ha estat estudiant l'organització dels CCR en relació amb la de la mucosa del còlon normal. El 2011 vam descriure que, malgrat l'adquisició de múltiples alteracions genètiques, la majoria dels CCR conserven una jerarquia de cèl·lules mare que recorda la present en la mucosa sana. Vam demostrar que els CCR contenen un subconjunt de cèl·lules tumorals similars a les cèl·lules mare, que regeneren contínuament el càncer, mentre que la descendència d'aquestes cèl·lules mare forma el gruix del tumor, però és de poca durada i no és gaire tumorígena com a resultat de la diferenciació. Els dos tipus de cèl·lules ocupen compartiments adjacents a les glàndules tumorals i estan presents a proporcions diferents en cada pacient. Aquesta organització és comuna a la majoria de CCR (80 %) (Merlos-Suárez *et al.*, 2011).

Dos recents avenços tecnològics han transformat la nostra capacitat de disseccionar l'heterogeneïtat del tumor en CCR. El primer són els organoides, estructures tridimensionals (3D) en cultiu *in vitro* derivats de cèl·lules mare autoorganitzades. El terme *organoide* s'utilitza perquè aquests cultius 3D reflecteixen una semblança amb l'òrgan d'origen quant a l'autoorganització, la multicel·lularitat i la funcionalitat. En molts aspectes poden considerar-se com a miniòrgans. Els organoides 3D derivats de cèl·lules mare representen una eina inestimable per a la investigació que s'ha emprat ràpidament per comprendre la biologia de les cèl·lules mare, l'organogènesi, i diverses patologies humanes, inclòs el càncer. De fet, els organoides representen la tecnologia més actual i adient per a l'estudi d'esdeveniments rellevants en

molts tipus de càncers, inclòs el càncer colorectal. A més, representen una plataforma *in vitro* per al descobriment de medicaments preclínic i actualment s'està investigant el seu valor per predir les respostes de la teràpia. Nosaltres vam desenvolupar un mètode que va permetre per primera vegada tant l'aïllament de cèl·lules mare de còlon humà de biòpsies de mucosa sana com el seu cultiu com a organoides en expansió constant que recreen l'organització de les criptes de colònies a les plaques de petri (Jung *et al.*, 2011). El protocol es va adaptar més tard per créixer i preservar les cèl·lules mare del càncer dels tumors (Merlos-Suárez *et al.*, 2011, Calon *et al.*, 2015).

El segon desenvolupament important ha estat la nostra capacitat d'editar el genoma d'aquests organoides mitjançant tècniques CRISPR-Cas9 (Cortina *et al.* 2017; Morral *et al.*, 2020). L'estudi de jerarquies de cèl·lules mare i d'altres fonts de diversitat cel·lular en càncers humans s'havia basat en gran manera en experiments d'aïllament de cèl·lules tumorals a partir de mostres de pacients dissociades. Aquests experiments imposen diverses limitacions. En primer lloc, el requisit d'anticossos contra proteïnes de membrana específiques per etiquetar poblacions cel·lulars determinades limita el repertori de fenotips cel·lulars que es poden analitzar. En segon lloc, la necessitat de dissociar la mostra impedeix l'examen de les poblacions de cèl·lules tumorals en un entorn intacte, és a dir, en un tumor en creixement.

Combinant aquestes dues noves metodologies —els organoides tumorals derivats de pacients i les eines d'edició del genoma— podem estudiar l'heterogeneïtat cel·lular dels càncers colorectals sense les limitacions descrites anteriorment (Cortina *et al.*, 2017; Morral *et al.*, 2020). L'edició del genoma mitjançada per CRISPR-Cas9 facilita la integració en organoides derivats de pacients amb càncer colorectal (PDO, de l'anglès *patient-derived organoid*) de seqüències gèniques dins de gens marcadors, la qual cosa permet l'estudi dels tumors humans mitjançant enfocaments genètics que només havien estat factibles en models animals. Els organoides editats permeten realitzar experiments genètics clàssics d'expansió clonal, traça de llinatge i ablació de cèl·lules en tumors. Aquest avenç és especialment adequat per analitzar la diversitat fenotípica de les poblacions cel·lulars dins dels càncers, ja que permet etiquetar i rastrejar cèl·lules tumorals diferents a través de gens marcadors específics, que no necessàriament s'expressen a la superfície cel·lular.

Com a prova de concepte, vam estudiar les cèl·lules mare LGR5+ en organoides provinents de pacients amb CCR (PDO) l'anàlisi de la qual s'havia vist obstaculitzada per la manca de bons reactius comercials per reconèixer aquesta proteïna. Utilitzant l'edició mitjançada per CRISPR, vam dissenyar PDO que portaven un casset reporter GFP connectat al lloc LGR5. Vam descobrir que la població de cèl·lules tumorals LGR5+ expressa un programa

gènic similar al de les cèl·lules mare intestinals normals. En tumors crescuts a ratolins com xenografts, les cèl·lules tumorals LGR5+ humanes van propagar la malaltia amb alta eficiència, cosa que implica que aquesta població cel·lular consta en gran manera de cèl·lules iniciadores d'un tumor. A més, es van generar PDO que portaven un cassat de traça de llinatges i posteriorment es va mapar la destinació de les cèl·lules LGR5+ en tumors intactes. Vam trobar que les cèl·lules LGR5+ mostren una capacitat d'autorenovació i diferenciació multillinatge a llarg termini. Finalment, mitjançant la generació de PDO LGR5-GFP/Ki67-RFP *double-knock-in*, vam descriure una població de cèl·lules mare quiescents en els CCR humans (Cortina *et al.*, 2017).

Un altre exemple del potencial dels enfocaments descrits anteriorment és l'estudi de la plasticitat cel·lular mitjançant l'eliminació de poblacions cel·lulars específiques (Cortina *et al.*, 2017; Morral *et al.*, 2020). Caracteritzant les propietats de les cèl·lules mare del càncer, vam trobar que la majoria de l'RNA i les proteïnes sintetitzades als CCR es dona en un subconjunt limitat de cèl·lules que resideixen immediatament al costat de l'estroma. En canvi, a mesura que les cèl·lules tumorals es diferencien, experimenten una pèrdua irreversible de l'RNA i de la capacitat de síntesi de proteïnes. Utilitzant estratègies d'ablació de cèl·lules, traça de llinatges i seqüenciació d'RNA de cèl·lules individuals basades en CRISPR-Cas9, vam demostrar que en un subconjunt de CCR el compartiment de cèl·lules tumorals biosintètiques encaixa amb el domini d'expressió LGR5 mentre que en altres tumors sembla alimentar el creixement del tumor sense la contribució de cèl·lules LGR5+. Les cèl·lules tumorals presenten plasticitat mentre mantenen la capacitat biosintètica. Quan la perden, la diferenciació és irreversible. Els patrons de zonació de l'RNA i la síntesi de proteïnes que descrivim reflecteixen l'existència d'una jerarquia simple de cèl·lules mare basada en la capacitat biosintètica diferencial de les cèl·lules tumorals (Morral *et al.*, 2020).

Bibliografia

- MERLOS-SUÁREZ [*et al.*]. *Cell Stem Cell*, 8 (2011), p. 511-524.
- P. JUNG [*et al.*]. *Nat. Med.*, 17 (2011), p. 1225-1227.
- CALON [*et al.*]. *Nat. Genetics*, 47 (2015), p. 320-362.
- CORTINA [*et al.*]. *EMBO Mol. Medicine*, 9 (2017), p 869-879.
- MORRAL [*et al.*]. *Cell Stem Cell*, 26 (2020), p 845-861.

10.12. EDICIÓ GENÒMICA EN LA LÍNIA GERMINAL

ANNA VEIGA. Dexeus Mujer, Hospital Universitari Dexeus, Programa de Medicina Regenerativa. IDIBELL, Barcelona

4 de maig de 2020

L'edició genòmica en la línia germinal (GGE, *germline genome editing*) ha iniciat una nova dinàmica amb l'aparició de la tècnica de CRISPR-Cas9 i les seves variants. La GGE pot dur-se a terme en cèl·lules mare pluripotents, en cèl·lules espermatozòniques i en embrions en diferents estadis de desenvolupament.

Aquesta metodologia permet modificar genèticament les cèl·lules mare pluripotents que es poden transformar posteriorment en gàmetes tant masculines com femenines a través de la gametogènesi *in vitro* que ja s'ha aconseguit en el ratolí. L'edició de cèl·lules mare espermatozòniques permet obtenir espermatozoides modificats, també assolit en el model animal (rata).

La GGE té unes indicacions específiques que inclouen parelles en les quals els dos membres són homozigòtics per una malaltia genètica recessiva, en què un dels membres és homozigòtic per una malaltia genètica dominant i pels casos en què un dels membres és portador d'una alteració cromosòmica estructural (per ex., translocació 21/21, indicació teòrica). En la resta de casos de parelles portadores de malalties genètiques, el diagnòstic genètic preimplantacional que permet seleccionar els embrions lliures de malaltia és la tècnica d'elecció.

Hi ha actualment diverses publicacions sobre GGE en embrions humans. Els estudis van començar amb embrions (zigots) triproucleats (zigots provinents d'òvuls fecundats per dos espermatozous) i posteriorment en embrions procedents de zigots correctament fecundats, donats per a recerca o creats específicament per als experiments. Les legislacions poden ser altament variables entre països i la Xina, els EUA i el Regne Unit encapçalen les referències. Es tracta de publicacions que demostren la possibilitat de dur a terme reparació de gens defectuosos, inserció o disrupció de gens. La finalitat pot ser curativa o de correcció d'alteracions o bé per determinar el rol de determinats gens en el desenvolupament embrionari.

Les limitacions tècniques més importants de la GGE en embrions són l'aparició de fenòmens d'*off-target* (modificacions en llocs diferents que el que es vol modificar) i de mosaïcisme embrionari en què s'han modificat de manera distinta diferents cèl·lules de l'embrió. S'ha descrit recentment fenòmens d'*off-target* en què la modificació genètica no té lloc en la diana precisa del loci triat. És necessari dur a terme una anàlisi completa del genoma de l'embrió per tal de valorar aquests fenòmens. S'han publicat darrerament nous experiments que demostren la necessitat d'optimització de la GGE en embrions per resoldre la

pèrdua d'heterozigosi, la pèrdua segmental o total de cromosomes i la manca de reparació en un percentatge elevat dels embrions editats.

Malgrat que hi ha un consens global de no utilitzar la GGE amb finalitats reproductives en considerar que les limitacions tècniques actuals no garanteixen la seguretat de la tècnica, el novembre de 2018 es va produir l'anunci del naixement de dues nenes per part d'un investigador xinès que va ignorar totes les cauteles expressades per les societats científiques i de bioètica. Els embrions van ser modificats genèticament per tal que fossin no accessibles a la infecció per part del virus VIH.

Els embrions donats per parelles sotmeses a fecundació *in vitro* que ja no els desitgen per a la seva reproducció i volen destinar-los a usos de recerca representen una font inestimable per tal de potenciar la recerca en l'àmbit de la GGE. Cal avaluar l'eficiència d'aquesta tècnica i sobretot la seva seguretat abans de plantejar la seva possible aplicació clínica.

10.13. LA FINA LÍNIA GRISA: EDICIÓ GENÒMICA PER A LA MILLORA DELS ÉSSERS HUMANS?

GEMMA MARFANY. Catedràtica de genètica de la Universitat de Barcelona, IBUB-IRSJD, CIBERER-ISCIH

4 de maig de 2020

Gran part de la cultura humana va néixer, probablement, del desig de ser desitjable i de comparèixer tan bé com puguem enfront dels nostres companys. Petxines marines decorades, anells i braçalets d'or, collarets de pedra, perfums i unguents i teixits decorats es troben com a túmuls funeraris en totes les cultures. Tant dones com homes han fet servir maquillatge per adornar les cares i expressions, com a senyal de poder i valor. Probablement, la humanitat sempre ha volgut transcendir la realitat, i perseguir la joventut eterna, ser més forta, més apta, més bella o més intel·ligent. El segle xx va viure una revolució social, la popularització de la moda i el maquillatge a preus assequibles, els tractaments hormonals i la cirurgia estètica van fer possible i també van democratitzar el canvi de la nostra aparença física. No obstant això, la modificació de les habilitats intel·lectuals i els fenotips complexos estaven completament fora de l'abast del maquillatge, les hormones esteroides o el bisturí.

Actualment, l'aparició de l'edició genòmica amb CRISPR-Cas9 i el seu enorme potencial per a la manipulació precisa del genoma posen l'edició de fenotips a les nostres mans. De sobte, els somnis transhumanistes podrien ser factibles o, almenys, podrien ser-ho en el futur pròxim. Però la millora

genètica no és teràpia. La teràpia es refereix al tractament o cura d'una malaltia o una condició genètica, canviant la informació genètica per tal de millorar els símptomes del pacient o fins i tot invertir els efectes patològics d'una malaltia. D'altra banda, la millora genètica tracta de «millorar-nos» a nosaltres mateixos o els nostres fills, per proporcionar-los qualitats diferents que no estaven codificades en el seu genoma. Es tracta d'un canvi clau en el concepte, que també comporta múltiples problemes bioètics. Només esmentaré algunes de les qüestions que planteja la possibilitat d'aplicar tècniques biotecnològiques per a la nostra millora genètica. Hauríem d'aplicar tècniques d'edició genètica només per a la teràpia en malalties molt greus i incapacitants? S'hauria de permetre a la gent millorar les seves característiques (per exemple, tenir un to de veu perfecte, músculs més primis i més forts, ulls blaus, un coeficient intel·lectual més alt, visió infraroja, tolerància al dolor físic)? Ja sigui per teràpia o per millora, s'hauria de restringir l'edició genòmica a les cèl·lules somàtiques (és a dir, a individus nascuts)? O hauríem de permetre la modificació d'embrions (fet rellevant en malalties rares heretades amb afectació múltiple d'òrgans)? Aquesta darrera possibilitat implica la modificació de la línia germinal i, per tant, el genoma que es transmet a la progènie. Així, podrien canviar les freqüències al·lèliques en els éssers humans futurs, cosa que podria configurar en part el futur de la humanitat.

Alguns investigadors en bioètica estan en contra de la modificació genètica de la línia germinal, o almenys, advoquen per la cautela, mentre que altres sostenen que, com a pares, hauríem d'optar perquè els nostres fills tinguin el millor genoma possible si existeixen les eines i el coneixement, i procedir de qualsevol altra manera seria una irresponsabilitat com a pares. Les enquestes internacionals mostren que no totes les persones i cultures accepten l'edició de gens per a millora. A Europa, alguns països estan a favor de la teràpia però en contra de la millora genètica, mentre que altres països (com Espanya) estan a favor de tots dos tipus de manipulació genètica. Mentrestant, alguns científics referents en el camp han començat a fer una llista de desitjos, és a dir, de possibles gens i variants genètiques que codifiquen trets fenotípics específics i podrien ser candidats per a l'edició en un futur. També és important recordar la irresponsable i precipitada modificació genètica d'almenys tres bebès a la Xina per part de l'equip de He Jiankui, que tenia com a objectiu aconseguir éssers humans que no poden ser infectats pel virus del VIH, i va acabar modificant embrions humans que seran mosaics genètics i portaran mutacions induïdes durant tota la seva vida.

Hi ha una fina línia grisa entre la teràpia i la millora, sense una sola posició adoptada pels científics, metges, experts en bioètica o juristes. Les lleis i recomanacions sobre l'edició de gens tampoc no són homogènies a tot el món. Es tracta d'un tema bioètic molt rellevant que afectarà el nostre futur i sobre el qual, com a societat, hauríem de reflexionar integrant diverses disciplines de coneixement.

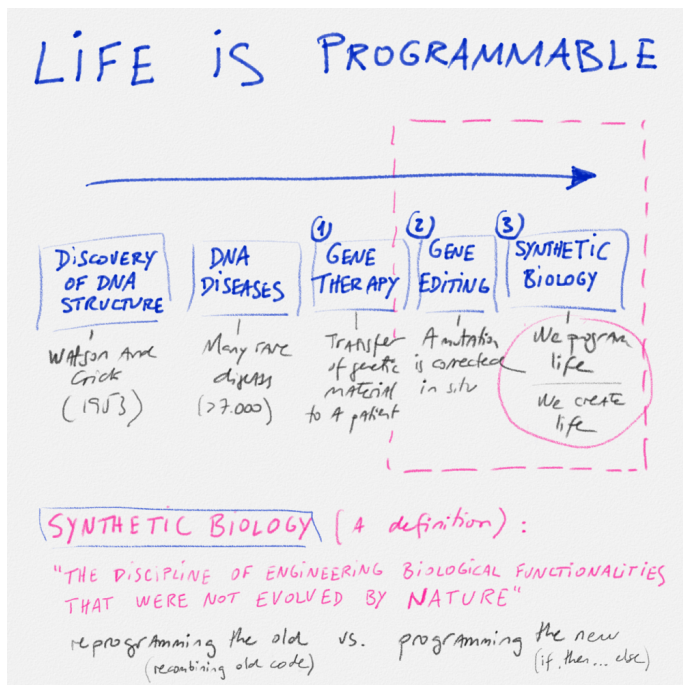
10.14. LA TERÀPIA GENÈTICA I LA BIOLOGIA SINTÈTICA: LA VIDA COM A SOFTWARE

LLUÍS PARERAS. Invivo Ventures

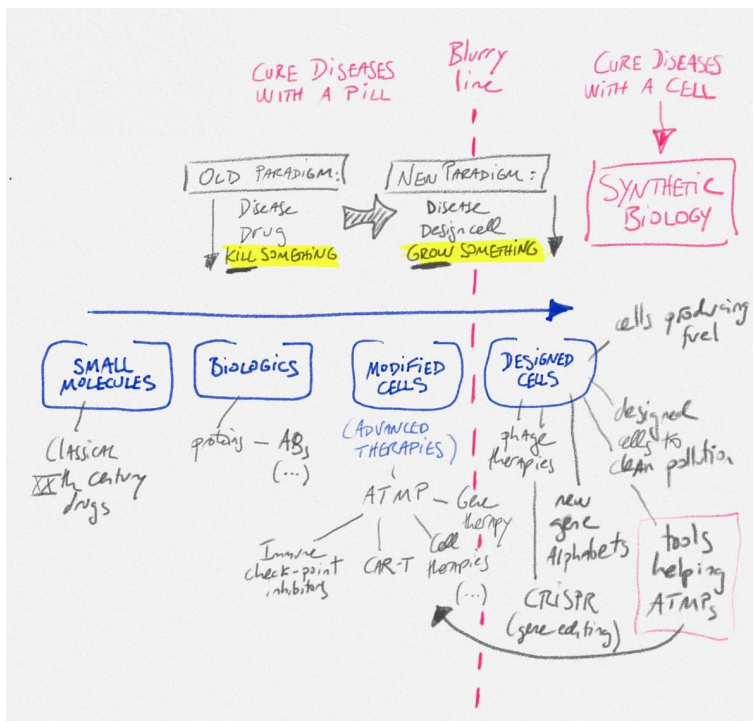
4 de maig de 2020

Fins fa ben poc, la naturalesa fixava els límits de la biologia. Però aquest fet pot arribar a la seva fi molt aviat: els camps de l'edició genètica i la biologia sintètica permeten a les cèl·lules anar més enllà de les normes de la naturalesa. La biologia sintètica, una combinació de biologia, genètica, programació i enginyeria, sembla destinada a revolucionar les ciències de la vida i la medicina. Però, a quin cost? Hi ha algun límit per editar cèl·lules que hauríem d'imposar-nos?

Des de finals del segle XX, els científics identifiquen el DNA com el *software* o programari dels sistemes vius. Els especialistes són capaços de transferir parts del codi genètic d'un organisme a un altre per tal de «programar» cèl·lules amb funcions específiques. Per mitjà de la programació del DNA, la biologia sintètica busca l'ús de codis genètics artificials per generar nous comportaments en biologia natural, o l'assemblatge artificial de sistemes biològics naturals per donar lloc a nous comportaments en éssers vius, que no han estat dissenyats per la natura.

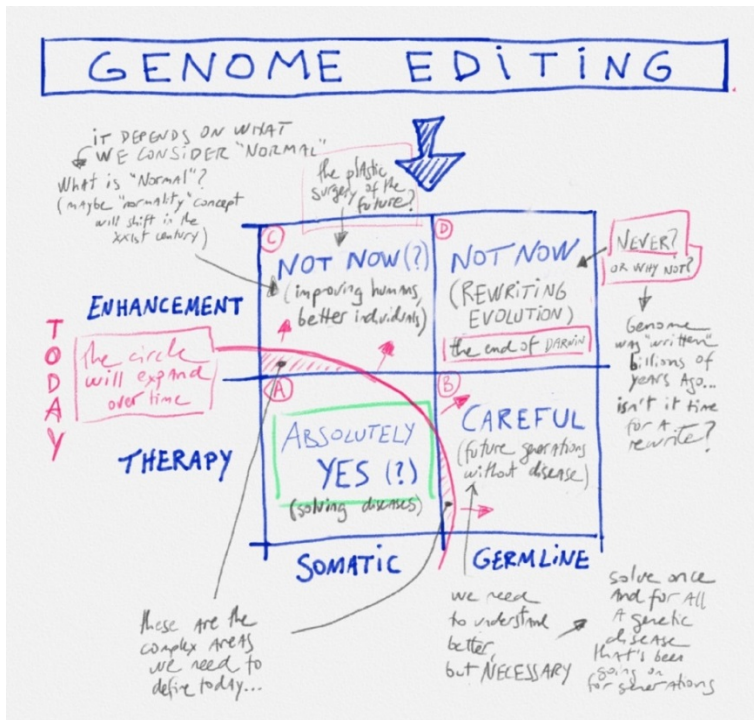


La transformació de la medicina al llarg del segle passat es podria resumir com l'evolució «de les pastilles a les cèl·lules». Els primers fàrmacs eren molècules petites (*small molecules*), substàncies simples que podien manipular algunes vies biològiques per resoldre malalties (e. g., aspirina, antibiòtics). Aquests medicaments simples van consolidar les bases d'un paradigma que diu: a) hi ha alguna cosa malament; b) dono un fàrmac, i c) mato alguna cosa. Més enllà, el món farmacèutic va evolucionar per produir fàrmacs biològics (*biologicals*), proteïnes més grans i més complexes que eren més precises i efectives en la manipulació d'aquestes vies que produeixen una malaltia (e. g., anticossos, insulina). A final del segle xx, la indústria va arribar al punt de començar a produir cèl·lules modificades com a fàrmacs (CAR-T, teràpia gènica, teràpies avançades), la qual cosa va canviar el paradigma a: hi ha alguna cosa malament, dono una cèl·lula i creix alguna cosa, que actualment domina la concepció moderna de la medicina. La indústria biofarmacèutica està entrant ara en una nova era on els laboratoris ja estan produint cèl·lules dissenyades de nou (cèl·lules construïdes amb un propòsit, cèl·lules que no existien anteriorment a la natura) per prevenir i tractar malalties.



Estem al llindar d'una explosió càmbrica de noves aplicacions, on hem anat més enllà de llegir i editar genomes per començar a escriure nous genomes, les nostres pròpies idees de com hauria de ser la vida. El codi de

vida té, aproximadament, 4 000 milions d'anys. És hora de tornar a escriure'l amb cura. Des de la perspectiva d'un inversor, sempre hi ha un moment en què una nova tecnologia canvia d'interessant a «invertible». Aquest punt ha arribat ara. L'enginyeria d'organismes vius podria convertir-se en una de les indústries més grans de les pròximes dècades. La qüestió és, per descomptat, fins on hem d'arribar? Ens estem tornant massa poderosos? A continuació podeu veure la matriu que he creat i que utilitzo per debatre els problemes ètics de la teràpia gènica.



10.15. ASPECTES ÈTICS DE L'EDICIÓ GENÒMICA

JOSEP SANTALÓ. Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona; Observatori de Bioètica i Dret, Universitat de Barcelona

4 de maig de 2020

Els aspectes ètics de les tècniques d'edició genòmica es poden abordar des de dos punts de vista diferents: des d'un punt de vista teleològic i des del punt de vista deontològic.

Prenem primer la visió de l'edició genòmica des de l'ètica teleològica. L'ètica teleològica és la que valora les conseqüències dels actes o, en aquest cas, de la tecnologia a desenvolupar. El conseqüencialisme (o utilitarisme) n'és el màxim exponent i el que fa és una anàlisi de quins són els beneficis i quins els riscos. El problema d'una aproximació d'aquesta mena és que, en les noves tecnologies com la que ens ocupa, desconeixem aquests dos termes, tant els riscos reals com els beneficis que podem esperar-ne. Davant d'aquesta situació podem optar per actuar amb cautela però si aturem la recerca evitarem, sens dubte, els riscos però ens perdrem també els possibles beneficis.

Les noves tècniques d'edició genòmica (p. ex., CRISPR-Cas9) han propiciat una disminució efectiva dels riscos metodològics de l'aplicació de la tècnica, ja que ha augmentat extraordinàriament l'especificitat, l'eficàcia i la versatilitat de la tècnica i disminuït significativament els efectes secundaris indesitjables i la dificultat, la qual cosa l'ha fet accessible a molts laboratoris d'arreu del món. Aquestes característiques són les que han fet que l'edició genòmica, que fins fa poc era considerada una mera especulació acadèmica, hagi esdevingut una realitat més que versemblant.

Des del punt de vista conseqüencialista s'ha proposat un posicionament de molta cautela davant la modificació d'espècies salvatges, per les greus conseqüències mediambientals que podria implicar (Ledford H., 2015). Quant a la seva utilització en l'espècie humana, les posicions són diferents en funció de si la modificació es planteja en adults o en línia germinal/embrionària. En el primer cas hi ha una acceptació gairebé unànime sempre que tingui una finalitat terapèutica. La situació canvia radicalment quan es tracta de l'edició genòmica en la línia germinal/embrionària. Si bé en aquest cas l'avantatge és que la modificació genètica es transmet a la descendència, la qual cosa elimina la necessitat de modificar els individus en el futur quan siguin adults, aquesta mateixa circumstància genera controvèrsia respecte a la seva consideració. Hi ha hagut un gran nombre de posicionaments (per a revisió, vegeu Santaló, 2017) però la posició més acceptada és la de permetre'n l'ús en recerca bàsica i, quan la tecnologia estigui suficientment consolidada, passar a emprar-la amb finalitats terapèutiques i deixar l'ús per a millora genètica de l'espècie humana en una moratòria *sine die* (Santaló i Casado, 2016).

Sobre l'edició genòmica des de l'ètica deontològica, d'altra banda, el punt de vista deontològic implica fer una anàlisi bioètica d'acord amb el raonament empíric, considerant allò que és intrínsecament bo o dolent. L'argument més bàsic esgrimit en contra l'edició genòmica és el del respecte a la integritat genètica. Aquest argument propugna que les modificacions genètiques atemptin contra la dignitat dels organismes modificats (siguin humans, animals, plantes o microorganismes) per quan es viola la integritat genètica de l'individu.

Aquest respecte a la integritat genètica pot ser considerat no només individualment sinó també com a espècie, de manera que hauríem de rebutjar qualsevol modificació genètica en qualsevol espècie inclosa l'espècie humana, sigui quina sigui la finalitat d'aquesta modificació. Aquesta aproximació s'alinea clarament amb les tesis bioconservadores. La qüestió està, però, en el fet que la modificació genètica d'espècies animals i vegetals fa mil·lennis que la humanitat la practica: és el procés de selecció dut a terme durant la domesticació dels animals i el desenvolupament de l'agricultura. Alguns autors argumenten, però, que aquest procés està basat en l'aparició a l'atzar de les mutacions que posteriorment seleccionarem, però el fet que la intervenció de l'atzar faci acceptable una tecnologia que no ho seria quan està tecnològicament dirigida sembla poc consistent.

Pel que fa al respecte a la integritat genètica de l'espècie humana, el màxim exponent d'aquest corrent de pensament és Hans Jonas (1903-1993), que proposa en el seu *Principio de responsabilidad*: «Actua de manera que els efectes dels teus actes siguin compatibles amb la permanència d'una vida humana genuïna» (Jonas, 1984). Davant d'aquest posicionament, Allen Buchanan (2011) argumenta que la proposta de Jonas sembla assumir axiomàticament que l'espècie humana, tal com la coneixem en l'actualitat, representa la culminació de l'evolució i que qualsevol canvi en ella ha de ser pitjor, per la qual cosa cap hem de tendir a conservar-la tal com la coneixem. Aquesta idea sembla radicalment contrària al concepte d'evolució biològica, que porta implícita la idea de canvi constant. Que aquest canvi sigui per l'atzar o dirigit des d'una voluntat intel·ligent (que no oblidem que també és fruit de l'evolució de l'espècie humana) podria marcar la diferència entre allò que és o no èticament acceptable però també podria fer perdre consistència a l'argument en si.

Dins de l'argumentació de base deontològica s'han esgrimit altres arguments a favor i en contra de l'edició genòmica que inclouen el respecte a l'autonomia individual, l'eugenèsia i el «disseny dels fills», l'equitat i la justícia distributiva, la insostenibilitat o la fal·làcia naturalista (per a una revisió, vegeu Santaló J., 2019).

Independentment de l'argumentació de base que prenem, darrerament l'edició genòmica ha estat una font important de debat ètic, sobretot arran de les notícies que arribaven des de la Xina que confirmaven l'edició genòmica de dues nenes per fer-les, eventualment, immunes al VIH (Jiankui H., 2018). Aquest esdeveniment ha disparat totes les alarmes i ha fet replantejar-se estratègies de control de la tecnologia (com per exemple propostes de moratòries) que, per les característiques de la mateixa tècnica ja esmentades, s'han reputat com a inviàbles.

El debat ètic és pertinent i imprescindible. La societat ha de participar en una decisió que pot afectar el futur de la mateixa espècie humana i ajornar-lo o deixar-lo en mans d'alguns pot tenir conseqüències irreparables per a tothom (Luna *et al.*, 2019). Ara bé, aquest debat ha d'estar basat en evidències, en

informació veraç i defugir dels apriorismes, si no, les seves conclusions estaran esbiaixades i respondran més a interessos particulars que no pas al benestar de la humanitat.

Bibliografia

- BUCHANAN, A. *Beyond humanity?: The ethics of biomedical enhancement*. [S. ll.]: Oxford Scholarship Online, 2011. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199587810.001.0001.
- JIANKUI, He. Second International Summit on Human Genome Editing. Human Embryo Editing Session [en línia]. Hong Kong, 27-29 novembre 2018. <<https://www.nap.edu/read/25343/chapter/1>> [Consulta: 22 juliol 2019].
- JONAS, H. *The imperative of responsibility: In search of an ethics for the technological age*. Chicago (EUA): Chicago University Press, 1984. ISBN: 9780226405971. Traducció de *Das Prinzip Verantwortung: Versuch einer Ethik für die technologische Zivilization* (1979).
- LEDFORD, H. «Caution urged over editing DNA in wildlife (intentionally or not)». *Nature*, 524, núm. 7563 (2015), p. 16. DOI: 10.1038/524016a.
- LUNA, F.; CASADO, M.; TURNER, S.; SANTALÓ, J. «Genome editing in humans, a topic only for academics from industrialized countries?» *Revista de Derecho y Genoma Humano: Genética, Biotecnología y Medicina Avanzada*, 51 (2019), p. 43-60.
- SANTALÓ, J.; CASADO, M. (coord.). *Document sobre bioètica i edició genòmica en humans*. [Barcelona]: Publicacions de la Universitat de Barcelona: Observatori de Bioètica i Dret de la Universitat de Barcelona, 2016. ISBN: 978-84-475-4063-1.
- SANTALÓ, J. «Edición genómica. La hora de la reflexión». *Revista de Bioética y Derecho*, 40 (2017), p. 157-165.
- SANTALÓ, J. «La mejora genética humana en los tiempos del CRISPR/Cas9». *Revista de Bioética y Derecho*, 47 (2019), p. 33-43.

10.16. L'EDICIÓ GENÈTICA A L'ARENA PÚBLICA: COMUNICACIÓ I PERCEPCIÓ SOCIAL

GEMA REVUELTA. Directora del Centre de Ciència, Comunicació i Societat, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona

4 de maig de 2020

Els temes que sobresurten en la informació pública influeixen en l'establiment de l'agenda social (allò que a una comunitat concreta d'individus li sembla important en un moment determinat), mentre que la manera com

s'ofereix la informació té efectes en les percepcions i opinions públiques sobre els problemes o conceptes en qüestió (és a dir, en les representacions socials d'una realitat).

L'ús en humans de l'edició genètica és un d'aquests temes que s'ha guanyat un lloc en l'arena pública en els darrers anys, especialment a partir de l'expansió en la utilització de la tecnologia CRISPR-Cas9. Precisament per aquest motiu, des del Centre d'Estudis de Ciència, Comunicació i Societat de la Universitat Pompeu Fabra (CCS-UPF), en col·laboració amb la Fundació Vila Casas, vam dedicar l'*Informe Quiral* de 2017 a l'estudi de la comunicació de l'edició genètica i la seva percepció social.¹ L'informe descriu com aquest tema va ser destacat als mitjans de comunicació i com aquesta major presència va coincidir amb un increment en les cerques a Google des de dispositius localitzats al territori espanyol, la qual cosa va mostrar l'efecte agenda. En aquesta investigació es va observar també que la metàfora predominant per al·ludir a aquesta tecnologia era la imatge del «retalla i enganxa». A l'informe descrivim de quina manera la metàfora *cut-and-paste* s'origina en les mateixes publicacions científiques i d'aquestes passa a mitjans més populars. És necessari reflexionar sobre l'impacte que pot tenir utilitzar una metàfora o una altra en la percepció d'un concepte per a un públic no familiaritzat. Per exemple, no és el mateix parlar de «retalla i enganxa» que de «tissors moleculars», «bisturí genètic», «apagat/encès», «tècniques per dissenyar nadons a la carta» o «edició genètica model T», que van ser altres de les metàfores utilitzades per referir-se a aquesta tecnologia. Cada metàfora s'associa a un món de referents: «Retalla i enganxa» ens fa pensar en els processadors de textos digitals sense connotacions especialment positives o negatives, «bisturí» s'associaria amb precisió, «model T» amb alguna cosa barata, etcètera.

L'edició del genoma, inclosa la tècnica CRISPR-Cas9, ha estat també objecte de debats ètics en el si de la comunitat científica i fora, especialment quan es refereixen al seu potencial ús en el context clínic. En el marc del projecte europeu NERRI (*Neuro-enhancement; Responsible Research and Innovation*), des del CCS-UPF vam participar, juntament amb investigadors d'onze països del món, en una investigació sobre les opinions i percepcions del públic sobre l'edició genètica en el camp particular de les capacitats cognitives.² En concret, es plantejaven quatre hipotètics escenaris en els quals els personatges descrits prenen decisions sobre l'ús de la tecnologia amb fins de millorar les capacitats cognitives en persones sanes (neuromillora) o malaltes (neurotractament), en adults o en l'embrió. A tots els països va predominar una actitud de més recel davant l'ús de la tecnologia en embrions que en adults, especialment quan la finalitat era de millora i no terapèutica. La indicació concreta de la tecnologia, més que la tecnologia en si mateixa, sembla que guia l'opinió del públic sobre la conformitat o no amb aquesta intervenció, si bé la discussió ètica sol estar més centrada en la tecnologia.

Explorar amb més profunditat com es produeix la comunicació sobre edició genètica i quines opinions i actituds manifesta el públic poden ajudar no només a intentar millorar la seva comunicació, sinó que són aspectes que s'haurien de tenir en compte a l'hora de prendre decisions sobre la mateixa tecnologia i el marc ètic en el qual s'ha de desenvolupar.

Bibliografia

- REVUELTA, G.; SANTAMARIA, M.; RAMÍREZ, A.; BARBOSA, L.; GONZALO, C.; ARMENGOU, C. *Informe Quiral 2017* [en línia]: *La edición genética ante la sociedad*. Barcelona: Fundació Vila Casas, 2018. <<https://www.fundaciovilacasas.com/es/informe-quiral>>.
- GASKELL, G.; BARD, I.; ALLANSDOTTIR, A.; VIEIRA DA CUNHA, R.; EDUARD, P.; HAMPEL, J.; HILDT, E.; HORMAIER, C.; KRONBERGER, N.; LAURSEN, S.; MEIJKNECHT, A.; NORDAL, S.; QUINTANILHA, A.; REVUELTA, G.; SALADIÉ, N.; SÁNDOR, J.; BORLINDO SANTOS, J.; SEYRINGER, S.; SINGH, I.; SOMSEN, H.; TOONDERS, W.; TORGENSEN, H.; TORRE, V.; VARJU, M.; ZWART, H. «Public views on gene editing and its uses». *Nature Biotechnology* [en línia], 35 (2017), p. 1021-1023. <<https://doi.org/10.1038/nbt.3958>>.

