¿Se puede evitar la transmisión de enfermedades mitocondriales? Valoración médica y ética

Justo Aznar,* Lucía Gómez-Tatay,**
José Miguel Hernández-Adreu, Julio Tudela,*******
José Rafael Blesa*****

Resumen

El 24 de febrero de 2015 se aprobó por el Parlamento Británico el uso de la transferencia mitocondrial (TM), para prevenir la transmisión de enfermedades mitocondriales (TEM).

El uso de la TM para prevenir la TEM plantea indudables problemas éticos, de los que no es el menor la posibilidad de modificar la línea germinal y, desde un punto de vista social, la producción de niños vinculados genéticamente a tres personas, la madre con las mitocondrias alteradas, la donante de las mitocondrias sanas y el varón utilizado para fecundar el óvulo sano producido.

Para evitar esta circunstancia recientemente se han propuesto dos nuevas técnicas, la CRISPR/Cas9 y la TALENs, que evitan el uso de la transferencia mitocondrial, minimizando algunos de los problemas que esta técnica conlleva. Ambas técnicas consisten en reparar el ADN mitocondrial, mediante la sustitución de determinados fragmentos por otros de las características que se deseen (CRISPR/Cas9) o su supresión (TALENs). Se pretende aplicar estas técnicas en la corrección directa de las anomalías genéticas de las mitocondrias humanas alteradas. También se pueden utilizar para tratar problemas de infertilidad de causa mitocondrial. Este trabajo es una aproximación al estado actual de la

* Autor correspondiente: Justo Aznar. Email: justo.aznar@ucv.es
C/Guillem de Castro, 94. 46003. Valencia. Teléfono: 963637412. Fax: 963153655.
Universidad Católica de Valencia. Instituto de Ciencias de la Vida.

investigación en este campo, analizando tanto los avances tecnológicos y biomédicos más recientes como las consecuencias bioéticas que de ellos pueden derivarse.

Abstract

Is it possible to avoid the transmission of mitocondrial diseases? Ethical and medical asessment

On February 24, 2015 the use of mitochondrial transfer (MT) to prevent transmission of mitochondrial diseases (MDT) was passed by the British Parliament.

The use of MT to prevent MDT raises undoubted ethical problems, which is not the least the possibility of modifying the germ line and from a social point of view, the production of children genetically related to three people, the mother with altered mitochondria, the donor of healthy mitochondria and the male used to fertilize the healthy egg produced.

Recently, two new techniques have been proposed, the CRISPR/Cas9 and TALENs, that exempt mitochondrial transfer process, minimizing some of the problems that this entails. Both techniques consist in repairing the anomalous fragments of mitochondrial DNA, by replacing them by others with the desired features (CRISPR / Cas9) or deletion of specific fragments (TALENs).

These techniques are intended to apply to the direct correction of the altered genetic abnormalities of human mitochondria. They can also be used to treat infertility problems with a mitochondrial cause. This paper is an approach to the current state of research in this field, analyzing both the latest technological and biomedical advances as bioethical consequences that may result from them.

Palabras clave: Transferencia mitocondrial, enfermedades mitocondriales, CRISPR/Cas9, TALENS, aspectos éticos, infertilidad de causa mitocondrial.

Key words: Mitochondrial transfer, mitochondrial diseases, CRISPS/-Cas9, TALENs, ethical aspects, mitochondrial disease related infertility.

Introducción

Las mitocondrias son pequeños orgánulos presentes en el citoplasma de la mayoría de células, y contienen un ADN circular de 16.569 pb que codifica 37 genes, 13 de los cuales corresponden a proteínas clave en el metabolismo celular al ser parte responsable de la producción de energía en la célula. Por ello, cuando las mitocondrias se alteran por mutaciones en su ADN (ADNmt) se provoca una carencia de energía celular que afecta a distintos órganos, favoreciendo el desarrollo de enfermedades que llegan a ser graves, y que incluso pueden conducir a una muerte temprana. En 1988 se identificaron por primera vez mutaciones en el ADNmt que eran la base molecular de las patologías mitocondriales. [1, 2]

Estas enfermedades afectan aproximadamente a una persona de cada 5 mil, mientras que una de cada 200 personas sanas es portadora de una mutación mitocondrial patológica, que podría pasar a los hijos y manifestarse como enfermedad.

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz para las enfermedades mitocondriales, por lo que parte de la investigación médica va dirigida a desarrollar técnicas para prevenir su transmisión a la descendencia. Con este objetivo, en los últimos años se han puesto a punto dos nuevas técnicas, la "maternal spindle transfer" (MST) y la "pronuclear transfer" (PNT). En la PNT se producen *in vitro* dos embriones de una sola célula (cigotos), uno a partir del óvulo de la madre que tiene las mitocondrias alteradas, y otro a partir del óvulo de una mujer con mitocondrias normales. Posteriormente se extrae el núcleo del cigoto de la mujer que padece la anomalía mitocondrial y se transfiere al cigoto de la mujer sana

previamente enucleado, produciéndose así un nuevo cigoto, cuyas mitocondrias son normales. Tras ser activado este último cigoto se puede desarrollar in vitro hasta alcanzar un estado evolutivo adecuado para poder ser transferido al útero materno.

En la MST, en cambio, se extrae el núcleo del ovocito de la mujer con las mitocondrias alteradas y se transfiere al ovocito, previamente enucleado, de la mujer con mitocondrias normales. Así se obtiene un nuevo ovocito con mitocondrias normales, que posteriormente se fertiliza *in vitro* y se transfiere al útero de la madre.

Historia de la transferencia mitocondrial

Según refieren Cohen, Savulescu y Adashi,[3] la historia de la trasferencia mitocondrial (TM) comenzó en 2005 cuando la "Human Fertilisation and Embryology Authority" (HFEA), agencia británica independiente que regula los temas relacionados con la fertilidad humana, autorizó el inicio de una investigación en el "Newcastle Center for Mitochondrial Research", de esa ciudad inglesa, encaminada a tratar de impedir la trasmisión de las enfermedades mitocondriales (TEM), aunque en ese momento el desarrollo de ensayos clínicos para evitar la transmisión de estas enfermedades no estaba autorizado en el Reino Unido. Sin embargo, en el 2008, el Parlamento británico modificó la ley para autorizar a la HFEA a promover ensayos clínicos dirigidos a evitar la TEM. Para profundizar en este estudio, en 2011, la HFEA organizó una reunión de expertos sobre el tema para evaluar la efectividad y seguridad de las técnicas dirigidas a evitar la TEM, que concluyó que éstas eran inseguras por el momento. En 2012, la HFA realizó una consulta pública para evaluar la opinión ciudadana, sobre aspectos éticos y médicos de la TEM, comprobando que la opinión para el uso de estas técnicas era favorable entre la ciudadanía británica. En febrero de 2015, la Cámara de los Comunes del Parlamento britá-

nico aprobó el uso de una técnica encaminada a evitar la TEM y el día 24 del mismo mes también lo hizo la Cámara de los Lores, lo que daba luz verde a su uso. En dos países más se pueden usar las técnicas para evitar la TEM, Estados Unidos y China.

En Estados Unidos, en contra de lo que ocurre en el Reino Unido, no existe un organismo gubernamental específico que regule legalmente el uso de las técnicas de reproducción asistida. En el caso de la TEM, su control lo asume la "Food and Drug Administration" norteamericana (FDA).

El primer intento para controlar estas técnicas se llevó a cabo cuando, en 2014, la FDA promovió una normativa para regular la modificación genética de los ovocitos en las técnicas de reproducción asistida, dirigida a evitar la TEM, pero diversos expertos opinaron que no había bastantes datos para iniciar ensayos clínicos en humanos. Por el momento, no se esperan nuevas decisiones de la FDA sobre esta materia.

En China, estas prácticas no están reguladas legalmente, por lo que en dicho país, como más adelante referiremos, se han llevado a cabo experimentos,[4] no siempre bien controlados, al amparo del vacío legal existente.

Nuevas técnicas para evitar la TEM

Hasta el momento, la modificación del genoma con fines experimentales y clínicos se fundamentaba principalmente en la sinergia entre dos poderosas tecnologías: la secuenciación del ADN y la ingeniería genética. Sin embargo, hoy en día, la posibilidad de modificar el genoma utilizando ambas técnicas es limitada. Pero ahora, se plantean nuevas posibilidades de edición del genoma por la puesta a punto de un nuevo y revolucionario método denominado "Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas", conocido por sus siglas en inglés: (CRISPR)/Cas9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats).[5]

Método "CRISPR)/Cas9"

Es ésta una técnica que permite cortar el ADN por medio de una enzima llamada Cas9, una endonucleasa, que reconoce determinados lugares caracterizados por la presencia de unas secuencias cortas palindrómicas. Una vez cortada y separada la secuencia que se quiere eliminar, se pueden insertar en ese hueco otras secuencias de ADN, las específicamente deseadas, consiguiéndose así que las células tratadas adquieran propiedades nuevas encaminadas a conseguir el objetivo biomédico que se persigue. A esta práctica se le denomina "edición de gene".

Como ya se ha comentado, hasta ahora, para tratar de evitar la TEM se han propuesto la MST y la PNT, que requieren el uso de ovocitos de dos mujeres, la enferma y otra sana. Ahora, con la CRISPR/Ca9, se ha descrito, como prueba de concepto, que se podrían corregir directamente las mitocondrias alteradas sin necesidad de utilizar ovocitos de otra mujer.[6] Esta técnica se puede llevar a cabo, tanto en ovocitos patológicos antes de fecundarlos, como tras la generación del embrión. En ambos casos se altera la línea germinal, lo que abre nuevas posibilidades de manipulación de la misma, con posibles e importantes repercusiones éticas, a las que más adelante nos referiremos.

Método "mito-TALENs"

Esta técnica ha sido utilizada para tratar enfermedades mitocondriales por el equipo de Izpisua, de La Jolla, California (EUA), en colaboración con investigadores de Miami (EUA), Kobe (Japón), Urbana (EUA), Barcelona (España) y Pekín (China), en un artículo publicado el pasado 23 de abril.[7] Hasta ahora, el grupo de Izpisua ha conseguido eliminar selectivamente el ADN mitocondrial alterado, causante de las enfermedades mitocondriales anteriormente

comentadas, tanto en ovocitos de ratones sin fecundar, como en embriones murinos, consiguiendo además que de estos ratones genéticamente modificados nacieran ratones sanos en dos generaciones sucesivas.

Un aspecto tecnológico de interés a destacar en las experiencias de Izpisua y su grupo, es que diseñaron enzimas específicas, las denominadas TALENs, para cortar el ADN mitocondrial por los lugares deseados. Las TALENs, del acrónimo inglés de "Transcription Activator-Like Effector Nucleases", son enzimas de restricción, producidas artificialmente, que cortan partes específicas de ADN. Cuando la acción de los TALENs se dirige específicamente a las mitocondrias, es decir, a cortar el ADN mitocondrial, se denominan mito-TALENs.

Pero una pregunta que surge de inmediato es, ¿se pueden corregir con esta técnica todas las mitocondrias alteradas, para así evitar su transmisión y, consecuentemente, la enfermedad mitocondrial?

En relación con ello, conviene recordar que para que se produzca una enfermedad mitocondrial no hace falta que todas las mitocondrias estén alteradas. En efecto, normalmente en las células de las mujeres afectadas existen distintas poblaciones de ADNmt, normal y alterado, lo que se denomina heteroplasmia. Para que la enfermedad se manifieste, es necesario sobrepasar un umbral en la proporción de ADNmt mutado, que es variable en distintas patologías mitocondriales.

Por ello, utilizando la técnica propuesta por Izpisua, no es necesario eliminar todas las copias mutadas, basta con que éstas no superen el umbral ya comentado, generalmente superior al 60%.

Izpisua y colaboradores ya han aplicado su técnica en la prevención de la TEM en ratones afectados de neuropatía óptica hereditaria de Leber, debilidad neurogénica muscular, retinitis pigmentaria y ataxia. El objetivo actual es trasladar sus estudios a mujeres portadoras de enfermedades mitocondriales para lo que, al parecer, están tramitando los permisos legales necesarios.

Algunos de los problemas éticos de la trasferencia mitocondrial

Entre las cuestiones éticas que la TM plantea, dos son las más relevantes. La primera es que supone una modificación genética de la línea germinal y, la segunda, que plantea en los niños nacidos tras la aplicación de esta técnica, un conflicto derivado de su vinculación genética a tres personas, la madre con las mitocondrias alteradas, la donante de las mitocondrias sanas y el varón utilizado para fecundar el óvulo sano producido.

Adicionalmente a ello hay que tener en cuenta que siempre, para conseguir los objetivos que se pretenden, utilizando estas técnicas, es necesario recurrir a la fecundación in vitro que, como se sabe, presenta unas dificultades éticas objetivas.

Modificación genética de la línea germinal

En relación con la primera dificultad, la modificación genética de la línea germinal, el problema más grave que se plantea es que si se producen alteraciones en el ADN de los gametos, dichas alteraciones se transferirán a los hijos y a las generaciones futuras. Por ello, cualquier técnica que modifique la línea germinal, hay que evaluarla rigurosamente.

Si estas modificaciones se realizan en el ovocito o el cigoto, se está modificando la línea germinal en sentido estricto: estas modificaciones pueden heredarse, lo que exigiría disponer de la certeza suficiente de que el procedimiento empleado procurará el efecto beneficioso buscado (corrección de una anomalía), y no otras alteraciones de consecuencias impredecibles y transmisibles genéticamente.

Sin embargo, en relación con ello, es importante establecer una diferencia entre el ADN del núcleo (ADNn) y el de las mitocondrias, pues el ADN de estas últimas, que es el que se manipula en

la técnica que estamos comentando, tiene como misión fundamental, como ya se ha comentado, la producción de energía celular, por lo que se piensa que su posible modificación no plantearía los mismos problema éticos que la modificación del ADNn. Sin embargo, aunque no está claramente establecido si las modificaciones del ADNmt podrían influir en el ADNn, sí que es relevante la comunicación entre ADNn y ADNmt.[8] En relación con ello, un estudio concluye que "genes mitocondriales codifican proteínas implicadas en la respiración celular, que interactúan estrechamente con las proteínas codificadas por los genes nucleares. La respiración funcional requiere la coadaptación de los genes mitocondriales y nucleares, a pesar de tempi divergente y modos de evolución".[9] Ésta podría ser una explicación plausible a la complejidad genética de las enfermedades mitocondriales humanas.[10] La presencia de un determinado ADNmt es responsable del funcionamiento concreto de las células y en definitiva de un organismo, generando susceptibilidad a ciertas patologías.[11] Existen diferentes haplogrupos (de la "A" a la "Z") de ADNmt entre los seres humanos, que corresponden a diferentes cambios en la molécula de ADNmt. Es decir, si bien las secuencias de distintos haplogrupos tienen una homología superior al 98%, existen diferencias en cuanto a la composición de nucleótidos, constatándose uno o dos cambios. Tienen un origen geográfico durante el proceso evolutivo y es habitual que se identifiquen en diferentes etnias.

Un caso que pone de manifiesto la importancia de ese fenómeno es la existencia en un individuo africano de un haplogrupo (L) distinto al de un esquimal (C). Como consecuencia de ello, las mitocondrias del esquimal se dedican más a la producción de calor que a la síntesis de energía. Una mutación patogénica en el ADNmt no se manifiesta de la misma manera en un haplogrupo que en otro. Estas variaciones no se presentarían en el caso de la homoplasmia, aunque esta circunstancia sólo se da durante las primeras etapas del desarrollo de un nuevo individuo (no en vano el ovocito

fecundado elimina por completo todas las mitocondrias que se han introducido del gameto masculino en el proceso de fertilización),[12] ya que posteriormente se producen mutaciones genéticas a lo largo de la vida que acaban configurando una heteroplasmia en muchos tejidos. De estos hechos se deriva la propuesta de un emparejamiento de haplogrupo en el caso de terapias que afecten al ADNmt.[13] Consecuentemente, dados los datos que se empiezan a reportar, debería evaluarse de manerta cuidadosa cualquier modificación del ADNmt que se transferira a las futuras generaciones, extremo que no sabemos si se ha tomado en cuenta suficientemente por el Parlamento británico, autorizando la TM.

Todo lo anterior, nos parece que obliga a reflexionar sobre la autorización de una técnica, que indudablemente tiene aspectos positivos, en cuanto impida la transmisión de enfermedades mitocondriales a los hijos, pero que también presenta las dificultades éticas a las que nos estamos refiriendo.

Como se ha comentado, posiblemente el principal problema ético que tiene la TM utilizada para impedir la TEM, es que supone una modificación de la línea germinal humana. Ello ha animado a realizar una profunda reflexión ética sobre este tema, especialmente por los investigadores que la utilizan. Algo parecido a lo ocurrido cuando se empezó a utilizar la terapia génica.

Valoración ética del uso de CRISPS-Cas9 y TALENs

Según comentaba el pasado 20 de marzo G. Vogel, en *Science*, en 1975 la posibilidad de manipular el genoma humano parecía muy remota.[14] Sin embargo ahora, con la puesta a punto de técnicas tan novedosas como CRISPS-Cas9 y TALENs, esta posibilidad parece mucho más cercana, en especial por su simplicidad tecnológica, lo que las hace asequibles a muchos laboratorios. Incluso, existen rumores de que investigadores chinos ya han utilizado CRISPR en embriones hu-

manos, y conseguido embarazos con embriones genéticamente modificados, (4) con el riesgo técnico y ético que ello comporta.

Con la finalidad de evaluar estos hechos, Jennifer A. Doudna, bióloga molecular de la Universidad de California, en el campus de Berkeley, convocó el pasado mes de enero en Napa (California) una reunión con científicos, eticistas y juristas, para tratar de establecer qué pasos debería seguir la comunidad científica para garantizar que estas nuevas tecnologías sean utilizadas con seguridad técnica y rigor ético. En relación con ello, el pasado 23 de abril se publicó en *Science* un artículo firmado por 18 cualificados científicos,[15] entre ellos la propia Doudna y el Nobel Paul Berg, que también fue uno de los promotores de la Conferencia de Asilomar, y otro en *Nature*, el 26 de marzo, firmado por Edward Lanphier y Fyodor Urnov,[16] con la misma finalidad.

En el trabajo de los 18 expertos, se hace especial hincapié en las consecuencias que puede tener el uso de CRISPR/Cas9, dada la posibilidad de utilizar esta técnica en muchos laboratorios por su simplicidad técnica.15

También hacen referencia a que en la reunión de Napa no se piensa abordar el tema de la transferencia mitocondrial, pues estiman que ésta no modifica la línea germinal, aunque como con anterioridad hemos comentado, las implicaciones de la TM en la línea germinal no pueden ser, a nuestro juicio, obviadas.

Como conclusión, el grupo de Napa propone cuatro recomendaciones que se podrían tener en cuenta, ante la posibilidad de utilizar estas nuevas tecnologías:

1. Proponer con firmeza, que no se ponga en marcha ningún intento de modificar el genoma humano para uso en la clínica hasta que todos los aspectos médicos y éticos se discutan entre científicos, eticistas y organizaciones gubernamentales.
2. Crear fórums en los que los científicos y bioeticistas aporten información sobre todo lo que afecte a esta nueva era de la biotecnología humana.

3. Animar a que se comunique con total transparencia todo lo que afecte al uso del CRISPR/Cas9 cuando se utilice con la finalidad de modificar el genoma, tanto en humanos como en no humanos, y su posible aplicación a terapias que afecten a la línea germinal.
4. Promover la creación de un grupo constituido por investigadores expertos en genética, juristas, eticistas, así como representantes de la comunidad científica, público general, agencias gubernamentales de prestigio y grupos que tengan intereses de cualquier tipo en esta área de la ciencia, para reflexionar sobre las consecuencias del uso de estas nuevas técnicas y proponer adecuadas recomendaciones para ordenar estas prácticas.

También en el trabajo de *Nature* (16), Lanphier y Urnov proponen que, como en Asilomar, se debería establecer una moratoria para cualquier tipo de experiencias que conlleven editar genes humanos, tanto en embriones como en células de las que pudieran derivarse espermatozoides u ovocitos, ya que, según ellos, editar el genoma humano, utilizando las nuevas tecnologías ya comentadas, podría tener efectos impredecibles para las nuevas generaciones, a la vez que, según afirman Lanphier y Urnov, no existe ninguna posibilidad objetiva de que en el momento actual sirvan para obtener beneficios terapéuticos adicionales a los que ya se pueden conseguir por los medios técnicos actualmente disponibles. Además, otra dificultad ética importante, es que los posibles defectos que puedan tener los embriones genéticamente modificados no se conocerían hasta después del nacimiento de los niños modificados, lo que agrava el problema.

Como consecuencia de todo ello, en 15 de 22 naciones europeas está prohibido utilizar técnicas que modifiquen la línea germinal. En Estados Unidos, aunque no están legalmente prohibidas las técnicas que producen modificaciones en dicha línea, el "National Institute of Health Recombinant DNA Advisory Committee" manifiesta que "hasta el presente no ha recibido ninguna propuesta para realizar estudios que modifiquen la línea germinal".

Posibilidad de utilizar la CRISPR/Cas9 en el campo de la fertilidad humana

Está bien establecido que los ovocitos de algunas pacientes de edad reproductiva avanzada (más de 35 años) que acuden a las técnicas de reproducción asistida, tienen significativamente reducida su fertilidad, a lo que puede contribuir una función mitocondrial subóptima. Por este motivo se llevaron a cabo exitosos intentos a principio de siglo para regenerar la edad de los ovocitos mediante infusión de citoplasma/mitocondrias recolectadas de ovocitos de donantes en edad reproductiva temprana.[17]

Se encontró que este trasplante citoplásmico generó heteroplasmia de ADNmt del donante a la descendencia en los amniocitos, la placenta y la sangre de cordón umbilical. Estos intentos se paralizaron y la técnica de transplante ooplásmico de mitocondrias se prohibió en EUA y fuera, después de reportarse una alta incidencia de defectos de nacimiento y anomalías en el desarrollo de bebés con reemplazo mitocondrial.[18]

Recientemente se ha reforzado la idea de que también las mitocondrias juegan un papel importante en la fecundación humana, lo que ha animado a grupos de investigadores, fuera de Estados Unidos, a evaluar la transferencia mitocondrial en mujeres con problemas de infertilidad, posiblemente relacionados con mitocondrias alteradas o viejas.[19]

En relación con ello, la firma OvaScience, de Massachusetts, propone utilizar la terapia mitocondrial para tratar estos problemas de infertilidad. La técnica propuesta consiste en tomar una pequeña pieza de tejido del ovario femenino. De ovocitos inmaduros de ese tejido se extraen mitocondrias que se trasfieren, junto con espermas, al óvulo maduro de la mujer que se desea tratar. Si se produce un embrión, éste se trasfiere al útero materno, como se hace en las técnicas de procreación asistida.

Esta técnica denominada por OvaScience, "Augment", ya se oferta en Estados Unidos, Canadá, Turquía y Dubai. (19)

Según Robert Casper del Centro de Tecnologías Avanzadas de Toronto, en Canadá, en una reunión reciente en San Francisco se muestran resultados del tratamiento con "Augment". (19) De 19 mujeres incluidas en el ensayo, en 17 se produjeron embriones que fueron transferidos al útero de una mujer, consiguiendo 9 embarazos. Todas las mujeres habían sido sometidas a entre uno y tres ciclos de fecundación *in vitro* sin éxito. Es decir, se consiguió un índice de embarazos de 35%. En estas mujeres se comprobó que muchas de ellas tenían ovocitos y embriones de baja calidad, por ello, la posibilidad de obtener un embarazo era menor de 10%.

También en el mismo congreso celebrado en San Francisco, en el que se presentaron estos resultados, médicos turcos presentaron un embarazo conseguido con "Augment", que estaba en curso.

Sin embargo, otros expertos consideran que para que estos resultados, utilizando "Augment" sean tomados en consideración es necesario realizar pruebas con un grupo control y ensayos clínicos bien planificados; pero representantes de OvaScience manifiestan que las clínicas de fertilidad no necesitan este tipo de ensayos para utilizar esta nueva tecnología. En relación con ello, John Eppis, experto en biología de la reproducción del "Jackson Laboratory", en Bar Harbour (Maine), se muestra muy escéptico ante el uso de estas técnicas en humanos, sin que previamente se hayan realizado experiencias en animales, lo que a su juicio presupone que no se conozcan las consecuencias de añadir mitocondrias a un ovocito maduro. También la FDA norteamericana sostiene que estas técnicas no han sido suficientemente evaluadas preclínicamente para poder ser utilizadas en ensayos humanos, por lo que se necesitan estudios adicionales en animales para demostrar su seguridad y eficacia. (19) Además, recomienda que si se aplica la técnica se haga un seguimiento de los niños nacidos hasta la edad adulta para comprobar cómo evolucionan.

Referencias bibliográficas

[1] HOLT I., AE J, MORGAN HUGHES J. *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature*; 1988: 331, 717-9.

[2] WALLACE D., SINGH G., LOTT M., HODGE J., SCHURR T., LEZZA A., *et al*., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. *Science*; 1988: 242, 1427-30.

[3] COHEN IG., SAVULESCU J., ADASHI EY. *Transatlantic lessons in regulation of mitocondrial replacement therapy. Science*; 2015: 348, 178-180.

[4] LIANG P., XU Y., ZHANG X., DING C., C., HUANG R., ZHANG Z., *et al*., crispr/*Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes.* Protein Cell; 2015: DOI 10.1007/s13238-015-0153-5.

[5] DOUDNA JA., CHARPENTIER E., *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science*; 2014: 346, 1258096.

[6] AREUM J., SANGWOO H., GUM HWAL L., *et al*., *Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9*. BioMed Research International; 2015: 1-10.

[7] REDDY P., OCAMPO A., SUZUKI K., K., LUO J., BACMAN SR., WILLIAMS SL., *et al*., *Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing.* Cell; 2015: 161, 459-69.

[8] KOTIADIS V., DUCHEN M., OSELLAMEA L. *Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health* (KOTIADIS *et al*., 2014. Apr 2014: 1840(4), 1254-1265. doi: 10.1016/ j.bbagen.2013.10.041). Biochim Biophys Acta; 2014: 1840(4), 1254-65.

[9] LANE N. *Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations* drives ageing within generations. Bioessays; 2011: 33(11), 860-9.

[10] MEIKLEJOHN C., HOLMBECK M., SIDDIQ M., ABT D., RAND D., RAND D., MONTOOTH K. *An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in Drosophila*. PLoS Genetics; 2013: 9(1).

[11] KENNEY MC CMASEA. *Mollecular and Bioenergetic Differences between Cells with African versus European Inherited Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for Population Susceptibility to Diseases.* Biochimica et biophysica acta; 2014: 1842(2), 208-19.

[12] SONG W., BALLARD J., YI Y., SUTOVSKY P. *Regulation of mitochondrial genome inheritance by autophagy and ubiquitin-proteasome system: implications for health, fitness, and fertility*. BioMed Research International; 2014: 1-16.

[13] BURGSTALLER J., JOHNTON I., JONES N., ALBRECHTOVA J., KOLBE T., VOLGL C., *et al*., *mtDNA Segregation in Heteroplasmic Tissues Is Common In Vivo and Modulated by Haplotype Differences and Developmental Stage*. Cell Reports; 2014: 7(6), 2031-41.

[14] VOGEL G. *Embryo engineering alarm*. *Science*; 2015: 347, 1301.

[15] BALTIMORE D., BERG P., BOTCHAN M., CARROLL D., CHARORA., CHURCH G., *et al*., A *prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification*. *Science*; 2015: 348, 36-38.

[16] LANPHIER E., URNOV F., HAECHAECKER S., WERNER M., SMOLENSKI J. *Don't edit the human germ line*. *Nature*; 2015: 519, 410-411.
[17] BARRITT J., BRENNER C., MALTER H., COHEN J. *Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation*. Human Reproduction; 2001: 16(3), 513-6.
[18] BARRITT J, BRENNER C, MALTER H, COHEN J. *Rebuttal: interooplasmic transfers in humans.* Reprod Biomed Online; 2001: 3(1), 47-8.
[19] COUZIN-FRANKEL J. *Eggs*' *power plants energize new IVF debate.* Science 348; 2015: 14-15.