



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
Edición Genética Humana con CRISPR/Cas9. Contexto Ético y
Regulatorio.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
MAYRA GUADALUPE ALCALÁ GARCÍA



CDMX

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: BENJAMIN RUÍZ LOYOLA**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET**

SECRETARIO: **Profesor: JOSÉ LANDEROS VALDEPEÑA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARÍA KENIA ZAMORA ROSETE**

2° SUPLENTE: **Profesor: FERNANDO SANTIAGO GÓMEZ MARTÍNEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA:



BENJAMÍN RUÍZ LOYOLA

SUSTENTANTE:



MAYRA GUADALUPE ALCALÁ GARCÍA

Contenido

Siglas y abreviaturas	4
Índice de figuras	6
Índice de tablas	6
1.0 Introducción	7
2.0 Generalidades	9
2.1 Edición genética	9
2.2 Mecanismos de reparación del DNA	11
2.2.1 Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ)	11
2.2.2 Reparación Dependiente de Homología (HDR)	13
2.3 Tipos de ediciones genéticas	18
2.3.1 Knockout	18
2.3.2 Deleción de genes	19
2.3.3 Corrección genética	19
2.3.4 Inserción de genes	20
2.4 Herramientas de edición genética	21
2.4.1 Meganucleasas (MN)	21
2.4.2 Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)	22
2.4.3 Nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN)	23
3.0 CRISPR/Cas	23
3.1 Historia de CRISPR/Cas	23
3.2 Descubrimiento de la función de CRISPR/Cas	24
3.3 CRISPR/Cas como un sistema inmune adaptativo	26
3.3.1. Adquisición o adaptación	27
3.3.2. Expresión de genes CRISPR RNA y Cas:	28
3.3.3. Interferencia CRISPR	28
3.4 Tipos de sistemas CRISPR/Cas	30
3.5 Estructura de la proteína Cas9	30
3.6 Mecanismo de acción de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética	31
3.7 Formatos de CRISPR/Cas9 para su administración	34
3.8 Sistemas de entrega para administrar CRISPR/Cas9 en células	35
3.8.1 Vectores virales	36

3.8.1.1	Vectores Adenovirales (AdV).....	36
3.8.1.2	Vectores Virales Adenoasociados (AAVV)	37
3.8.1.3	Vectores Lentivirales (LV).....	37
3.8.2	Vectores no virales	38
3.8.2.1	Electroporación.....	38
3.8.2.2	Microinyección	39
3.8.2.3	Deformación mecánica de la célula	40
3.8.2.4	Inyección hidrodinámica	40
3.8.2.5	Transducción inducida por osmocitosis y propanebetaína (iTOP)...	40
3.8.2.6	Lípidos	41
3.8.2.7	Polímeros	42
3.8.2.8	Péptido penetrante de células (CPP).....	42
3.8.2.9	Nanopartículas de oro	43
3.9	Aplicaciones de CRISPR/Cas9	47
3.9.1	Investigación de laboratorio de ciencia básica.....	47
3.9.2	Usos clínicos de la edición de células somáticas para el tratamiento y prevención de enfermedad y discapacidad.....	49
3.9.3	Edición de la línea germinal y cambios hereditarios	51
3.9.3.1	Lulu & Nana.....	54
3.9.3.2	CCR5 como blanco genético	56
3.9.3.3	Respuesta regulatoria al experimento de He Jiankui	58
3.9.4	Uso de la edición del genoma para "mejora"	59
4.0	Ventajas y retos para la aplicación clínica del sistema CRISPR/Cas9	60
4.1	Ventajas del sistema CRISPR/Cas9	60
4.2	Retos para la aplicación clínica del sistema CRISPR/Cas9	61
4.2.1	Sistemas de entrega	61
4.2.1.1	Entrega in vivo	61
4.2.1.2	Entrega ex vivo	63
4.2.2	Efectos no deseados dentro y fuera de blanco	63
4.2.3	Monitoreo de efectos no deseados dentro y fuera del blanco.....	64
4.2.4	Influencia de p53.....	64
4.2.5	Control espaciotemporal de la actividad de CRISPR/Cas9	66
4.2.6	Inmunogenicidad y seguridad	67

4.2.7 Requisito del Motivo Adyacente del Protoespaciador (PAM)	67
5.0 CRISPR/Cas9 vs. otras tecnologías de edición genética	68
6.0 Marco regulatorio internacional y nacional de la modificación genética humana	70
6.1 Regulación Internacional sobre la edición genética de la línea germinal humana (HGGE)	70
6.2 Regulación nacional mexicana sobre la edición genética de la línea germinal humana (HGGE)	73
6.3 Recomendaciones para la construcción de un robusto sistema regulatorio nacional.....	76
6.4 Recomendaciones para la construcción de un sistema de coordinación y colaboración global	79
7.0 Consideraciones éticas acerca de la edición genética humana	81
7.1 Consideraciones éticas derivadas del posible fracaso de la HGGE.....	81
7.1.1 Riesgos desconocidos e impredecibles de crear nuevas variantes del genoma.....	81
7.1.2 Potencial de daño que se extenderá a múltiples generaciones	82
7.2 Consideraciones éticas derivadas del éxito de la HGGE	82
7.2.1 Desafiando el papel de Dios en la creación.....	82
7.2.2 Falta de consentimiento informado	83
7.2.3 Impacto negativo en personas con discapacidades relacionadas con variantes genéticas.....	83
7.2.4 Mejora de la raza humana	84
7.2.5 Bebés de diseño	85
7.2.6 Edición del genoma para la prevención de enfermedades	86
7.2.7 Creación de presión social para modificar a los niños para mantener un campo de juego nivelado con niños modificados por otros padres.....	86
7.2.8 Desigualdad social.....	87
8.0 Conclusión.....	87
9.0 Referencias	90

Siglas y abreviaturas

AAVV	Vectores virales adenoasociados
AdV	Vectores adenovirales
APLF	Apraxina y el factor similar a PNK
ATP	Adenosín trifosfato
BIR	Replicación inducida por rotura
BLM	Proteína helicasa del síndrome de Bloom
bp	Pares de bases
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CAR – T	Células T con receptor de antígeno quimérico
Cas	Asociados a CRISPR
Cas9	Proteína 9 asociada a CRISPR
CIBIOGEM	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados
CPP	Péptidos penetrantes de células
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas
CRISPRa	Activación CRISPR
CRISPRi	CRISPR de interferencia
crRNA	RNA CRISPR
dCas9	Cas9 catalíticamente inactiva
DBsgRNA	sgRNA de doble ruptura
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs	Proteína cinasa dependiente de DNA
DOF	Diario oficial de la federación
DSB	Ruptura de doble cadena
EMA	Autoridad Europea de Medicamentos
ESHG	Sociedad Europea de Genética Humana
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
E.U.A.	Estados Unidos de América

EXO1	Exonucleasa 1
FDA	Administración de Medicamentos y alimentos
GCR	Reordenamientos cromosómicos macroscópicos
GE	Edición genética
HDR	Reparación dependiente de homología
HGGE	Edición genética de la línea germinal humana
HJ	Estructuras de Holliday
HSPC	Células madre y progenitoras hematopoyéticas
INDEL	Inserciones y/o deleciones
iTOP	Transducción inducida por osmocitosis y propanebetaína
LGS	Ley General de Salud
LIG4	Ligasa de DNA IV
LV	Vectores lentivirales
MMEJ	Unión de extremos mediada por microhomología
MN	Meganucleasas
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
NHEJ	Unión de extremos no homologos
OGM	Organismo genéticamente modificado
OTE	Efecto fuera de blanco
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
PAXX	Parálogo de XRCC4 y XLF
pDNA	DNA plásmidico
Pol δ	DNA polimerasa delta
PVV	Personas que viven con VIH
pre-crRNA	Transcripción primaria del locus CRISPR
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Complejo de ribonucleoproteína Cas9/sgRNA
RPA	Proteína de replicación A
SCD	Anemia de células falciformes

SDSA	Alineamiento de cadena dependiente de síntesis
sgRNA	RNA de guía única
SSA	Alineamiento de cadena sencilla
SSB	Rupturas de DNA monocatenarias
ssDNA	DNA-monocatenario
ssODN	Oligodesoxinucleótido monocatenario
TALEN	Nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional
TopIII α	Topoisomerasa III α
tracrRNA	crRNA trans-activador
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XLF	Factor similar a XRCC4
ZFN	Nucleasas de dedos de zinc

Índice de figuras

Figura 1	Dos vías principales de reparación de roturas de doble cadena de DNA
Figura 2	Representación a manera de esquema del locus CRISPR y la función de CRISPR/Cas como sistema inmune
Figura 3	Mecanismo de acción de CRISPR/Cas9

Índice de tablas

Tabla 1	Sistemas de entrega para CRISPR/Cas9
Tabla 2	Principales ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de entrega para administrar CRISPR/Cas9
Tabla 3	Análisis comparativo de MN, ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9

1.0 Introducción

Desde que la humanidad tuvo la capacidad para percibir aquello que le rodeaba más allá de la obiedad, empezó a cuestionar el origen de cada elemento de su entorno, hasta llegar a sí misma, esta ambición del saber la llevó a desarrollar una serie de ideas que luego de mucho empezaron a tomar forma y sentido, surgiendo así la filosofía, que dio paso a un pensamiento científico. Una vez implementado el método científico, las personas eruditas de la época, se dedicaron a elaborar una serie de experimentos en diversas áreas de conocimiento, como, física, química, biología, medicina, entre otras, siempre con el fin de atribuirle una existencia con propósito a cada elemento de su entorno, sin olvidar su interés por el enigma de la vida.

Fueron necesarios muchos experimentos a través de los siglos, para que en 1871 Friedrich Miescher identificara la presencia de nucleína (ahora conocida como DNA) y proteínas asociadas en el núcleo de la célula (Beyer, 2016) dando los primeros pasos para descifrar el código de la vida. Varios años más tarde, en 1910, Albrecht Kossel ganó el Premio Nobel en medicina por descubrir las cinco bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. En 1953 James Watson y Francis Crick, con contribuciones de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, descubrieron la estructura de doble hélice del DNA y al inicio de la década de los 80s Fred Sanger, Walter Gilbert y Paul Berg compartieron el Premio Nobel de Química por desarrollar métodos de secuenciación del DNA (Beyer, 2016).

Cada uno de los hallazgos mencionados anteriormente, aumentaron la curiosidad sobre el código genético de la humanidad, dando como resultado el Proyecto del Genoma Humano lanzado en 1990, que buscaba secuenciar 3000 millones de bases del genoma humano en 15 años (Beyer, 2016). Clinton vaticinó que la lectura de nuestro libro de la vida permitiría encontrar la cura para todas las enfermedades que aquejan a los seres humanos y que en menos de una década la medicina personalizada sería una realidad (Urritua, 2011), sin embargo, además de las promesas positivas en torno al proyecto, empezaron las preocupaciones sobre la alteración del DNA. Tres años más tarde las repeticiones palindrómicas cortas

agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR; clustered regularly interspaced short palindromic repeats), se observaron por primera vez en arqueas, específicamente en *Haloferax mediterranei* (Ishino, Krupovic & Forterre, 2018) y en 2007, utilizando la bacteria del ácido láctico *Streptococcus thermophilus*, se descubrió que CRISPR era un sistema inmune adaptativo bacteriano.

Finalmente, en el 2012, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, dieron al mundo las tijeras genéticas CRISPR/Cas9 haciendo posible que los investigadores puedan cambiar el DNA de animales, plantas y microorganismos con una precisión extremadamente alta (The Royal Swedish Academy, 2020), pero ¿por qué resulta tan atrayente la idea de cambiar la secuencia del DNA de los organismos? Al conjunto de todo el DNA de una especie se le conoce como genoma y este contiene toda la información necesaria para crear un organismo vivo. En el caso del ser humano, se le llama genoma al conjunto de material genético organizado en los 23 pares de cromosomas dentro del núcleo celular (nDNA; nuclear DNA) y al DNA de las mitocondrias (mtDNA; mitochondrial DNA). La información se encuentra en unidades llamadas genes, a nivel molecular, un gen se define como un segmento de DNA que se utiliza para fabricar un producto funcional, ya sea una molécula de RNA o un polipéptido, a este proceso se le conoce como expresión génica. Junto con los factores ambientales, la expresión molecular de los genes determina los rasgos de un organismo. (Brooker, 2018). Con el desarrollo del conocimiento sobre el material hereditario se notó que muchas de las enfermedades intratables tenían su origen en el código genético (Gupta, Bhattacharjee, Mandal, Sen, Dey, Dasgupta, Kazi, Gupta, Sinharoy, Acharya, Chattopadhyay, Ravichandiran, Roy & Ghosh, 2019), por lo que sustituir, eliminar o corregir una secuencia abriría la puerta a la cura de enfermedades para las que, hoy en día, no existe un tratamiento eficaz.

La capacidad de realizar prácticamente cualquier cambio específico en la secuencia del genoma de cualquier célula u organismo vivo es una aspiración que la biología molecular ha tenido durante un largo tiempo (Anzalone, Randolph, Davis, Sousa, Koblan, Levy, Chen, Wilson, Newby, Raguram & Liu, 2019). No obstante, aunque la

manipulación de la secuencia del genoma, fenómeno conocido como edición genética, tiene el potencial de hacer realidad el sueño de curar enfermedades hereditarias y contribuir con el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades como el cáncer, aún hay mucho por hacer, tanto en el área científica como en la ética y la regulación, para evitar una aplicación prematura, sin justificación científica sólida y bajo un marco regulatorio ambiguo. Este trabajo monográfico de actualización propone ser un documento informativo que permita, a partir del conocimiento científico, ético y regulatorio, estar un paso más cerca al momento de buscar soluciones en políticas públicas sobre temas de biotecnología. Para lo cual se busca cumplir el objetivo general de realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica, con el propósito de conocer el estado científico, ético y regulatorio actual de la edición genética de la línea germinal humana con CRISPR/ Cas9. De la mano del objetivo general, se encuentran los siguientes objetivos específicos: 1. Explicar que es la edición genética y cuáles son las herramientas principales para este fin, 2. Hacer una revisión del funcionamiento, alcance y aplicación del fenómeno de edición genética por CRISPR/Cas9, 3. Comparar las herramientas de edición genética principales y 4. Analizar las cuestiones éticas y regulatorias en torno a la edición genética.

2.0 Generalidades

2.1 Edición genética

El genoma humano consta aproximadamente de 3 mil millones de pares de bases de ácido desoxirribonucleico (DNA; deoxyribonucleic acid) organizadas en 23 pares de cromosomas. Los cromosomas son estructuras dentro de las células vivas que contienen el material genético. El término cromosoma, que significa "cuerpo coloreado", se refiere a la observación microscópica de los cromosomas después de que se hayan teñido. Los genes están ubicados físicamente dentro de los cromosomas. Bioquímicamente, cada cromosoma contiene un segmento muy largo de DNA, este segmento es el material genético, y proteínas, que están unidas al DNA y le proporcionan una estructura organizada. En las células eucariotas, este complejo entre el DNA y las proteínas se llama cromatina (Brooker, 2018).

Por otro lado, de los 23 pares de cromosomas, el par número 23 contiene los cromosomas sexuales que determinan el sexo de un individuo, en la mayoría de los casos, cuando el par 23 se compone del cromosoma X (XX) se tratará de un individuo del sexo femenino, mientras que un par 23 compuesto por X y Y (XY) corresponderá a una persona del sexo masculino. El resto de los 22 pares se conocen como cromosomas autosómicos o autosomas, ligados a la herencia de las características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas, excluyendo las sexuales. A diferencia de los cromosomas del par 23, cada par de autosomas se compone de dos cromosomas homólogos, es decir, el par número uno está formado por dos cromosomas 1, el dos por dos cromosomas 2, etc. Un cromosoma promedio tiene alrededor de 120 millones de bp de DNA; un gen tiene entre 2000 y 200,000 bp. Solo alrededor del 3% de nuestra secuencia de DNA genómico codifica genes, de los cuales aproximadamente 20,000 codifican proteínas (KC & Clifford, 2019).

La edición genética (GE; Gene Editing) es una técnica que introduce mutaciones en el genoma en forma de inserciones y/o deleciones (INDELs; insertions or deletions) o sustituciones de bases en las secuencias diana (Manghwar, Lindsey, Zhang & Jin, 2019).

La GE en el tratamiento de enfermedades tiene distintas implicaciones dependiendo del tipo de célula que modifica. Se debe diferenciar primordialmente entre células somáticas y células germinales. En las células somáticas se corrige o mejora un estado patológico por transferencia de material genético en un órgano o tejido, excluyendo las células germinales. Se dice somática por cuanto concierne a células diferenciadas (del feto, del niño, del adulto) (Darío, 2017). Las modificaciones al DNA de células somáticas solo afectarán al paciente, mientras que los cambios en el DNA realizados en células germinales pueden ser transmitidos a futuras generaciones (Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión (INCyTU), 2018).

La GE comprende varias técnicas, como el uso de nucleasas con dedos de zinc (ZFN; Zinc Finger Nuclease), nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN; transcription activator-like effector nuclease), y el sistema desarrollado

más recientemente las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas/proteína 9 asociada a CRISPR (CRISPR/Cas9; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein 9) (Manghwar *et al.*, 2019). Sorprendentemente, todo lo que hacen las nucleasas de edición del genoma es romper el DNA cromosómico. La clave, radica en que la ruptura sea dirigida y, por lo tanto, muy específica. Todo lo que sucede después de la ruptura depende de la maquinaria de reparación del DNA celular (Carroll, 2017). El descubrimiento de las rupturas de doble cadena (DSB; double-strand break) del DNA fue fundamental para el campo de la edición de genes, ya que estas DSB dirigidas, podían ser empleadas para estimular la maquinaria de reparación celular endógena (Maeder & Gersbach, 2016).

2.2 Mecanismos de reparación del DNA

Una vez que se introducen las nucleasas y se rompe el DNA de doble cadena, las células activan las enzimas de reparación del DNA. La recombinación dependiente de homología (HDR; Homology directed repair) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ; Nonhomologous end joining) son las dos vías principales para reparar las DSB. Como se puede ver en la Figura 1, la HDR requiere una plantilla homóloga para dirigir la reparación del DNA y generalmente se reconoce como una vía de alta fidelidad. Por el contrario, NHEJ sella directamente los extremos rotos, pero el producto de reparación suele ir acompañado de alteraciones de secuencia (Zhao, Wei, Li, Xing, Li, Zheng & Chen, 2017).

2.2.1 Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ)

El mecanismo de reparación por NHEJ se produce cuando los extremos rotos del DNA se reparan o se ligan sin el uso de una plantilla homóloga. Debido a que no existe una plantilla de reparación, el NHEJ puede dar lugar a pequeñas inserciones o deleciones de nucleótidos en los sitios de escisión y, en general, tiene una mayor probabilidad de producir errores. Aunque las pequeñas inserciones o deleciones pueden no tener, en última instancia, ningún efecto sobre el producto génico, pueden conducir potencialmente a un cambio de marco de lectura y otras mutaciones con la consiguiente alteración de la función del gen. Debido a que NHEJ

no requiere una plantilla homóloga para su reparación, puede ocurrir en cualquier momento durante el ciclo celular. En términos de enfermedades clínicas, el proceso natural de NHEJ se ha aprovechado principalmente para desactivar genes (Rein, Yang & Chao, 2018).

Aunque aún no se ha logrado descifrar por completo el mecanismo de reparación por NHEJ, se puede explicar en tres fases, primero, la fase de reconocimiento que se inicia mediante la unión del heterodímero compuesto por las proteínas Ku70 y Ku80 (también conocido como XRCC6-XRCC5), el cual tiene forma de anillo y se une a ambos extremos de la DSB. La unión del complejo Ku a los extremos rotos del DNA ocurre a los pocos segundos de producirse el DSB y sirve como base para el ensamblaje de otras proteínas para la siguiente fase en el proceso de reparación de la rotura y forma una estructura específica que promueve el alineamiento de los dos extremos terminales del DNA. El complejo DNA-Ku recluta a la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs; DNA-dependent protein kinase catalytic subunit). Entonces, el heterodímero Ku se desliza hacia el interior del DNA, permitiendo que DNA-PKcs contacte físicamente con el extremo de DNA, la asociación de DNA-PKcs tanto al DNA como al complejo Ku conlleva la activación de la actividad cinasa de DNA-PKcs. Además, el desplazamiento de Ku hacia el interior del extremo permite que dos moléculas de DNA-PKcs interactúen a lo largo del DSB formando un “puente” molecular o sinapsis entre los dos extremos del DNA DNA-PKcs juega un papel crítico en la estabilización de los extremos y previene la resección mediante una serie de reacciones de autofosforilación.

Posterior a la fase de reconocimiento sigue la fase de procesamiento. Independientemente de cómo queden los extremos después de haber ocurrido el daño, deben ser transformados en extremos 5' religables para que puedan ser reparados completamente. Se requieren varias enzimas para procesar dichos extremos y reparar la rotura, una de las enzimas clave en el procesamiento de los extremos es Artemis que se recluta al sitio del DSB a través de su capacidad para interactuar con DNA-PKcs. El procesamiento de lesiones complejas puede generar huecos en el DNA que deben ser rellenados previamente por DNA

polimerasas para llevar a cabo la reparación por NHEJ. Las DNA polimerasas especializadas λ y μ y otras enzimas asegura la compatibilidad de los extremos ligados.

Por último, en la fase de finalización la reparación por NHEJ se completa con la ligadura de los extremos de DNA, un paso que es llevado a cabo por el complejo XRCC4/LIG4/XLF, que contiene a la ligasa de DNA IV (LIG4; DNA ligase IV) y los factores de andamiaje asociados XRCC4, factor similar a XRCC4 (XLF; associated scaffolding factors XRCC4, XRCC4-like factor) y parálogo de XRCC4 y XLF (PAXX; paralogue of XRCC4 and XLF). XRCC4 forma un homodímero que funciona como andamiaje al interactuar con el complejo Ku y con el DNA. El complejo DNA-Ku es estabilizado por XRCC4 y estimulado por XLF para llevar a cabo el paso de ligadura y completar así la reparación. La LIG4 es activada por XRCC4 y XLF y puede ligar extremos romos y extremos sobresalientes compatibles. (Fernández, 2016).

Varios factores accesorios, algunos de los cuales probablemente permanezcan sin descubrir, apoyan o regulan NHEJ. Estos incluyen el complejo multifuncional de reconocimiento de extremos MRE11/RAD50/NBS1 (MRN), que puede ayudar en el puenteo final, la apratxina y el factor similar a PNK (APLF; apratxin and PNK-like factor), que interactúa con Ku80 y con proteínas modificadas con poli (ADP ribosa) en las proximidades del DSB. Se han identificado varios reguladores positivos y negativos adicionales de Ku70-Ku80. Se cree que un "motivo de unión a Ku" en una serie de proteínas que interactúan entre Ku70 y Ku80 median sus funciones reguladoras de NHEJ (Scully, Panday, Elango, Willis, 2019).

2.2.2 Reparación Dependiente de Homología (HDR)

Una vía alternativa para la reparación de DSB es la reparación dependiente de homología (HDR). En este caso, una plantilla de DNA homologa a las secuencias adyacentes a los extremos cortados puede participar en la recombinación homóloga con las hebras rotas para incorporar secuencias de la plantilla exógena en las hebras reparadas. De esta forma, se puede reparar una mutación puntual en las proximidades de la rotura. Alternativamente, se pueden incorporar nuevas

secuencias, limitadas por las regiones de homología. Por tanto, la HDR es un mecanismo para la corrección genética y la adición de genes. Sin embargo, la vía HDR generalmente opera a frecuencias muy por debajo de la NHEJ, típicamente en el rango de 1 – 2% en células en división como las células madre pluripotenciales inducidas de humanos (Calos, 2017).

La reparación dependiente de homología es un proceso de varios pasos que difiere de NHEJ en aspectos clave, en esta vía se pueden identificar tres etapas: resección, invasión y resolución. La HDR se inicia con la resección de los extremos del DNA para generar extremos 3'. Dichos extremos serán usados para invadir la cadena molde y actuar como cebadores para la síntesis de DNA. La resección del extremo del DNA eucariota se inicia mediante la unión directa al DNA del complejo MRN formado por MRE11/RAD50/NBS1. Sin embargo, para que se inicie la resección es necesario que el proceso se active por CtIP, que interacciona con MRN y BRCA1 formando un complejo, CtIP es una proteína esencial para la resección con actividad nucleasa. *In vivo*, no basta con la interacción de estas proteínas, sino que la resección de las DSBs está controlada por otros factores, como la cinasa de señalización de daño del DNA multifuncional ATM que estimula la resección. *In vivo* la resección ocurre a lo largo de grandes distancias, la denominada resección de tramo largo, en la que la Exonucleasa 1 (EXO1; Exonuclease 1), en paralelo con la proteína helicasa del síndrome de Bloom (BLM; Bloom syndrome protein) y la endonucleasa DNA2, median el desenrollamiento y/o la digestión nucleolítica de la hebra 5' del extremo del DNA para formar una larga cola de DNA-monocatenario (ssDNA; single-stranded DNA) 3'. El ssDNA se recubre rápidamente con la abundante proteína de replicación A (RPA; replication protein A). El ssDNA unido a RPA no puede emparejarse con otras secuencias de ssDNA. Por tanto, la RPA "funde" la estructura secundaria en el ssDNA y limita las interacciones espurias con los intermedios ssDNA de otros procesos nucleares. La RPA también forma una barrera para la carga de la recombinasa RAD51 y debe ser desplazada por mediadores de recombinación si la HDR debe continuar (Fernández, 2016).

Una vez terminada la resección se da paso a la invasión, en la que la RPA unida al ssDNA es sustituida por la recombinasa RAD51. Se requieren, por tanto, actividades adicionales para la formación del nucleofilamento DNA-RAD51. De entre estas actividades, cabe destacar a BRCA2, ayudada por las proteínas PALB2 y RAD52, los parálogos de RAD51 y el complejo BRCA1/BARD1. Todas estas proteínas son necesarias para la formación de focos de RAD51, pero la función directa de cargar RAD51 al nucleofilamento es de BRCA2. Queda por determinar en qué medida BRCA1 – BARD1 – PALB2 modula esta actividad. Los filamentos de nucleoproteína RAD51 forman complejos sinápticos, contienen una hélice de DNA de tres hebras que apoya la formación de heterodúplex: emparejamiento de bases entre la hebra invasora y la hebra complementaria de la molécula invadida. Si se logra una coincidencia de homología suficiente, la sinapsis se estabiliza y la hebra de la molécula invadida se desplaza para formar un bucle de desplazamiento en forma de lazo denominado D-loop, proceso impulsado por la hidrólisis de ATP (Adenosín Trifosfato) mediada por RAD51 (Scully, *et al.*, 2019). El extremo libre 3' de la hebra invasora se acopla a una DNA polimerasa, extendiendo la hebra invasora (naciente) utilizando la molécula de DNA invadida como plantilla para la conversión de genes (Figura 1). La DNA polimerasa δ (Pol δ ; DNA polymerase δ) desempeña un papel importante en la síntesis de cadenas nacientes, pero las DNA polimerasas de translesión también se han implicado en la competencia con la Pol δ . Esta ruta es lo que se conoce como alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA; synthesis-dependent strand annealing) y se piensa que está promovida por la helicasa RTEL. Debido a que SDSA no implica la formación de una unión de Holliday, es una vía no cruzada. Aunque los datos indican que la ruta SDSA es la principal vía de la reparación por HDR en células somáticas de mamíferos, las estructuras de Holliday (HJs; Holliday junction) probablemente aumentan durante otros procesos de recombinación. Cuando se forman los HJs se genera una región de heterodúplex, es decir, la molécula de DNA está formada por una cadena de la molécula invasora y otra que actúa de donadora de información. Los HJs pueden desplazarse a lo largo del DNA, en un proceso dependiente de ATP denominado migración.

Finalmente, en la etapa de resolución una vez formadas las HJs, ambas moléculas de DNA, la molde y la invasora, quedan unidas entre sí. Por ello, las HJs deben ser procesadas enzimáticamente. La resolución de las HJs es ejecutada por varios complejos enzimáticos. BLM, en complejo con TopIII α (topoisomerasa III α)/RMI1/RMI2 (el complejo BTR), puede disolver las HJs y dar lugar a productos sin entrecruzamiento. Alternativamente, estos pueden ser cortados por nucleasas dependientes de estructuras, que pueden generar entrecruzamientos.

Se han identificado varios mecanismos de HDR, estos incluyen la HR clásica, alineamiento de cadena sencilla (SSA, single-strand annealing), el SDSA, y la replicación inducida por rotura (BIR, break-induced replication). Mientras que la HR clásica y el SDSA son, en principio, una reparación de los DSBs conservativa, tanto SSA como BIR son rutas intrínsecamente mutagénicas, ya que siempre producen deleciones entre las secuencias homólogas usadas, BIR produce pérdida de heterocigosidad e incluso reordenamientos cromosómicos macroscópicos (GCRs; gross chromosomal rearrangements).

En la HDR clásica la síntesis de DNA llega hasta el final de la zona reseccionada, generándose unas estructuras en forma de X denominadas HJs, En el SDSA, las cadenas sintetizadas a ambos lados del corte son desplazadas del molde y se alinean entre sí. En BIR, la síntesis de DNA prosigue hasta el final del cromosoma. En SSA tras la resección, las zonas homólogas quedan expuestas, lo que conduce al alineamiento de las cadenas de las secuencias repetidas. Posteriormente, es necesaria la eliminación de los extremos colgantes, el producto de este evento de reparación deja una única copia de la secuencia repetida y se produce una deleción de las secuencias intermedias (Fernández, 2016).

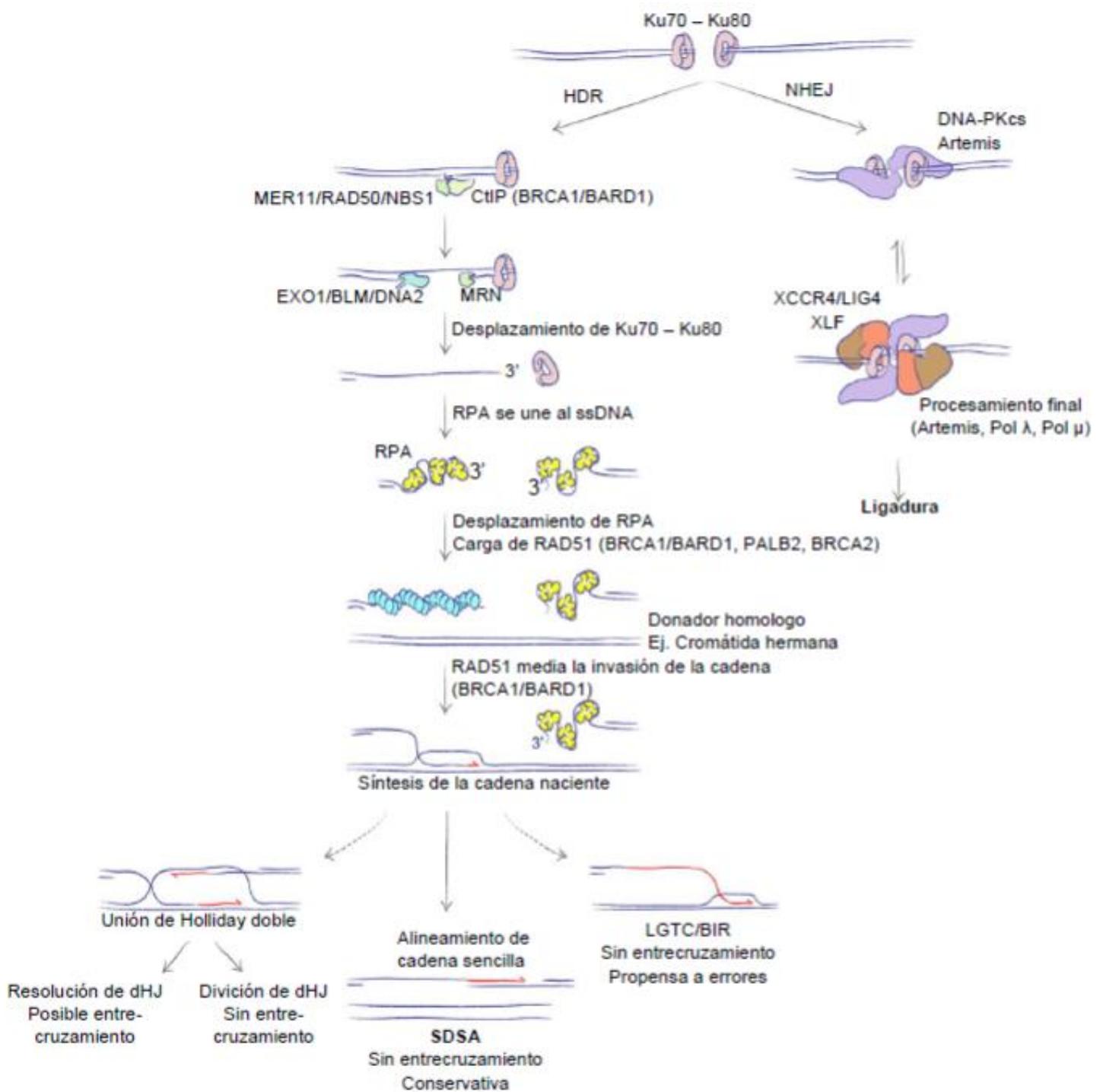


Figura 1. Dos vías principales de reparación de roturas de doble cadena de DNA.

Mecanismos de reparación por NHEJ. **Fase de Reconocimiento:** a) Ku70-Ku80 se une a ambos extremos de la DSB, b) el complejo DNA-Ku recluta a la DNA-PKcs.

Fase de procesamiento: a) Artemis, por interacción con DNA-PKcs, transforma los extremos rotos a extremos 5', b) DNA polimerasas λ y μ rellenan huecos en el DNA.

Fase de finalización: a) El complejo XRCC4/LIG4/XLF liga los extremos.

Mecanismo de reparación por HDR. **Fase de resección:** a) el complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) forma extremos 3' mediante la interacción con CtIP (BRCA1/BARD1), b) la EXO1 en paralelo con BLM y DNA2 median en desenrollamiento y la digestión nucleolítica de la hebra 5' del extremo de DNA para formar ssDNA, c) RPA recubre el ssDNA. **Fase de invasión:** a) RPA unida al ssDNA es reemplazada por RAD51, mediante la actividad de BRCA1/BARD1 y PALB2/BRCA2, b) los filamentos de RAD51 forman complejos sinápticos que contienen una hélice de DNA de tres hebras, c) el extremo 3' de la cadena invasora se acopla a DNA polimerasas que sintetizan las cadenas nacientes. **Fase de resolución:** a) Formación de estructuras de Holliday, b) SDSA; las cadenas sintetizadas a ambos lados del corte son desplazadas del molde y se alinean entre sí, c) BIR; la síntesis de DNA prosigue hasta el final del cromosoma lo que provoca GCRs. Modificado de: Scully. R, Panday. A, Elango. R, Willis. N. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 20. 11. 698 – 714. DOI: 10.1038/s41580-019-0152-0.

2.3 Tipos de ediciones genéticas

Con la capacidad de aprovechar la maquinaria de reparación del DNA endógeno, ahora es posible diseñar una amplia variedad de arreglos genómicos de sitio dirigido.

2.3.1 Knockout

Esta es la forma más simple de edición de genes que utiliza la naturaleza propensa a errores de la NHEJ para introducir pequeñas INDELS en el sitio objetivo. La NHEJ clásica vuelve a ligar directamente los extremos de DNA sin procesar, mientras que la NHEJ alternativa (también conocida como unión de extremos mediada por microhomología, MMEJ; Microhomology-mediated end joining) requiere resección

final seguida de hibridación de regiones monocatenarias cortas de microhomología y posterior ligación de extremos de DNA. Estas dos vías de NHEJ, activas durante todas las etapas del ciclo celular, reparan el DNA con una alta frecuencia de mutagénesis, lo que resulta en la formación de INDELS en el sitio de la rotura.

Cuando el sitio diana de la nucleasa se coloca en la región de codificación de un gen, las INDELS resultantes a menudo causarán cambios en el marco de lectura. En enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne (DMD; Duchenne muscular dystrophy), donde las deleciones de genes dan como resultado cambios de marco y la consiguiente pérdida de la función de la proteína, se pueden usar INDELS dirigidas, inducidas por NHEJ con el fin de restaurar el marco de lectura correcto del gen. Sin embargo, la aplicación más común de la mutagénesis de sitio dirigido implica la inducción de mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, con el fin de eliminar el gen.

2.3.2 Deleción de genes

Además de las INDELS relativamente menores que resultan de la NHEJ, es posible eliminar grandes segmentos de DNA flanqueando la secuencia con dos DSB. Se ha demostrado que la introducción simultánea de dos rupturas dirigidas puede dar lugar a deleciones genómicas de hasta varias megabases de tamaño. Este enfoque es útil para estrategias terapéuticas donde se puede requerir la eliminación de un elemento genómico completo, por ejemplo, una región potenciadora, como se ha propuesto para el tratamiento de las hemoglobinopatías mediante la deleción de la región potenciadora específica del eritroide BCL11A. Además, en enfermedades como la DMD, donde diferentes deleciones genéticas internas pueden desplazar el gen fuera del marco, la deleción intencional de uno o más exones pueden corregir el marco de lectura y restaurar la expresión de una proteína truncada, pero parcialmente funcional.

2.3.3 Corrección genética

A diferencia de las mutaciones impredecibles que resultan de la NHEJ, las DSB dirigidas pueden inducir una edición genética precisa estimulando la HDR con la

plantilla de un donante, dicha plantilla es suministrada de forma exógena. La HDR se encuentra activa principalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular y utiliza naturalmente la cromátida hermana como molde para la reparación del DNA, sin embargo, una secuencia donante suministrada exógenamente también puede usarse como molde de reparación. Por lo tanto, el suministro codificado de nucleasas dirigidas junto con un vector de dirección que contiene DNA homólogo al sitio de ruptura permite la edición de genes basada en HDR de alta eficiencia. Así, cualquier diferencia de secuencia presente en la plantilla del donante puede incorporarse al locus endógeno para corregir mutaciones que causan enfermedades.

2.3.4 Inserción de genes

El uso de la plantilla de un donante, en la cual el inserto genético deseado está flanqueado por brazos de homología que incluyen secuencias idénticas al sitio de corte de la nucleasa, permite la inserción de DNA en un sitio específico a través de HDR inducida por DSB. La inserción dirigida de transgenes terapéuticos en sitios predeterminados del genoma, como los loci "safe-harbor", reduce los riesgos de mutagénesis de inserción y permite altos niveles de expresión génica ubicua. Para mantener el control de la expresión génica mediante elementos reguladores naturales, se puede insertar una copia de tipo silvestre del gen causante de la enfermedad en el locus endógeno correspondiente y, por tanto, estar bajo el control de su propio promotor. Un mecanismo alternativo para la inserción de transgenes dirigida es utilizar DSB inducidas por nucleasas para crear proyecciones compatibles en el DNA del donante y el sitio endógeno, lo que lleva a la ligadura de la secuencia de DNA del inserto mediada por NHEJ directamente en el locus diana (Maeder & Gersbach, 2016).

En resumen, la edición de genes implica la inserción, eliminación o reemplazo intencionado y dirigido de DNA en el genoma de una célula viva. Los posibles objetivos de la edición de genes incluyen el reemplazo de los genes faltantes, la sobreexpresión de un gen normal, la interferencia con la expresión de un gen, la

interrupción de un gen dañino o la reparación de un gen mutado (KC & Clifford, 2019).

2.4 Herramientas de edición genética

Debido a que la edición de genes inducida por DSB se basa en los mecanismos de reparación endógenos de la célula, es universalmente aplicable a cualquier tipo de célula u organismo que emplee estos métodos para la reparación del DNA. El elemento crítico para implementar cualquiera de estos métodos de edición de genes es la introducción precisa de una DSB dirigida (Maeder & Gersbach, 2016.). Actualmente se utilizan cuatro plataformas principales de nucleasas para introducir DSB dirigidas en el genoma: meganucleasas (MN), nucleasas de dedos de Zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas / Asociado a CRISPR). Las MN, ZFN y TALEN generan especificidad de reconocimiento de secuencia a través de interacciones proteína-DNA. Distintamente de estas nucleasas programables, el sistema CRISPR/Cas utiliza una molécula de ácido ribonucleico de guía única (sgRNA; single-guide ribonucleic acid) para reconocer la secuencia específica de DNA (Yin, Kauffman & Anderson, 2017). En seguida se presenta una breve revisión de las técnicas de edición genética basadas en MN, ZFN y TALEN, después el sistema CRISPR/Cas, motivo del presente TMA, se aborda a mayor detalle.

2.4.1 Meganucleasas (MN)

Estas proteínas se denominaron MN, para referirse al tamaño excepcionalmente largo de su diana afín que va de 14 a 40 bp. Las MN se han clasificado en familias, la más grande y mejor caracterizada es la familia LAGLIDADG, que también contiene las MN con mayor especificidad, como I-SceI (presente en la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), el estándar de oro en el campo (Galletto, Duchateau & Pâques, 2009).

La tecnología de las MN implica la reingeniería de la especificidad de unión al DNA de las endonucleasas autodirigidas de origen natural, para apuntar estas

endonucleasas autodirigidas a nuevas secuencias. No obstante, la ingeniería necesaria para apuntar a nuevas secuencias y dominios de escisión y unión de DNA no separados (es decir, sitios de escisión y reconocimiento de DNA que están vinculados estrechamente en un solo dominio) restringe la amplia aplicación de estas nucleasas (Yin, Kauffman & Anderson, 2017).

Aunque una ventaja potencial asociada a esta herramienta es que la formación de DSB por estas enzimas da como resultado un saliente 3', que puede ser más recombinogénico para HDR que el saliente 5' generado por la escisión de FokI, asociada a ZFN y TALEN. Además, las MN son pequeñas por lo que su administración podría hacerse a través de un gran número de métodos de entrega. De hecho, múltiples monómeros de MN podrían empaquetarse fácilmente en vectores virales únicos para crear simultáneamente múltiples DSB (Maeder & Gersbach, 2016).

2.4.2 Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)

El primer factor de transcripción específico (proteínas que influyen en la velocidad de la transcripción) de secuencia eucariota que se caracterizó tenía repeticiones de unión a zinc en su dominio de unión al DNA. Se demostró que las secuencias relacionadas de otros factores de transcripción eran módulos de péptidos que hacían contactos estereotipados con tripletes de bp, conocidos como dedos de zinc. El cambio de algunos residuos en un solo dedo de zinc alteró su especificidad de reconocimiento de DNA, y los dedos se diseñaron para reconocer muchos tripletes de DNA diferentes (Carroll, 2017).

Las ZFN son nucleasas quiméricas compuestas por un dominio de unión al DNA específico formado por proteínas de dedos de zinc y un dominio de endonucleasa inespecífico, compuesto por la nucleasa FokI derivada de *Flavobacterium okeanoicoites* modificada para generar un corte secuencia-independiente (Rein, Yang & Chao, 2018). El dominio de dedo de zinc es uno de los tipos más abundantes de motivos de unión al DNA que se encuentran en eucariotas. Cada dedo de zinc tiene aproximadamente 30 aminoácidos que generalmente se unen a tres bp de DNA. Por lo general, hay de 3 a 6 dedos de zinc unidos para crear un dominio de

unión al DNA con una especificidad de 9 a 18 bp. Para crear una ruptura del DNA de doble hebra, se necesita la dimerización de dos dominios nucleasa FokI. Esto requiere que un par de ZFN se unan a las cadenas de DNA opuestas, lo que permite que FokI se dimerice y corte el DNA (Redel & Prather, 2016). Este requisito de unión de 2 proteínas que conducen a la dimerización hace que la tecnología ZFN sea más específica para una secuencia diana, un rasgo que es claramente deseable para fines de edición de genes (Rein, Yang & Chao, 2018).

2.4.3 Nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN)

Son sistemas originalmente caracterizados en *Xantomonas spp.* donde las proteínas TALE son secretadas cuando infectan una gran variedad de plantas, estas proteínas se unen y regulan la actividad de los genes del hospedador para promover la infección (Carroll, 2017). Al igual que las ZNF, las TALEN son enzimas de restricción diseñadas por ingeniería que se fusionaron con los dominios catalíticos de la endonucleasa FokI (KC & Clifford, 2019).

Se ha demostrado que este sistema introduce de manera eficiente los DSB tanto en las células somáticas como en las células madre pluripotentes, además el uso de TALEN permite una mayor flexibilidad en la selección de las secuencias diana que las ZFN (Redel & Prather, 2016). El inconveniente de los TALEN es su gran tamaño que dificulta la entrega (KC & Clifford, 2019). A diferencia de un dedo de zinc de 30 aminoácidos, que une tres bases de DNA, los TALEN requieren 34 aminoácidos para especificar un solo bp y esta diferencia de tamaño puede impedir la entrega de ambos monómeros TALEN en un solo vector viral con capacidad de empaquetamiento limitada (Maeder & Gersbach, 2016).

3.0 CRISPR/Cas

3.1 Historia de CRISPR/Cas

CRISPR/Cas hoy en día, es la herramienta para modificación genética más popular en el campo, su investigación y aplicaciones clínicas han superado con creces a las de otras nucleasas existentes, tales como MN, ZFN y TALEN. Hasta la fecha se han

publicado miles de artículos de investigación y revisión sobre CRISPR/Cas (Memi, Ntokou & Papangeli, 2018).

Las crónicas para el descubrimiento de CRISPR comenzaron en 1987, cuando Ishino et al, observaron la presencia de una repetición de 29 nucleótidos en *Escherichia coli*, interrumpidas por secuencias cortas no repetitivas no relacionadas (espaciadores) (Gupta et al., 2019). En ese momento, era difícil predecir la función biológica de estas secuencias repetidas inusuales, debido a la falta de suficientes datos, especialmente para elementos genéticos móviles. La función real de esta secuencia única se mantuvo enigmática hasta mediados de la década de los 2000. En 1993, CRISPR se observó por primera vez en arqueas, específicamente en *Haloferax mediterranei*, y posteriormente se detectaron en un número creciente de genomas bacterianos y de arqueas. La conservación de estas secuencias en dos de los tres dominios de la vida fue fundamental para apreciar su importancia.

En paralelo, varios genes propuestos previamente para codificar proteínas de reparación de DNA específicas en arqueas hipertermófilas se identificaron como estrictamente asociados con CRISPR y se denominaron genes asociados a CRISPR (Cas; CRISPR-associated). Los análisis genómicos comparativos sugirieron que CRISPR y las proteínas Cas (los productos del gen cas) realmente trabajaban juntas y constituían un sistema de inmunidad adquirida para proteger las células procariontas contra los virus y plásmidos invasores (Ishino, Krupovic & Forterre, 2018).

3.2 Descubrimiento de la función de CRISPR/Cas

Las arqueas termófilas, además de las bacterias hipertermófilas, tienen más CRISPR y más grandes que los organismos mesófilos. Las secuencias CRISPR están presentes en más del 40% de las bacterias secuenciadas y el 90% de las arqueas (Adli, 2018). Estas observaciones sugirieron que la función de CRISPR estaba relacionada con la adaptación de organismos a altas temperaturas. Sin embargo, con más y más secuencias disponibles, resultó que esta correlación no era veraz y que muchos organismos mesófilos también contenían secuencias CRISPR. El momento eureka llegó cuando Francisco Mojica en Alicante y Christine

Pourcel en Orsay notaron de forma independiente que las regiones espaciadoras entre las secuencias repetidas eran homólogas a las secuencias de bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente a los organismos procariontes, profagos, genoma de un fago que se ha perpetuado en la bacteria hospedadora al integrarse en su cromosoma y se replica sincrónicamente con él, y plásmidos, moléculas de DNA extracromosómico generalmente circular que se replican de manera autónoma y se transmiten independientemente del DNA cromosómico. Los dos grupos también sugirieron que las CRISPR de alguna manera pueden desencadenar la captura de fragmentos de DNA invasor extraño para constituir un recuerdo de agresiones genéticas pasadas. En un tercer artículo influyente del mismo año, Bolotin y sus colegas confirmaron estas observaciones, además, notaron una correlación entre el número de espaciadores de origen fago y el grado de resistencia a la infección por fagos, y sugirieron que CRISPR podría usarse para producir RNA anti-sentido. Estas publicaciones fundamentales fueron muy subestimadas en ese momento.

El papel de las proteínas Cas como efectores de la inmunidad procarionte se enfatizó un año después en un exhaustivo artículo analítico publicado por Makarova et al, quien realizó un análisis detallado de las secuencias de la proteína Cas e intentó predecir sus funciones. Estas predicciones funcionales, a menudo no triviales, se confirmaron completamente de forma experimental varios años después y continúan guiando la investigación experimental en el sistema CRISPR/Cas. Es importante destacar que señalaron que el sistema CRISPR/Cas, con su componente de memoria, se parece bastante al sistema inmunológico adaptativo de los vertebrados, con la diferencia crucial de que el sistema inmunológico animal no es heredable.

La función del sistema CRISPR/Cas como un sistema inmune procarionte finalmente fue probada de forma experimental en 2007, utilizando la bacteria del ácido láctico *Streptococcus thermophilus*. Se insertó la secuencia de un fago en la región espaciadora de CRISPR de *S. thermophilus* lo que hizo a esta cepa resistente al fago correspondiente. Por otro lado, esta resistencia bacteriana a la infección por

fagos desapareció cuando se eliminó la secuencia correspondiente del genoma del fago (Ishino et al., 2018).

3.3 CRISPR/Cas como un sistema inmune adaptativo

Las bacterias y arqueas están expuestas con frecuencia a ácidos nucleicos extraños tanto beneficiosos como parasitarios. Por un lado, esto permite a los organismos acceder e incorporar material genético diverso, como plásmidos que codifican genes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia codificados por fagos. Por otro lado, esto hace que las células sean vulnerables a elementos parásitos que comprometen la aptitud de la población, como los transposones codificados por plásmidos o los fagos virulentos (McGinn & Marraffini, 2019).

Los sistemas CRISPR/Cas proporcionan a las bacterias un mecanismo de defensa específico de secuencia contra la invasión de ácidos nucleicos "extraños", como fagos o plásmidos (Pawluk, Davidson & Maxwell, 2017). El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de resistencia altamente adaptativo y hereditario, que incorpora secuencias cortas de virus y otros elementos genéticos móviles en el locus CRISPR del huésped para ser transcrito y procesado en pequeños RNA que guían la destrucción de ácidos nucleicos invasores (Hryhorowicz, Lipin, Zeyland & Słomski, 2016).

CRISPR son las siglas, en inglés, de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, interrumpidas por secuencias "espaciadoras". En la Figura 2, se muestra que estas secuencias "espaciadoras" son secuencias virales integradas durante infecciones virales pasadas, (Memi et al., 2018) almacenadas en matrices CRISPR, que luego se transcriben, incluidos los espaciadores, y se procesan para hacer un RNA CRISPR guía (crRNA; CRISPR RNA) que se emplea para apuntar específicamente y escindir el genoma del afín virus o plásmido. Numerosas y muy diversas proteínas Cas están involucradas en diferentes pasos del procesamiento de transcripciones de loci CRISPR, escisión del DNA o RNA objetivo y la integración de nuevos espaciadores.

La acción del sistema CRISPR/Cas generalmente se divide en tres etapas, la primera: adquisición o adaptación de nuevos espaciadores en matrices CRISPR, la segunda: expresión y procesamiento de crRNA, procesamiento de la transcripción primaria del locus CRISPR (pre-crRNA; primary transcript of the CRISPR locus) y maduración del crRNA que incluye el espaciador y regiones variables correspondientes a fragmentos 5' y 3' de repeticiones CRISPR, y finalmente la tercera: interferencia de CRISPR (Figura 2) (Makarova & Koonin, 2015).

3.3.1. Adquisición o adaptación

La fase de adquisición de CRISPR construye la memoria genética de la célula. En esta fase, los nuevos espaciadores obtenidos de los plásmidos invasores o DNA extraños durante el primer encuentro se incorporan a la matriz de CRISPR, que permite que la célula se adapte frente a los invasores presentes en el medio ambiente. Por lo tanto, esta fase también se denomina "Adaptación". La información almacenada en los espaciadores se puede utilizar para actuar contra invasores similares al enfrentar el segundo encuentro (Gupta et al, 2019). La adquisición de espaciadores se divide, conceptualmente, en las dos fases siguientes: captura de secuencias espaciadoras del genoma invasor (conocidas como protoespaciadores) e integración de espaciadores. Durante la primera fase, los protoespaciadores se seleccionan y extraen de genomas extraños. En la segunda fase, los espaciadores se procesan e incorporan al locus CRISPR (McGinn & Marraffini, 2019). El protoespaciador también debe contener un motivo adyacente al protospaciador (PAM; protospacer adjacent motif) de tres nucleótidos, en el extremo 5' de la hebra diana. La secuencia PAM es necesaria para la compatibilidad de la enzima Cas y proporciona un mecanismo para que el sistema discrimine entre la secuencia bacteriana y la invasora (Memi et al., 2018). Le sigue la incorporación a la matriz y la síntesis de una nueva secuencia repetida. Cas1 y Cas2 son las dos proteínas más importantes en la fase de adquisición de espaciadores de CRISPR. Funcionan como un complejo, donde un solo dímero de Cas2 se une a dos dímeros de Cas1 para realizar la actividad. La presencia de PAM se utiliza en la adquisición del espaciador. El mecanismo de adquisición del espaciador y la secuencia del motivo PAM varía entre los diferentes tipos de sistemas CRISPR (Gupta et al, 2019).

3.3.2. Expresión de genes CRISPR RNA y Cas:

La adquisición de nuevos espaciadores va seguida de la expresión del crRNA y proteínas Cas. La transcripción CRISPR se inicia en la región líder que contiene los elementos promotores, sitios de unión para proteínas reguladoras y elementos importantes para la integración del espaciador. Se genera una transcripción primaria, pre-crRNA a partir de la matriz CRISPR que se procesa posteriormente en unidades más pequeñas correspondientes a un solo espaciador. El crRNA maduro recién generado interactúa con el crRNA trans-activador (tracrRNA; trans-activating crRNA) y guía la escisión del DNA diana mediada por proteínas Cas.

3.3.3. Interferencia CRISPR

Una vez que se generan los crRNA, reconocen las secuencias diana invasoras a través de la complementariedad de bases. Después de esto, los crRNA junto con las proteínas Cas realizan el proceso de degradación del objetivo. Sin embargo, existen problemas con respecto a la discriminación entre secuencias específicas y no específicas seguidas de la aparición de mutaciones fuera del objetivo. En cada tipo de CRISPR, las nucleasas tienen dos dominios diferentes que actúan juntos para realizar la degradación. Hay un lóbulo de reconocimiento para la unión del tracrRNA que a su vez interactúa con el híbrido de RNA guía (gRNA)-DNA diana, y un lóbulo nucleasa que contiene dominios nucleasa (HNH y RuvC) para la degradación de las dos hebras de la diana (Gupta et al, 2019).

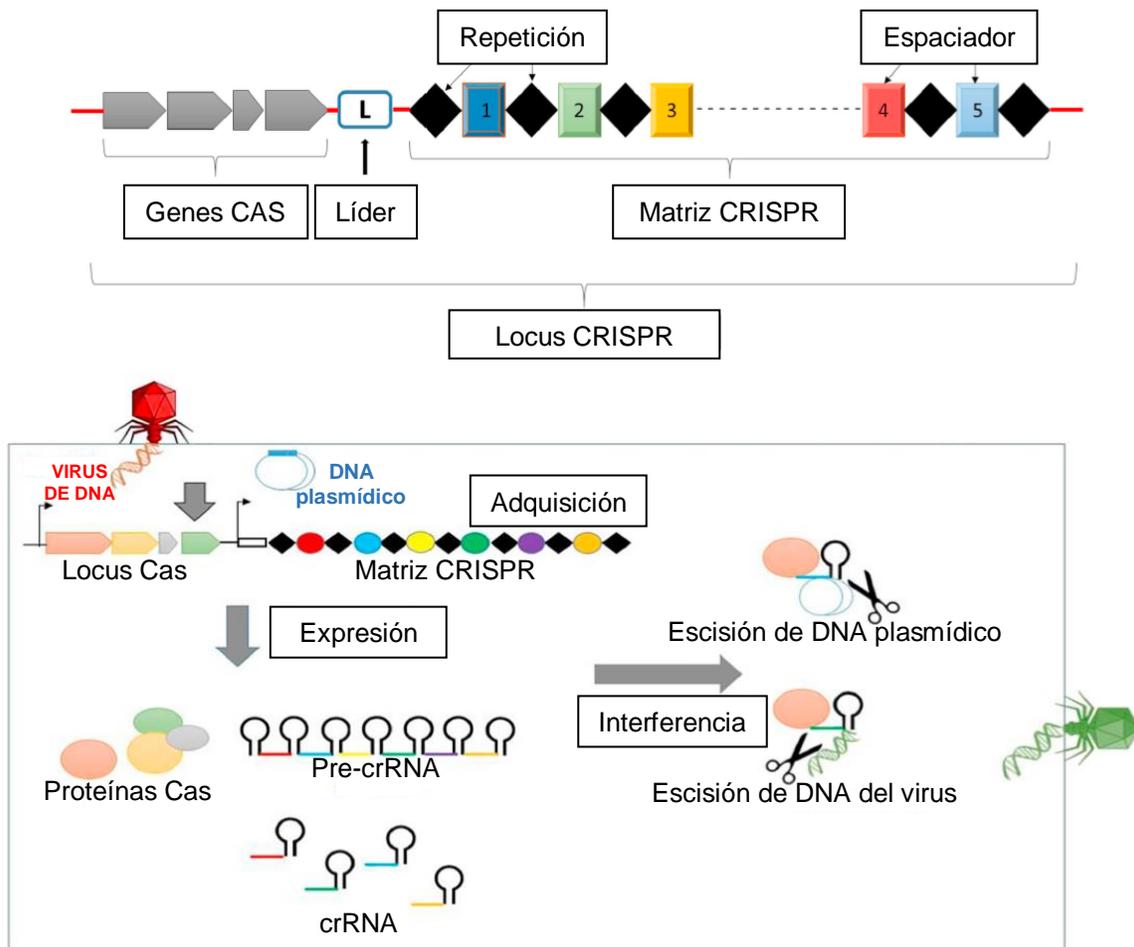


Figura 2. Representación a manera de esquema del locus CRISPR y la función de CRISPR/Cas como sistema inmune. **Locus CRISPR** los espaciadores se representan en cuadros de color y numerados del 1 al 5, los rombos negros pertenecen a las repeticiones, el clúster de los genes Cas (flechas en color gris) se encuentran al lado de las unidades de repetición-espaciador o matriz CRISPR, la secuencia líder (L en el cuadro blanco) se encuentra entre el clúster de los genes Cas y la matriz CRISPR. **CRISPR/Cas como sistema inmune:** Adquisición, inserción de un nuevo espaciador en el locus CRISPR. Expresión, expresión de crRNA y proteínas Cas. La transcripción CRISPR se inicia en la región líder que contiene los elementos promotores. Interferencia: Reconocimiento y degradación de los elementos extraños por el complejo crRNA-Cas9. Modificado de: Gupta. D,

Bhattacharjee. O. Mandal. D, Sen. M, Dey. D, Dasgupta. A, Kazi. T, Gupta. R, Sinharoy. S, Acharya. K, Chattopadhyay. D, Ravichandiran. V, Roy. S, Ghosh. D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. Life Sciences. Vol. 232. 116636. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116636.

3.4 Tipos de sistemas CRISPR/Cas

Los sistemas CRISPR/Cas se agrupan en dos clases amplias (clase 1 y clase 2), dichas clases abarcan seis tipos, según su filogenia y mecanismos de acción. Los sistemas de clase 1, que comprenden los tipos I, III y IV, utilizan complejos de proteínas Cas de múltiples subunidades para el reconocimiento de ácidos nucleicos. Por el contrario, los sistemas de clase 2, que comprenden los tipos II, V y VI, utilizan una única proteína efectora (como Cas9) que realiza funciones de reconocimiento de diana y escisión de ácidos nucleicos. En particular, el sistema CRISPR/Cas9 de tipo II se ha adaptado ampliamente para la edición del genoma y otras aplicaciones biotecnológicas (Pawluk et al., 2017).

3.5 Estructura de la proteína Cas9

La proteína Cas9 tiene seis dominios, REC I, REC II, Bridge Helix (traducido literalmente al español “hélice puente”), PAM Interacting (dominio que interactúa con PAM), HNH y RuvC, aunque aún no se conocen a profundidad las funciones de cada uno, se sabe que el dominio Rec I es responsable de la unión del gRNA. El papel del dominio REC II aún no se comprende bien. La Bridge Helix rica en arginina es crucial para iniciar la actividad de escisión tras la unión del DNA diana. El dominio que interactúa con PAM confiere especificidad a PAM y, por lo tanto, es responsable de iniciar la unión al DNA diana. Los dominios HNH y RuvC son dominios nucleasa que cortan el DNA monocatenario. Son homólogos a los dominios HNH y RuvC que se encuentran en otras proteínas. El gRNA está compuesto por un RNA monocatenario (20 bases de largo) en forma de T, consta de un tetraloop y dos o tres stem loops (tallo-bucle). El gRNA está diseñado para tener un extremo 5' que es complementario a la secuencia de DNA diana, lo que proporciona especificidad de secuencia (Gupta et al, 2019).

3.6 Mecanismo de acción de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética

La capacidad de realizar prácticamente cualquier cambio específico en el genoma de cualquier célula u organismo vivo es una aspiración que la biología molecular ha tenido durante un largo tiempo (Anzalone, Randolph, Davis, Sousa, Koblan, Levy, Chen, Wilson, Newby, Raguram & Liu, 2019). Charpentier y Doudna recibieron el Premio Nobel 2020 en Química por dar al mundo las tijeras genéticas CRISPR/Cas9 en 2012, haciendo posible que los investigadores puedan cambiar el DNA de animales, plantas y microorganismos con una precisión extremadamente alta. Esta tecnología ha tenido un impacto revolucionario en las ciencias de la vida contribuyendo a nuevas terapias contra el cáncer y puede hacer realidad el sueño de curar enfermedades hereditarias.

Durante sus estudios sobre *Streptococcus pyogenes*, una de las bacterias que más daño causan a la humanidad, Emmanuelle Charpentier descubrió una molécula previamente desconocida, el tra-crRNA. Su trabajo mostró que el tra-crRNA es parte del antiguo sistema inmunológico de las bacterias, CRISPR/Cas, que desarma los virus al escindir su DNA. En colaboración con Jennifer Doudna, lograron recrear las tijeras genéticas de las bacterias en un tubo de ensayo y simplificaron los componentes moleculares de CRISPR/Cas9 para que fueran más fáciles de usar. (The Royal Swedish Academy, 2020).

Aunque se han utilizado sistemas CRISPR/Cas diferentes, con la intención de editar el genoma, el más utilizado es el sistema CRISPR/Cas9 tipo II de *Streptococcus pyogenes* (Adli, 2018), que consta de la endonucleasa Cas9 y un RNA de guía única (sgRNA) que tiene dos componentes: un crRNA y un tracrRNA (Hendel, Bak, Clark, Kennedy, Ryan, Roy, Steinfeld, Lunstad, Kaiser, Wilkens, Bacchetta, Tsalenko, Dellinger, Bruhn & Porteus, 2015). Las nucleasas programables CRISPR/Cas9 producen DSB en las cadenas de DNA con el fin de modificar la secuencia del genoma de un organismo (Anzalone, et al., 2019).

En su forma natural, CRISPR/Cas9 reconoce el DNA de los virus, pero Charpentier y Doudna demostraron que podía controlarse para poder cortar cualquier molécula de DNA en un sitio predeterminado. Donde se corta el DNA, es fácil reescribir el

código de la vida (The Royal Swedish Academy, 2020). El mecanismo de la ingeniería del genoma mediada por CRISPR/Cas9, que se muestra en la Figura 3, se da de la siguiente manera: la estructura sintética de sgRNA o crRNA/tra-crRNA de 20 nucleótidos definida por el usuario, dirige una endonucleasa Cas9 a una secuencia de DNA específica en el genoma para introducir una DSB a través del emparejamiento de bases con el DNA genómico diana (Jiang & Doudna, 2017). CRISPR/Cas9 tiene dos dominios catalíticos (HNH y RuvC) que actúan juntos para mediar los DSB de DNA. Cada uno de estos dominios catalíticos escinde una hebra de DNA, lo que da como resultado DSB proximales a la secuencia PAM en el sitio objetivo (Adli, 2018). La DSB generada por los dos dominios de la nucleasa Cas9 distintos se repara mediante mecanismos de reparación del DNA mediados por el anfitrión. En ausencia de una plantilla de reparación, la vía NHEJ, se activa y causa INDELS aleatorias o incluso sustituciones en el sitio DSB, lo que con frecuencia da como resultado la interrupción de la función génica. En presencia de una plantilla donante que contiene una secuencia de interés flanqueada por brazos de homología, se puede iniciar la vía HDR para crear las mutaciones deseadas mediante la recombinación homóloga, que proporciona la base para realizar una modificación génica precisa, como un gen knock-in (aquel al que se le ha sustituido una secuencia génica por otra diferente o modificada), delección, corrección o mutagénesis (Jiang & Doudna, 2017).

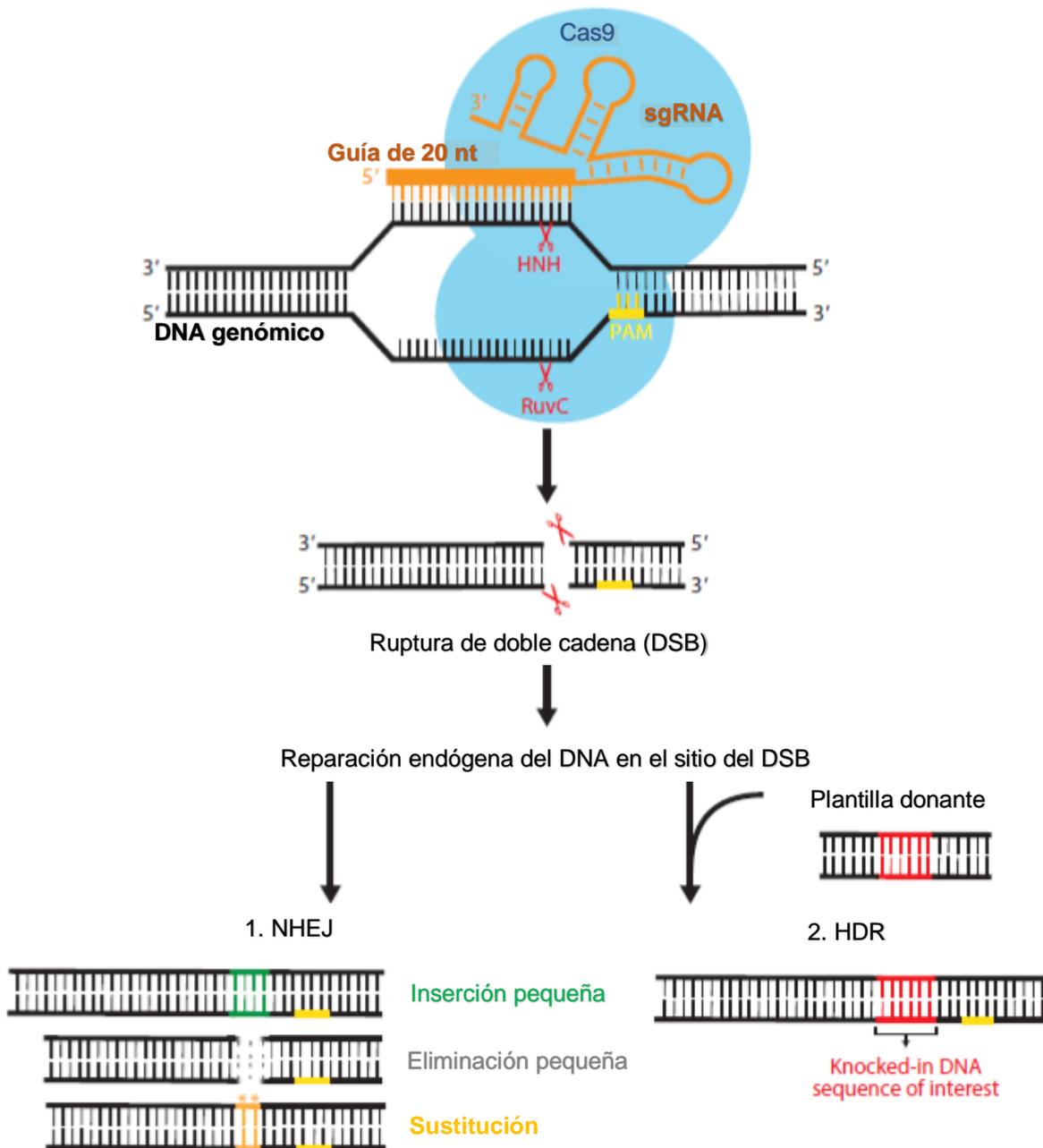


Figura 3. Mecanismo de acción de CRISPR/Cas9. La unidad de sgRNA guía a Cas9 a un locus genómico específico a través del emparejamiento de bases entre la secuencia de crRNA y la secuencia objetivo. Al unirse a la secuencia objetivo, la endonucleasa Cas9 induce DSB, que son reparadas por la maquinaria de respuesta al daño del DNA celular a través de dos mecanismos distintos: 1. unión de extremos

no homólogos (NHEJ), el mecanismo predominante que da como resultado INDELS o sustituciones en la secuencia reparada, o 2. reparación dependiente de homología (HDR), que resulta en ediciones precisas de nucleótidos, ya que la ruptura se repara mediante el uso de una plantilla donante de DNA endógena o exógena. Por lo que al inducir NHEJ o HDR, CRISPR/Cas9 se puede usar para eliminar, reemplazar o agregar secuencias genéticas. Modificado de: Jiang. F, Doudna. J. (2017). CRISPR/Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*. Vol. 46. 505 – 529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

3.7 Formatos de CRISPR/Cas9 para su administración

La entrega de sistemas CRISPR/Cas9 se basa principalmente en tres formatos. El primer formato es la entrega de DNA plasmídico (pDNA; plasmid DNA), que codifica Cas9 y sgRNA. El segundo es la entrega de los elementos de RNA mensajero (mRNA; messenger RNA) y sgRNA, el mRNA se convierte en nucleasas Cas9 a través del proceso de traducción en el citoplasma. El último es el complejo de proteína Cas9 y sgRNA que se denomina complejo de ribonucleoproteína Cas9/sgRNA (RNP) y muestra ventajas de seguridad, así como bajos efectos fuera del objetivo (Xu, Wan, Xin, Li, Pan, Wu & Ping, 2019).

El sistema basado en pDNA enfrenta varios desafíos. Primero, el plásmido debe administrarse al núcleo, lo que generalmente es difícil. En segundo lugar, el plásmido debe traducirse en mRNA para convertirse en Cas9 dentro de las células, lo que requiere más tiempo para editar el objetivo. Por otro lado, se ha demostrado que la administración del sistema CRISPR/Cas9 basado en pDNA produce más efectos fuera del objetivo.

La entrega directa del mRNA y sgRNA en las células diana, edita el genoma después de expresar la proteína Cas9 y posteriormente formar el complejo Cas9/sgRNA dentro de las células. La ventaja de administrar mRNA es la expresión transitoria de la proteína Cas9, que limita la duración de la edición de genes. La entrega de mRNA tiene menos efectos fuera del objetivo que la entrega del sistema CRISPR/Cas9 basado en plásmidos, ya que, el mRNA solo necesita ingresar al citoplasma para ejercer sus efectos. Además, el uso del mRNA que codifica la

proteína Cas9 muestra una baja citotoxicidad en células primarias y líneas celulares. Sin embargo, la estabilidad relativamente pobre del mRNA es un obstáculo para este tipo de estrategia de edición de genes.

Entregar de manera directa el complejo de RNP es la estrategia más estudiada en los últimos años. La proteína Cas9 purificada está cargada positivamente y puede formar de manera eficiente un complejo con el sgRNA. Esta vía tiene numerosas ventajas, incluida una acción rápida; alta eficiencia de edición de genes; ningún requisito de optimización de codones y selección de promotores; y reducción de efectos fuera del objetivo, toxicidad y respuestas inmunes (Liu, Zhang, Liu, Cheng, 2017).

3.8 Sistemas de entrega para administrar CRISPR/Cas9 en células

La entrega intracelular de biomacromoléculas como el DNA, el RNA y las proteínas, ha sido un foco de mucha investigación, por lo que, se han desarrollado múltiples métodos para facilitar la entrega. Estos métodos de administración se pueden clasificar generalmente como 3.8.1 vectores virales o 3.8.2 vectores no virales. La administración viral utiliza un vector viral, como lentivirus y adenovirus, para encapsular un gen en forma de RNA o DNA y facilitar la administración eficiente. La administración no viral incluye métodos como la electroporación y la microinyección, métodos basados en lípidos catiónicos y péptidos penetrantes de células (CPP; Cell-penetrating peptides) (Yin et al., 2017).

Para la edición terapéutica del genoma, generalmente existen dos rutas para la administración de CRISPR/Cas9. Una ruta es la administración *in vivo*, donde los agentes de edición del genoma se inyectan directamente en el cuerpo, a través de ciertas vías de administración para la transfección directa de dichos componentes. La otra ruta es la administración *ex vivo*, en la que las células se aislaron primero del cuerpo animal o humano, seguido de la transfección *in vitro* y la administración de las células editadas de nuevo al cuerpo. Hasta la fecha, se han adoptado vectores de administración tanto virales como no virales para la aplicación terapéutica de la edición del genoma.

3.8.1 Vectores virales

Los vectores virales se han desarrollado durante más de tres décadas para administrar diversas terapias basadas en ácidos nucleicos, y algunos de ellos han sido aprobados para usos clínicos. A pesar de sus preocupaciones sobre la seguridad y la posibilidad de introducir mutaciones no deseadas, los sistemas de liberación viral tienen, hasta ahora, los sistemas más eficientes para administrar ácidos nucleicos basados en plásmidos a células de mamíferos, *in vitro* e *in vivo*. Como resultado, los vectores virales se han aplicado ampliamente para administrar CRISPR/Cas9 basado en pDNA a células de mamíferos (Liu, et al., 2017).

La entrega mediada por virus se logra a través de dos mecanismos: infección y replicación. Durante la etapa de infección, un virus puede reconocer e ingresar a una célula específica, y el genoma viral se liberará al núcleo (en el caso del DNA) o al citoplasma (en el caso del RNA) para su replicación. Después de la replicación del genoma viral en las células, los viriones reproducidos salen de las células. La etapa de infección comienza de nuevo en las células vecinas y continúa el ciclo de infección-replicación. El virus que contiene el material de administración (nucleasa de edición del genoma programada) se transporta a las células diana y la terapia génica se puede lograr mediante la edición del genoma. Se han desarrollado varios vectores virales tales como 3.8.1.1 vectores adenovirales (AdV), 3.8.1.2 vectores virales adenoasociados (AAVV) y 3.8.1.3 vectores lentivirales (LV) (Chandrasekaran, Song, Kim & Ramakrishna, 2018).

3.8.1.1 Vectores Adenovirales (AdV)

Los vectores adenovirales (AdV; adenoviral vector) pueden contener fácilmente todos los elementos para la edición del genoma debido a su alta capacidad de empaquetamiento, expresando tanto la proteína Cas como uno o varios sgRNA. Además, también se pueden coadministrar grandes secuencias de DNA de donantes para mediar en la reparación dependiente de homología. La ventaja de esto es que el sgRNA y la proteína Cas se expresan consistentemente en la misma célula en una proporción fija y dado que los AdV no se integran, la expresión de Cas es transitoria en las células en división. Los AdV se han utilizado con éxito para la

edición del genoma *in vivo* en ratones, aunque se observó toxicidad, relacionada con el sistema inmunitario (Wilbie, Walther & Mastrobattista, 2019).

3.8.1.2 Vectores Virales Adenoasociados (AAVV)

Los vectores virales adenoasociados (AAVV; Adeno-associated viral vector) son uno de los sistemas de entrega más utilizados para la transducción de genes debido a su capacidad para infectar células que se encuentra en proceso de división y aquellas que no lo están, sin patogenicidad e inmunogenicidad muy leve. En 2012, Europa aprobó el primer fármaco de terapia génica basado en AAVV, Glybera, para los pacientes con deficiencia de lipoproteína lipasa, lo que sugiere la gran promesa de AAVV para la terapia génica. El mismo AAVV desarrollado para terapia génica se ha utilizado para CRISPR/Cas9 basado en pDNA.

El desafío para la entrega de CRISPR/Cas9 mediada por AAVV es el límite de empaquetamiento. Alternativamente, se pueden usar AAVV duales para entregar DNA que codifica Cas9 y sgRNA por separado para superar este límite de un solo AAVV. A pesar del éxito de esta estrategia, la inyección de dos AAVV en una célula diana tiene un elevado costo de eficiencia en términos de entrega y corte de DNA objetivo (Liu et al., 2017).

3.8.1.3 Vectores Lentivirales (LV)

El lentivirus (LV; lentiviral vector) es otro vector viral comúnmente utilizado para terapia génica. Además de su leve inmunogenicidad y la expresión a largo plazo de genes transducidos, la mayor ventaja del LV es su alta eficacia de infección, incluso en células que no se dividen. Esta ventaja es crucial para la modificación de genes en tejidos como el hígado, el cerebro y los músculos (Liu et al., 2017).

Sin embargo, la característica que hace que este vector sea adecuado para la entrega de genes (expresión estable y duradera) es contraproducente para fines de edición de genes. Se considera que la expresión duradera de la proteína Cas9 es desfavorable debido a la formación de INDELS dentro del objetivo y fuera del objetivo. De hecho, una comparación directa de las frecuencias de formación de INDELS en tres posibles sitios genómicos fuera del objetivo por Cas9, entregada

como mRNA, pDNA y RNP mostró las frecuencias más altas fuera del objetivo con el método de administración LV. Para contrarrestar esto, se han diseñado construcciones auto-inactivantes en las que el vector LV codifica la proteína Cas9 y dos sgRNA: uno contra la secuencia diana de elección y otro contra el gen Cas9. De esta forma, se puede obtener la expresión transitoria de Cas9 a partir de un vector lentiviral integrador (Wilbie et al., 2019).

3.8.2 Vectores no virales

Las desventajas de los sistemas virales, como una capacidad de empaquetamiento limitada y una activación inmunitaria, han llevado al desarrollo de vectores de administración no virales. Los vectores no virales suelen estar bien caracterizados y controlados, no dependen de un genoma viral y se puede optimizar su estabilidad en el suero o su capacidad de direccionamiento mediante modificaciones químicas adecuadas (Wilbie et al., 2019). Aunque, los vectores virales son más eficaces para administrar ácidos nucleicos, como CRISPR/Cas9 en forma de pDNA, la seguridad y que no haya una limitación de tamaño para el DNA transgénico son las principales ventajas de los sistemas de administración no virales.

Es importante destacar que la disponibilidad y la rentabilidad de los sistemas de administración no virales los hacen atractivos para aplicar el sistema CRISPR/Cas9 a pacientes humanos en lugar de sistemas de administración viral (Liu et al., 2017). Las desventajas incluyen lograr una biocompatibilidad adecuada y una potencial toxicidad, respuesta inmunogénica y problemas con la liberación de cargas terapéuticas (Wilbie et al., 2019). A continuación, se presenta una breve revisión de los principales vectores de administración no virales.

3.8.2.1 Electroporación

Los ácidos nucleicos no entran en las células por sus propios medios; necesitan ayuda para cruzar las barreras físicas en el límite celular y para llegar a un sitio intracelular donde puedan expresarse y/o replicarse. La exposición de muchos tipos de células a una descarga eléctrica desestabiliza reversiblemente sus membranas e induce transitoriamente la formación de poros lo que permite a los ácidos

nucleicos entrar en el citoplasma celular, a este proceso se le conoce como electroporación (Kumar et al., 2019).

La electroporación es un método ampliamente utilizado para administrar proteínas y ácidos nucleicos en células de mamíferos y es adecuada para todo tipo de sistemas CRISPR/Cas9, incluidos los sistemas CRISPR/Cas9 basados en pDNA, la mezcla de mRNA y sgRNA, y RNP. La electroporación sigue siendo el método de elección para la transfección no viral *in vitro* y *ex vivo* y la posterior traducción clínica (Li, Røise, He, Das & Murthy, 2020). La limitación de la electroporación es que el pDNA solo se integra en aproximadamente el 0,01% de las células diana e induce una muerte celular significativa, sin embargo, los protocolos de electroporación se han optimizado para minimizar la toxicidad y la muerte celular (Liu et al., 2017).

3.8.2.2 Microinyección

La microinyección es la inyección directa de moléculas extrañas en células vivas utilizando una micropipeta de vidrio a nivel microscópico. Como procedimiento mecánico simple, la microinyección se ha convertido en una técnica de laboratorio común para administrar proteínas o DNA exógenos en células individuales. La microinyección se utilizó para inyectar directamente el sistema CRISPR/Cas9 en células embrionarias y otras células con una alta reproducibilidad y especificidad.

Debido a su simplicidad y precisión, la microinyección se ha utilizado para evaluar la eficacia de edición de genes de diferentes sistemas CRISPR/Cas9 basados en plásmidos dirigidos al mismo gen. Sin embargo, la inyección de plásmidos circulares puede causar efectos secundarios no deseados cuando el plásmido se integra en los cromosomas del huésped.

Las desventajas de esta técnica son: en primer lugar, la inducción del daño celular, por lo que requiere un alto nivel de sofisticación y habilidades manuales, en segundo lugar, solo se puede apuntar una sola célula en cada inyección, por último, este método solo es adecuado para un número limitado de células (Liu et al., 2017).

3.8.2.3 Deformación mecánica de la célula

Yen et al. desarrollaron un método físico novedoso para administrar Cas9 RNP en células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas del paciente (HSPC; hematopoietic stem and progenitor cells). Cuando una célula pasa a través de filtros de membrana con un tamaño de poro más pequeño que la célula, la deformación celular formará "poros" transitorios que permiten que las biomoléculas extracelulares se difundan pasivamente dentro de la célula. Los autores optimizaron el método variando el grosor de la membrana, los diámetros de los poros, la presión de nitrógeno y las concentraciones de HSPC y midieron la expresión superficial de β 2-microglobulina (B2M) como lectura para evaluar la eficiencia de administración de RNP que contiene un sgRNA dirigido a B2M en las HSPC (Li et al., 2020).

3.8.2.4 Inyección hidrodinámica

La inyección hidrodinámica es la inyección rápida de una solución de ácido nucleico en roedores a través de la vena de la cola en volúmenes equivalentes al 8-10% del peso corporal. Desde su descubrimiento, se ha convertido en el método más simple y eficaz para administrar ácidos nucleicos al hígado. La presión hidrodinámica se produce mediante la administración rápida de un gran volumen de una solución de ácido nucleico para inducir la formación de poros temporales en la membrana de las células endoteliales, con el fin de facilitar la entrada del ácido nucleico en ellas. Recientemente, el sistema CRISPR/Cas9 basado en pDNA se entregó con éxito mediante inyección hidrodinámica, generó correcciones genéticas y mutaciones eficientes.

A pesar de su éxito en animales pequeños, la inyección hidrodinámica no es una buena opción para animales grandes, porque aumenta la presión arterial e induce disfunción cardíaca temporal, expansión del hígado e incluso la muerte del animal (Liu et al., 2017).

3.8.2.5 Transducción inducida por osmocitosis y propanebetaína (iTOP)

La transducción inducida por osmocitosis y propanebetaína (iTOP; induced transduction by osmocytosis and propane betaine) es un método recientemente

desarrollado para la administración de proteínas de edición del genoma, que se basa en la osmocitosis y la propanbetaína (un compuesto de transducción) para la administración eficaz de varias macromoléculas, incluidas Cre recombinasa y Cas9 RNP, en una amplia variedad de células primarias (Li et al., 2020).

Un tampón hiperosmolar que contiene cloruro de sodio y propanbetaína estimula la macropinocitosis, lo que conduce a la absorción celular. La transducción de iTOP es eficaz para el suministro intracelular de la proteína Cas9 y los sgRNA por separado, o el suministro directo de RNP. Los RNP se han administrado con éxito en varios tipos de células primarias utilizando iTOP. La coadministración de proteína Cas9 y sgRNA en células madre embrionarias humanas produce hasta un 26% de eficacia en la edición de genes después de dos administraciones. En comparación con otros métodos, incluida la electroporación, los lípidos catiónicos y las CPP, iTOP produce una menor eficiencia de edición de genes en las células primarias. Además, la proteína Cas9 solo es soluble en altas concentraciones de sal utilizadas en iTOP y, por lo tanto, no es adecuada para aplicaciones *in vivo* (Liu et al., 2017).

3.8.2.6 Lípidos

Las nanopartículas de lípidos desempeñan un papel importante en la entrega de elementos CRISPR/Cas9 a las células y pueden proteger la carga de la degradación hasta cierto punto. Como ya se ha mencionado anteriormente, la edición del genoma por CRISPR/Cas9 podría realizarse a través de la entrega de pDNA, mRNA/sgRNA y RNP, y todos estos formatos se pueden encapsular en un liposoma. El sgRNA tiene carga negativa, mientras que las proteínas Cas9 poseen una carga positiva lo que conlleva a la formación de los complejos de RNP cargados negativamente como resultado de la carga excesiva de sgRNA. La interacción electrostática entre los lípidos y la carga impulsa la formación de liposomas cargados de RNP. El liposoma catiónico, al tener carga positiva, tiene la ventaja de interactuar con la carga negativa de la membrana celular y esto encapsula los ácidos nucleicos más fácilmente. El proceso de fusión, que se refiere a la interacción entre el liposoma catiónico y la membrana celular, es crucial para que los portadores de lípidos liberen su carga intracelular (Xu et al., 2019).

Los lípidos catiónicos tienen un gran potencial para administrar los complejos de RNP. Sin embargo, las formulaciones a base de lípidos son en general inestables, especialmente en presencia de suero. Además, los lípidos catiónicos pueden perturbar y desestabilizar fácilmente la membrana celular, lo que conduce a una toxicidad grave. Además, las partículas de lípidos catiónicos se internalizan principalmente en las células a través de la endocitosis, y las cargas quedan atrapadas y se degradan fácilmente en los endosomas, lo que reduce la eficacia de la transfección. La incorporación de moléculas disruptivas endosomales sensibles sería una opción para mejorar la eficiencia de administración de las formulaciones de complejos de RNP basadas en lípidos (Li et al., 2020).

3.8.2.7 Polímeros

La flexibilidad inherente de la estructura del polímero lo convierte en una clase fascinante de material de suministro para elementos CRISPR/Cas9. Mediante el diseño racional de una estructura química, los portadores poliméricos pueden evitar los problemas de inestabilidad del suero en contraste con los portadores lipídicos. Como vectores no virales, los polímeros se han estudiado intensamente para entregar elementos CRISPR/Cas9, en gran parte como resultado de su biocompatibilidad, flexibilidad y simplicidad, etc (Xu et al., 2019).

En un estudio reciente, un polímero catiónico, bPEI, se conjugó covalentemente con la proteína Cas9, que luego se complejó con sgRNA para formar una nanopartícula CRISPR. El Cas9 conjugado con polímero mantiene su actividad nucleasa para inducir DSB en su gen diana. La nanopartícula a base de polímero entregó con éxito el sistema CRISPR a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente y editó eficazmente el genoma objetivo. Este sistema también demostró una mayor eficacia de edición en comparación con Cas9/sgRNA no modificado complejado con lípidos convencionales (Liu et al., 2017).

3.8.2.8 Péptido penetrante de células (CPP)

CPP es un péptido corto que se puede trasladar a través de la membrana celular. El CPP se puede enlazar con CRISPR/Cas9 para su administración en una amplia

variedad de células. Por ejemplo, la proteína Cas9 se puede enlazar covalentemente a un CPP, y los complejos de sgRNA con otro péptido CPP similar a través de interacciones electrostáticas. La mezcla del conjugado Cas9/ CPP y el complejo sgRNA/ CPP se administraron de forma concomitante en las mismas células y se editaron los genes a tasas que iban del 2,3% al 16% en diferentes líneas celulares, incluidas HeLa, HEK293T, fibroblastos dérmicos, células embrionarias y células madre embrionarias (Liu et al., 2017).

Este enfoque tiene algunas ventajas sobre otros métodos no virales debido a su liberación sin reactivos químicos y menos efectos fuera del objetivo (Chandrasekaran et al., 2018).

3.8.2.9 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro son un método de administración novedoso para los complejos de RNP. Las nanopartículas de oro se ensamblan con la proteína Cas9 y el sgRNA, este sistema de entrega mediado por nanopartículas logra una eficiencia de entrega superior al 90% y una eficiencia de edición de genes del 30% en una amplia variedad de tipos de células. La entrega mediada por nanopartículas de la proteína Cas9 y el sgRNA modificados se logra mediante un proceso de fusión de membrana dependiente del colesterol que es distinto de la endocitosis celular, lo que puede subrayar la notable eficiencia de entrega de este sistema (Liu et al., 2017).

En la Tabla 1 se resumen los sistemas de entrega que se han aprovechado para la administración de CRISPR/Cas9 en sus diferentes formatos, mientras que en la Tabla 2 se presentan las principales ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de entrega para administrar CRISPR/Cas9.

Tabla 1. Sistemas de entrega para CRISPR/Cas9

Formato de CRISPR/Cas9	Sistemas de entrega
DNA plasmídico	Electroporación, Inyección hidrodinámica, Microinyección, Deformación mecánica de la célula, Lípidos, AdV, AAVV y LV.
mRNA y sgRNA	Electroporación, Microinyección y Lípidos.
Complejo de RNP	Electroporación, iTOP, Lípidos, Polímeros, CPP y Nano partículas de oro.

Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de entrega para administrar CRISPR/Cas9

Sistemas de entrega	Ventajas	Desventajas
AdV	<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidad de empaquetamiento. - Expresión transitoria de Cas9 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidad relacionada con el sistema inmunitario.
AAVV	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiencia de infección. - Seguro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada capacidad de empaque. - Difícil de producir.
LV	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada capacidad de infección. - Gran capacidad de empaquetamiento. - Expresión genética a largo plazo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutagénesis insercional.
Electroporación	<ul style="list-style-type: none"> - Adecuado para cualquier tipo de célula. - Alta eficiencia de transfección. - Puede ser usada <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Induce muerte celular significativa. - Transfección no específica.

	<ul style="list-style-type: none"> - Apto para todos los formatos de entrega de CRISPR/Cas9. 	
Microinyección	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidad y reproducibilidad. - Apto para todos los formatos de entrega de CRISPR/Cas9. 	<ul style="list-style-type: none"> - Induce daño celular. - Requiere un alto nivel de sofisticación y destreza manual.
Deformación mecánica celular	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiencia de administración - Baja inducción de muerte celular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada a uso <i>in vitro</i>.
Inyección hidrodinámica	<ul style="list-style-type: none"> - Método simple y eficiente para transfección <i>in vivo</i> en animales pequeños. - Alta eficiencia de transfección en el hígado. - Apropiaada para todos los formatos de entrega de CRISPR/Cas9. 	<ul style="list-style-type: none"> - Puede causar insuficiencia cardíaca, expansión del hígado y eventualmente la muerte del animal. - No es adecuado para su administración en animales grandes ni aplicaciones clínicas. - Es eficiente para la transfección en el hígado, pero no para otros órganos.
iTOP	<ul style="list-style-type: none"> - Efectivo para la administración de la proteína Cas9 y el sgRNA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja eficiencia en células primarias. - No es adecuado para aplicaciones <i>in vivo</i>.
Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil de preparar. - Seguro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja eficiencia de liberación.

	- Apropriado para todos los formatos de entrega de CRISPR/Cas9.	
Polímeros	- Fácil de preparar. - Seguro. - Adecuado para todos los formatos de entrega de CRISPR/Cas9.	- Baja eficiencia de liberación.
CPP	- Seguro. - Tamaño pequeño.	- Se requiere la formación de un enlace covalente.
Nanopartículas de oro	- Alta eficiencia de liberación.	- A altas concentraciones tiene un importante potencial tóxico <i>in vivo</i> .

3.9 Aplicaciones de CRISPR/Cas9

Con el desarrollo del conocimiento sobre el material hereditario, se notó que muchas de las enfermedades intratables tenían su origen en el código genético mismo. Por lo tanto, el objetivo proyectado para cualquier tecnología de modificación del DNA había sido corregir estos errores de raíz (Gupta et al., 2019). Las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de los Estados Unidos de América (E.U.A.) lanzaron la Iniciativa de edición de genes humanos en 2015, que en colaboración con la British Royal Society y la Chinese Academy of Sciences culminó en la Cumbre Internacional sobre Edición de Genes Humanos. A través de su informe, "Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance (Edición del genoma humano: ciencia, ética y gobernanza)", clasificaron la edición de genes humanos en cuatro amplias áreas de aplicación: (3.9.1) investigación básica, (3.9.2) usos clínicos de la edición de células somáticas para el tratamiento y prevención de enfermedad y discapacidad, (3.9.3) edición de la línea germinal humana (HGGE) y cambios hereditarios, y (3.9.4) uso de la edición del genoma para "mejora" (Memi et al., 2018).

3.9.1 Investigación de laboratorio de ciencia básica

La generación de mutaciones dirigidas es un paso crucial hacia el estudio del efecto biomédico de genes de interés (Yumlu, Bashir, Stumm, & Kühn), por lo que los modelos animales que imitan estrechamente una enfermedad humana y que a menudo presentan lesiones genéticas idénticas a las identificadas en los pacientes, se ha convertido en un requisito esencial (O'Brien & Morello, 2018) para el estudio de las funciones de los genes y la comprensión de los mecanismos de las enfermedades humanas (Yoshimi, Kunihiko, Kaneko, Nagahora, Voigt & Mashimo, 2016). Hoy en día, estos modelos animales constituyen una herramienta importante para el descubrimiento y la prueba de nuevas dianas terapéuticas en la investigación preclínica (O'Brien & Morello, 2018). Sin embargo, históricamente, la generación de ratones mutantes ha requerido mucho tiempo y trabajo. La identificación del sistema CRISPR/Cas9 ha revolucionado el campo de la genética (Carroll, Makarewich, McAnally, Anderson, Zentilin, Liu, Giacca, Bassel-Duby &

Olson, 2016). Pues ha permitido a los investigadores modelar enfermedades y avanzar en las técnicas de intervención terapéutica de una manera clínicamente eficaz (Limanskiy, Vyas, Chaturvedi & Vyas, 2019).

El trastorno neuromuscular ligado al cromosoma X, la DMD es uno de los trastornos genéticos más comúnmente diagnosticados en la infancia (Naidoo & Anthony, 2019). Es causada por mutaciones de cambio del marco de lectura en el gen DMD que impiden la traducción de su producto proteico, la distrofina ((Younga, Mokhonova, Quinonez, Pyle, & Spencer, 2017)). El complejo de distrofina estabiliza la membrana plasmática de las células del músculo estriado. La pérdida de función por mutaciones en los genes que codifican la distrofina, o las proteínas asociadas, desencadena la inestabilidad de la membrana plasmática y la pérdida de miofibrillas (Gao & McNally, 2015). Aunque la DMD se caracteriza por la pérdida progresiva de la fuerza y función muscular, también prevalecen el deterioro cognitivo y los síntomas neuropsiquiátricos. Cada vez hay más pruebas que vinculan estos síntomas con la pérdida de distrofina en el cerebro (Naidoo & Anthony, 2019).

Se están adoptando varios enfoques diferentes para el desarrollo de terapias dirigidas para la DMD, con el objetivo de prevenir la progresión de la enfermedad o revertir algunas de las patologías asociadas a la enfermedad. Se ha descubierto o generado una amplia gama de modelos de mamíferos para la DMD. El más conocido es el ratón distrófico mdx, que tiene una mutación de parada prematura en el exón 23 del gen *Dmd* murino y, en consecuencia, no produce distrofina. Aunque el ratón mdx es un buen modelo bioquímico de DMD y muestra elementos de las primeras etapas de la enfermedad, los ratones tienen una esperanza de vida ligeramente más corta y no muestran signos clínicos evidentes de distrofia muscular.

Sui et al. en 2018 desarrollaron un modelo de conejo para DMD. Utilizaron CRISPR/Cas9 para apuntar al exón 51 del gen DMD para eliminar la expresión de distrofina en un conejo de Nueva Zelanda. Los conejos DMD Knockout mostraron una movilidad significativamente reducida e incapacidad para subir un escalón (Wells, 2018).

3.9.2 Usos clínicos de la edición de células somáticas para el tratamiento y prevención de enfermedad y discapacidad

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Más de 11 millones de personas son diagnosticadas con cáncer y se ha estimado que esta tasa aumentará a 16 millones para 2020 (Wang, Lei & Han, 2018). Hace cien años, el cáncer no era tan común; sin embargo, desde las últimas dos décadas, su incidencia ha aumentado de manera alarmante, probablemente debido a nuestro estilo de vida cambiante, hábitos y mayor esperanza de vida. El cáncer es una de las enfermedades más temidas del siglo XX y se está extendiendo aún más con una persistencia y una incidencia creciente en el siglo XXI. La situación es tan alarmante que una de cada cuatro personas corre un riesgo de desarrollar cáncer (Roy & Saikia, 2016).

El cáncer es una enfermedad o un conjunto de enfermedades (Hausman, 2019), que se caracterizan por el crecimiento anormal de células. Los cánceres surgen de cualquier órgano o estructura corporal y están compuestos por células que han perdido la capacidad de dejar de crecer (Roy & Saikia, 2016).

Aunque durante el último medio siglo, las tasas de supervivencia de personas con cáncer ha aumentado, como en la leucemia infantil que paso del 10% a más del 80%, aún no se ha desarrollado una cura definitiva (Hausman, 2019).

El sistema CRISPR/Cas9 ha producido una revolución en el campo de la terapia celular, que involucra principalmente la terapia con células del sistema inmune y la terapia con células madre (Zhang, Quan, Wang, 2018). Un ejemplo son las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T; Chimeric antigen receptor T) que es un tipo de tratamiento en el que las células T (tipo de célula del sistema inmunitario) del paciente se modifican en el laboratorio para que ataquen a las células cancerosas. Las células T se extraen de la sangre del paciente, y en el laboratorio, se les añade el gen de un receptor especial que se une a cierta proteína de las células cancerosas del paciente. Este receptor especial se llama receptor de antígeno quimérico (CAR; Chimeric antigen receptor). En el laboratorio se producen grandes cantidades de células T con CAR y se administran al paciente mediante

infusión. La terapia de células T con CAR se usa para el tratamiento de ciertos cánceres de la sangre, y está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. También se llama terapia celular CAR-T, terapia de células T con receptor de antígeno quimérico y terapia de linfocitos T con CAR (Instituto nacional del cáncer (NIH), 2019).

La viabilidad de usar células T con CAR para la terapia dirigida de neoplasias malignas se ha establecido mediante el uso de RNP administradas por electroporación para transfectar varias dianas activadas, incluidas CXCR4, CCR5, PD-1 y CD7 en células T humanas. Los primeros ensayos clínicos que utilizan CRISPR/Cas9 para crear un knock-out de PD-1 (Zhang, Quan, Wang, 2018), esta proteína PD-1 es utilizada por las células cancerosas para mantener bajo control la respuesta inmune del huésped (Khan, Mahmood, Rahman, Zafar, Habibullah, Khan & Ahmad A., 2018), en las células T han sido aprobados para el tratamiento del cáncer de vejiga con invasión muscular, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer renal metastásico y cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásicas. Estos ensayos clínicos de fase I comenzaron en 2016. Sin embargo, los efectos secundarios graves debidos al síndrome de liberación de citocinas, la neurotoxicidad o la toxicidad fuera del tumor en el objetivo son obstáculos importantes para el tratamiento eficaz de los pacientes. La Administración de Drogas y Alimentos de los E.U.A. (FDA; U.S. Food & Drug Administration) aprobó dos productos de células CAR-T para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda y el linfoma no Hodgkin en el año 2018 (Zhang, Quan, Wang, 2018).

Por otro lado, un grupo de investigación en China dirigido por Lu You en la Universidad de Sichuan ha realizado ensayos clínicos utilizando CRISPR/Cas9 en un paciente que padece cáncer de pulmón. En este ensayo clínico, se extrajeron las células inmunitarias del paciente y se desactivó el gen de muerte programada (PD-1), que codifica la proteína PD-1. Este es el primer informe en el que utilizan CRISPR/Cas9 en ensayos clínicos en pacientes humanos (Khan, Mahmood, Rahman, Zafar, Habibullah, Khan & Ahmad A., 2018).

3.9.3 Edición de la línea germinal y cambios hereditarios

La edición genética de la línea germinal (gametos, cigotos y embriones) puede resultar en la propagación de la modificación genética en cada célula del individuo editado. Dado que las células reproductoras también se ven afectadas, los cambios genéticos introducidos se transmitirían a la descendencia del individuo editado. Esta aplicación de terapia génica tiene el potencial de erradicar enfermedades genéticas hereditarias como la anemia de células falciformes (SCD; Sickle Cell Disease) (Memi et al., 2018).

La SCD es un grupo de trastornos genéticos hereditarios causados por una mutación del gen de la hemoglobina (HBB), se caracteriza por una única sustitución en el cromosoma 11 en el que el ácido glutámico es reemplazado por valina en el sexto codón del gen de la β -globina, que resulta en la formación de glóbulos rojos anormales en forma de hoz. Esta única sustitución conduce a múltiples efectos posteriores y complicaciones clínicas devastadoras que incluyen anemia crónica, inflamación crónica, vasooclusión recurrente, dolor agudo y crónico, accidente cerebrovascular, falla multiorgánica y mortalidad temprana (Demirci, Leonard, Haro-Mora, Uchida & Tisdale, 2019).

El aumento de la rigidez de los glóbulos rojos falciformes impide el flujo sanguíneo a través de pequeños capilares, lo que provoca el bloqueo de los vasos sanguíneos (es decir, vasooclusión) y un suministro de oxígeno deficiente a los órganos vitales (Brunello, 2018). Las células se vuelven frágiles y están sujetas a una fácil destrucción (hemólisis), lo que conduce a una anemia crónica. La anemia de células falciformes afecta a todos los sistemas orgánicos principales, causa una morbilidad significativa y acorta la esperanza de vida de los pacientes afectados en aproximadamente 30 años (Benenson & Porterv, 2018).

A pesar de que se informó en la literatura médica hace más de un siglo, en 1910, y luego se reconoció como la primera "enfermedad molecular", en 1949, el estado actual del diagnóstico, la evaluación y el tratamiento de la anemia de células falciformes está muy lejos de ser el adecuado (Ware, 2017).

A diferencia de otros trastornos moleculares identificados más recientemente que se han beneficiado de una mayor financiación federal, solo hay dos medicamentos aprobados por la FDA para disminuir la gravedad de la SCD, la hidroxiurea (aprobada para adultos en 1998; niños en 2017) y L-glutamina (aprobada en 2018).

Entre 1979 y 2005, la mortalidad infantil de los niños con SCD disminuyó un 3% por año; sin embargo, se observó un aumento del 1% anual durante el mismo período para los adultos. Dado que más del 94% de los niños con SCD en países con abundantes recursos sobreviven ahora hasta los 18 años, y se espera que la tasa de natalidad de bebés con trastornos graves de la hemoglobina supere los 400.000 para el año 2050, el manejo de la enfermedad debe cambiar a un modelo que aborde las necesidades de la enfermedad aguda y crónica y, al mismo tiempo, busque opciones curativas.

Dada la perspectiva de una corrección genotípica y, por lo tanto, fenotípica en un trastorno monogénico como la SCD, se ha realizado un esfuerzo significativo para encontrar áreas cromosómicas/genes críticos que contribuyan a la fisiopatología de la enfermedad. Una vez introducidos en las células diana, los DSB dirigidos por CRISPR/Cas9 dan como resultado la activación de los mecanismos de reparación del DNA. Esta maquinaria daría lugar a algunas INDELS, que idealmente da como resultado la pérdida de función para un gen determinado, o repararía la ruptura del DNA utilizando hebras de homología si se activa HDR. De esta manera, la tecnología CRISPR/Cas9 puede apuntar a la corrección de la mutación SCD (Demirci, Leonard, Haro-Mora, Uchida & Tisdale, 2019).

Las preocupaciones sociales, éticas y religiosas han mantenido estrictamente regulada la investigación sobre la edición genética de la línea germinal humana, mientras que las aplicaciones clínicas están actualmente prohibidas en más de 50 países. Sin embargo, teniendo en cuenta el ritmo al que evolucionan las tecnologías de edición de genomas, el mundo científico ha solicitado que se coloque una moratoria global sobre las aplicaciones clínicas de dichas tecnologías, hasta que se cree un marco regulatorio integral para proporcionar una supervisión estricta y evaluaciones de riesgos / beneficios (Memi, 2018). No obstante, a finales de

noviembre de 2018 se dio a conocer una noticia en la cual se declaraba que un par de gemelas, Lulu y Nana, nacidas unas semanas antes habían sido sometidas a ingeniería genética (cirugía genética, según el promotor) mediante la aplicación de la técnica CRISPR/Cas9, cuando se encontraban en etapa embrionaria con el supuesto de protegerlas en contra del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que portaba su padre (Santillán, Grether, Medina, Chan, Tapia, Brena, Canales, Linares, Mendoza, Muñoz & Schiavon, 2020).

El VIH es un lentivirus que tiene un periodo de incubación prolongado. Existen dos tipos de VIH, llamados VIH-1 y VIH-2. El primero corresponde al virus descubierto originalmente, es más virulento que el VIH-2 y es el causante de la mayoría de las infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 tiene una tasa menor de transmisión y se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental.

En ausencia de tratamiento antirretroviral, la evolución de la infección por VIH es la siguiente: en la fase de infección aguda por VIH ocurre replicación del virus con incremento en la carga viral y un descenso abrupto de la cuenta de linfocitos T CD4+; que constituyen una parte esencial del sistema inmunológico en los seres humanos.

Como respuesta a la infección, se desencadena una respuesta que es capaz de mantener la infección en una fase asintomática prolongada, que normalmente dura varios años y que culmina en la presencia de un incremento en la viremia con una consecuente disminución en el conteo de linfocitos T CD4+, que confiere inmunosupresión. Cuando el conteo de linfocitos T CD4+ desciende por debajo de 200 cel/mm³, o aparecen enfermedades definatorias u oportunistas, se define que la persona presenta enfermedad avanzada por VIH (Secretaría de Salud (SS), 2020).

El impacto del VIH en la población humana es catastrófico y la incidencia de infecciones por VIH revela la necesidad de esfuerzos multisectoriales para combatir y reducir el número de nuevas infecciones, incrementar el acceso a los servicios de salud y garantizar el acceso a la terapia antirretroviral para la población en general. (Junqueira & Almeida, 2016).

El VIH puede transmitirse a través de relaciones sexuales sin protección con personas que viven con VIH (PVV), a través de compartir agujas y jeringas contaminadas, en quienes reciben transfusiones de sangre o hemoderivados igualmente contaminados y de la madre al feto durante el embarazo, el parto y la lactancia (SS, 2020). La probabilidad de transmisión vertical del VIH de madre a hijo se ha reducido en gran medida mediante el tratamiento antirretroviral junto con una buena atención prenatal. Las parejas serodiscordantes en las que el hombre es VIH-1 positivo y la mujer es VIH-1 negativo, que desean tener hijos, pueden correr el riesgo de transmisión sexual del VIH para lograr un embarazo si no tienen acceso a métodos reproductivos más seguros (Zafer, Horvath, Mmeje, van der Poel, Semprini, Rutherford & Brown, 2016).

3.9.3.1 Lulu & Nana

El 25 de noviembre de 2018 el Dr. He Jiankui anunció en YouTube que “Dos niñas chinas llamadas Lulu y Nana llegaron al mundo llorando tan sanas como cualquier otro bebé” (Núñez, Ruíz & Ruíz, 2018). El Dr. He Jiankui de la Universidad de Ciencia y Tecnología del Sur en Shenzhen, China, utilizó CRISPR/Cas9 para modificar los embriones. Afirmó que tenía el objetivo de proteger a las dos niñas gemelas de la transmisión del VIH de su padre infectado y el estigma (Al-Balas, Dajani & Al-Delaimy, 2020), porque, aún cuando el VIH es una infección que millones de personas a nivel mundial padecen, tan solo en 2017, había 36,9 millones de PVV en todo el mundo (Bbosa, Kaleebu & Ssemwanga, 2019), todavía persisten muchos estigmas, por ejemplo, algunos adultos piensan que el VIH se puede transmitir a través de un contacto casual como besarse o compartir una bebida. Padres infectados por VIH informaron haber experimentado evitación, aislamiento e insultos verbales de miembros de la familia y amigos debido a sus temores relacionados con la transmisión. Como solución a esta problemática He Jiankui mutó un gen asociado con la resistencia al VIH (Cowgill, Bogart, Corona, Ryan & Schuster, 2008).

Días después de anunciar su experimento en YouTube, el Dr. He Jiankui reveló los detalles sobre su trabajo en la Segunda Cumbre Internacional sobre la Edición del

Genoma Humano en Hong Kong, provocando una gran controversia en la comunidad científica y médica (Ye, Zhang, Liang & Tang, 2020). Utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 afirmó lograr deshabilitar el gen CCR5 que se relaciona con la infección por el VIH (Raposo, 2019). El objetivo era imitar el efecto de la mutación CCR5-Δ32, que se ha demostrado que protege a los individuos de ascendencia europea de la infección por VIH. Si bien las mutaciones no eran idénticas a CCR5-Δ32, el propósito del Dr. He Jiankui, era conferir inmunidad de por vida contra el VIH.

Sin embargo, fue muy criticado por esta acción, ya que muchos expertos la consideraron imprudente y poco ética, debido a las razones que se exponen a continuación (Gene Editing may have Increased Mortality for Chinese Twins, 2019). Varias notas demuestran que se trataba de un experimento y no de una intervención terapéutica (incluso He Jiankui lo llamó un "ensayo clínico"). Las bebés no tenían riesgo de nacer con VIH, dado que se había utilizado el lavado de esperma para que solo se utilizara material genético no infectado (Raposo, 2019). El lavado de esperma es una técnica en la que se aísla a los espermatozoides del líquido seminal, lo que permite que las fracciones de esperma VIH negativas se utilicen para inseminación intrauterina (Safier, Grossman, Sauer & Douglas, 2017). En general la técnica consiste en que la muestra de semen se homogeneiza con diferentes reactivos y se somete a 4 ciclos de centrifugación de entre 10 y 20 minutos a 1600 rpm (De Almeida, Catafesta, Ferreira, Takata, Lotufo & Parente, 2020). Las intervenciones fueron diferentes para cada gemela. En un caso, se modificaron las dos copias del gen CCR5, mientras que en el otro solo se modificó una copia. Esto significaba que una de las gemelas aún podía infectarse, aunque la evolución de la enfermedad probablemente sería más lenta. Además, en el experimento de las gemelas se desconoce si la edición genética se logró en todas las células del embrión o solo en cierto número de ellas (mosaicismo) y si el efecto de CRISPR/Cas9 en dichas células se dio solamente en la posición del gen CCR5 o si hubo otros sitios del DNA sometidos al mismo efecto (efecto off-target o "fuera de blanco", que solo puede determinarse mediante una secuenciación del genoma completo de las bebés, cosa que no se realizó) (Santillán, Grether, Medina, Chan,

Tapia, Brena, Canales, Linares, Mendoza, Muñoz & Schiavon, 2020). También se planteó la cuestión del consentimiento informado de los padres con respecto a la experimentación humana, que sigue un régimen mucho más estricto que el consentimiento para los procedimientos terapéuticos.

Finalmente, el investigador He presenta serios conflictos de interés que no declaró, al ser accionista de siete compañías de alta tecnología en genética y representante legal en seis más, posiblemente involucradas en el experimento, lo que explica el uso de medios sociales cibernéticos (YouTube) en un formato sensacionalista y engañoso en lugar de comunicaciones cortas en congresos y reuniones científicas o la publicación en revistas científicas, previa revisión y aprobación (Santillán, Grether, Medina, Chan, Tapia, Brena, Canales, Linares, Mendoza, Muñoz & Schiavon, 2020).

En resumen, el propósito del equipo científico aparentemente era monitorear la evolución de ambos bebés y las diferencias en cómo reaccionaban a sus diferentes modificaciones genéticas, no existía un propósito curativo, ni siquiera la intención de prevenir un riesgo acuciante (Raposo, 2019).

3.9.3.2 CCR5 como blanco genético

Para seleccionar el gen diana perfecto y un sitio diana eficiente, necesitamos comprender el funcionamiento de ese gen, y que el sgRNA, idealmente, no tenga efectos fuera de blanco. Esto requiere una importante acumulación de conocimientos, que hasta ahora falta.

El gen CCR5 se identificó por primera vez en 1977, pero no se convirtió en un tema de gran interés público hasta 2009 (Xu, 2020), cuando Hutter et al, informó por primera vez, que un trasplante de médula ósea, que utilizaba células madre derivadas de un donante con mutación del gen CCR5 $\Delta 32$ homocigoto, seguía siendo VIH positivo pero libre de virus (por debajo de los límites de detección) después de suspender la terapia antirretroviral. Desde esta observación, la mutación del gen CCR5 se ha convertido en un objetivo importante en la prevención y el tratamiento de la infección por VIH (Xie, Zhan, Ge & Tang, 2019).

Estos estudios mostraron que la mutación CCR5- Δ 32 causa la delección de 32 pares de bases en CCR5, lo que conduce a una expresión no funcional de este gen (Xu, 2020). Los individuos que son naturalmente homocigotos para la mutación Δ 32, que anula la expresión de CCR5, son generalmente sanos y no presentan ninguna desventaja aparente (Xie, Zhan, Ge & Tang, 2019).

He Jiankui seleccionó el gen CCR5 como gen diana, con el propósito declarado de prevenir la infección por VIH. Sin embargo, ¿es este el objetivo perfecto para la prevención del VIH? (Ma, Zhang & Qin, 2018). Este gen codifica un miembro de la familia de receptores de quimiocinas beta, que se predice que es una proteína transmembranal de siete dominios similar a los receptores acoplados a la proteína G. Esta proteína se expresa en las células derivadas de la médula ósea, incluidas las células T y los macrófagos. También se encuentra en el apéndice, el duodeno, la vesícula biliar, el pulmón, los nódulos linfáticos, el intestino delgado, el bazo, estómago, vejiga, entre otros órganos (CCR5 C – C motif chemokine receptor 5 [*Homo sapiens* (Human)], 2020). En el sistema nervioso central, CCR5 se expresa en neuronas, astrocitos y microglía y funciona como supresor de la plasticidad cortical, el aprendizaje y la memoria hipocampal (Ma, Zhang & Qin, 2018), por lo que se ha especulado que el Dr. He Jiankui podría haber hecho algún tipo de mejora humana al crear dos seres humanos especialmente inteligentes, con mejor memoria y mayor coeficiente intelectual (Raposo, 2019), lo que abre otro tema de debate “La mejora humana”.

Si bien se conoce la relación entre CCR5 y VIH, aún se ignoran otras funciones de ese gen, así como las consecuencias, positivas o negativas, de su ausencia, además, es importante recordar que las mutaciones hechas en Lulu y Nana, no son idénticas a CCR5- Δ 32. Hasta la fecha, varios estudios indican que las mutaciones CCR5- Δ 32 proporcionan una resistencia significativa a la viruela, además de mejorar ciertas formas de memoria, pero también hacen que las personas sean más vulnerables a la influenza y al virus del Nilo Occidental (Xie, Zhan, Ge & Tang, 2019).

3.9.3.3 Respuesta regulatoria al experimento de He Jiankui

En respuesta a los hechos mencionados, algunos expertos pidieron la reconstrucción de la gobernanza ética china, mientras que algunos académicos pidieron un fortalecimiento de la legislación para regular la ingeniería genética humana en China. Por su parte la Academia China de Ciencias Médicas declaró: “Nos oponemos a cualquier operación clínica de edición del genoma de embriones humanos con fines reproductivos en violación de leyes, reglamentos y normas éticas en ausencia de una evaluación científica completa”. La Comisión Nacional de Salud de China respondió: “Este comportamiento ilegal será verificado y sancionado”. La alteración genética de óvulos, espermatozoides y embriones humanos está prohibida para propósitos de línea germinal. Las directrices pertinentes ya existen en China, por lo cual, el trabajo de Jiankui He violó esas pautas (Ma, Zhang & Qin, 2018).

La consecuencia inmediata, del experimento con las gemelas es que He Jiankui estuvo viviendo bajo vigilancia en un departamento en la ciudad de Shenzhen (su paradero se mantuvo secreto durante varios días) y quedó demostrado que hace falta un consenso mundial acerca del futuro de estas técnicas de manipulación genética en humanos, lo que ha llevado a la **OMS (Organización Mundial** de la Salud) a establecer un panel de expertos que analicen los usos potenciales de la edición genética en humanos y formular lineamientos para el empleo de esta tecnología (Núñez, Ruíz & Ruíz, 2018).

La legislatura china tomó medidas rápidas contra las fallas regulatorias que habían sido expuestas por el evento de bebés editados genéticamente. En junio de 2019, se publicó el Reglamento sobre la gestión de los recursos genéticos humanos de la República Popular China. Este documento estipula que se deben seguir los principios éticos y realizar revisiones éticas de acuerdo con las regulaciones estatales pertinentes. Los derechos de privacidad de los proveedores, el consentimiento informado y otros derechos e intereses legítimos también están involucrados. La información proporcionada debe ser extensa, total, verdadera y precisa, y no debe ser oculta, confusa o engañosa.

En comparación con la Ley de Avance de la Ciencia y la Tecnología, que carece de una disposición de responsabilidad legal con respecto a la ingeniería genética humana que viole la ética o ponga en peligro la salud pública, en el nuevo Reglamento se detalla el tema de la responsabilidad. El departamento administrativo de ciencia y tecnología del gobierno local regulará directamente las actividades relevantes. Se confiscarán las ganancias ilegales y se impondrán multas importantes, mientras que las unidades que violen la ley tendrán prohibido ejercer durante varios años, y tanto las unidades como las personas responsables serán sancionadas. Para fortalecer aún más la regulación y supervisión de la investigación en ciencias de la vida y las actividades médicas, incluida la edición de genes, el gobierno chino acelerará la legislación sobre investigación en biotecnología y gestión de aplicaciones clínicas de nuevas tecnologías biomédicas este año.

El Artículo 6 del Reglamento sobre la Gestión de la Seguridad de la Investigación y el Desarrollo Biotecnológico (Borrador para Comentarios) estipula que: el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología deberá formular una lista de actividades de investigación y desarrollo biotecnológico prohibidas. La lista debe revisarse y publicarse de manera oportuna para permitir una evaluación dinámica. El artículo 34 estipula que se debería prohibir a cualquier institución, organización o individuo financiar actividades de investigación y desarrollo de biotecnología de alto riesgo sin autorización. Se pretende que el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología detenga estas actividades si hay alguna infracción y confisque ingresos ilegales, pudiendo imponer multas de hasta 10 millones de RMB (aprox. 32 millones de MNX).

Estas prácticas proporcionarán lecciones para otros países. Sin embargo, cómo proteger a las víctimas en un evento de bebés editados genéticamente, mientras se castiga a quienes violan las leyes y regulaciones, sigue siendo un tema de discusión y debate (Cao & Jia, 2020).

3.9.4 Uso de la edición del genoma para "mejora"

El uso de la edición genética para la mejora humana, se refiere al uso de estas tecnologías para provocar cambios celulares en situaciones donde no existe

enfermedad y las capacidades funcionales de la persona son normales, por ejemplo, incremento de la masa muscular para tener más fuerza, incremento de las capacidades de cognición, modificaciones estéticas, etc. El uso de estas tecnologías fuera del contexto del tratamiento de enfermedades o discapacidades se considera impropio en la actualidad, en tanto no se tenga más información sobre los riesgos y efectos secundarios potenciales y no se pueda evaluar el impacto sobre los principios de autonomía, beneficencia/no-maleficencia y justicia (Santillán, Grether, Medina, Chan, Tapia, Brena, Canales, Linares, Mendoza, Muñoz & Schiavon, 2020).

4.0 Ventajas y retos para la aplicación clínica del sistema CRISPR/Cas9

La edición del genoma con la técnica CRISPR/Cas9 se ha aplicado a la investigación y el tratamiento de una gran variedad de padecimientos, como el cáncer, diversas enfermedades monogénicas, del sistema nervioso central y al VIH. El sistema CRISPR/Cas9 como caja de herramientas de edición genética brinda la posibilidad de introducir mutaciones en el genoma en forma de INDELS o sustituciones de bases en las secuencias diana (Safari, Hatam, Behbahani, Rezaei, Barekati, Petramfar & Khademi, 2020) y es la técnica más usada en el campo debido a sus numerosas ventajas, no obstante, también existen diversas limitaciones que dificultan su aplicación clínica. En seguida se describen las principales ventajas y limitaciones que implica el uso de CRISPR/Cas9.

4.1 Ventajas del sistema CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 es más aplicable en comparación con otras herramientas de edición de genes ya que es una herramienta rentable y flexible (Karimian, Azizian, Parsian, Rafieian, Shafieid, Kheyrollah, Yousefi, Majidinia, Yousefi, Majidinia & Yousefi, 2018). CRISPR/Cas9 proporciona un sistema de edición de genes de bajo costo, muy eficiente y fácil de usar; no requiere un diseño complejo de proteínas como es el caso de MN, ZFN y TALEN. A diferencia de TALENS, CRISPR emplea proteínas pequeñas que se pueden entregar fácilmente y, a diferencia de las ZFN, no requiere pares de proteínas para apuntar a un locus específico. Otra ventaja significativa de la tecnología CRISPR/Cas9 es su capacidad para editar simultáneamente varios

genes, con el uso de múltiples sgRNA, lo que abre nuevas posibilidades en el estudio de trastornos poligénicos complejos (Memmi et al., 2018).

4.2 Retos para la aplicación clínica del sistema CRISPR/Cas9

A pesar de la eficiencia superior, la facilidad de uso y el bajo costo de la tecnología CRISPR/Cas9 en comparación con otras nucleasas programables, existen limitaciones (Memmi et al., 2018). Los desafíos para llevar a cabo de manera exitosa la edición del genoma, se pueden resumir en tres áreas: seguridad, eficacia y entrega. Deben minimizarse los eventos adversos producidos por variantes no intencionales y su eficiencia y entrega deben ser lo suficientemente altas como para lograr un resultado clínicamente significativo (Broeders, Herrero, Ernst, van der Ploeg & Pijnappel, 2020). Dicho lo anterior en los párrafos siguientes se presentan los principales desafíos a vencer para que la aplicación de CRISPR/Cas9 en la clínica sea una realidad.

4.2.1 Sistemas de entrega

La entrega segura y eficaz de editores de base a tejidos o células diana en el cuerpo humano es uno de los factores cruciales y desafiantes para el éxito terapéutico de CRISPR/Cas9 (Kantor, McClements & MacLaren, 2020). La modalidad de entrega de las herramientas influye en gran medida en su seguridad y eficacia terapéutica (Uddin, Rudin & Sen, 2020). El método de entrega que se utilizará dependerá del formato de entrega del material de edición genética. Hasta ahora, el sistema CRISPR/Cas9 se ha administrado con éxito en forma de complejos de RNP, pDNA y mRNA/sgRNA, tanto *in vivo* como *ex vivo* (Broeders et al., 2020). Una vez que se selecciona el método de entrega, CRISPR/Cas9 puede administrarse *in vivo* con la entrega de los componentes CRISPR directamente en el paciente o *ex vivo* donde las células se modifican genéticamente fuera del paciente y para posteriormente suministrarse al paciente.

4.2.1.1 Entrega *in vivo*

En muchos estudios clínicos y preclínicos, los AAVV se utilizan comúnmente como vehículos de administración *in vivo*. Los diferentes serotipos de AAVV proporcionan

una mayor eficiencia de administración para tipos específicos de células, lo que permite la orientación a tejidos/órganos. La entrega *in vivo* de maquinaria de edición de genes utilizando AAVV se ha utilizado con éxito en múltiples modelos animales de enfermedades tal como la infección por el VIH, distrofias musculares, diabetes, neoplasias renales, y otros.

Debido a su alta eficiencia, la administración viral a través de AAVV ofrece resultados de precisión prometedores para la medicina de edición de genoma. Sin embargo, los AAVV provocan respuestas inmunes que pueden limitar el potencial terapéutico de las herramientas de ingeniería del genoma. Si la herramienta de edición de genes debe administrarse repetidamente a lo largo del tiempo, esto es especialmente relevante, ya que los pacientes desarrollarán anticuerpos contra el virus AAVV después de la primera administración, lo que excluye cualquier tratamiento posterior con AAVV como vehículo de administración. Además, una proporción significativa de la población tiene anticuerpos preexistentes contra el virus AAVV, por lo que no es elegible para el tratamiento basado en AAVV. Sin embargo, algunas de estas limitaciones pueden superarse mediante terapias inmunosupresoras combinadas.

En los últimos años, se han desarrollado diferentes tipos de nanomateriales con resultados alentadores. A diferencia de los AAVV, las nanopartículas a base de lípidos pueden transferir plásmidos o proteínas Cas9 sin riesgo de integración genómica; algunos de ellos han recibido la aprobación de la FDA para uso terapéutico. En ratones, las nanopartículas de lípidos se utilizan actualmente para administrar componentes Cas9 localmente al cerebro o al oído interno y sistémicamente al hígado. No obstante, para la entrega de Cas9 y una plantilla de donante para HDR, ambos componentes deben encapsularse en nanopartículas lipídicas distintas, lo que podría afectar su eficiencia de edición *in vivo*. Las nanopartículas de oro desarrolladas recientemente se han utilizado con éxito en modelos de roedores para administrar simultáneamente RNP y plantillas de donantes para tratar la DMD (Broeders et al., 2020).

4.2.1.2 Entrega *ex vivo*

Dependiendo del tipo de célula utilizada para la edición *ex vivo*, la maquinaria de edición de genes puede administrarse mediante electroporación, microinyección, métodos químicos como péptidos y nanopartículas que penetran en las células y a través de vectores virales como AAVV o LV. La eficacia con la que se pueden diseñar *ex vivo* varios tipos de células inmunitarias se ha investigado en múltiples modelos preclínicos, lo que ha estimulado enormemente la investigación en varios campos, en particular la hematología y la terapéutica del cáncer (Broeders et al., 2020).

Las ventajas de la administración *ex vivo* incluyen una mayor seguridad, ya que los pacientes no están expuestos a la herramienta de edición de genes, y un control de calidad más estricto de las células editadas. Mas, los desafíos a este método incluyen la supervivencia y la retención de la función *in vivo* de las células fuera del paciente después de la manipulación genética y el cultivo extensivo *in vitro*. Estas condiciones limitan este método a ciertos tipos de células que pueden sobrevivir y expandirse en cultivo, como las células madre y progenitoras hematopoyéticas y las células T (Uddin et al., 2020).

4.2.2 Efectos no deseados dentro y fuera de blanco

Una de las principales preocupaciones de la implementación de CRISPR/Cas9 para la terapia génica es la frecuencia relativamente alta de efectos fuera de blanco (OTE; off-target effects), que se han observado con una frecuencia $\geq 50\%$ (Uddin et al., 2020). Estos efectos pueden incluir pequeñas inserciones y deleciones no deseadas, variantes puntuales, reordenamientos cromosómicos aberrantes y grandes deleciones en células editadas; ocurren en o alrededor "del blanco", así como en ubicaciones más distantes, "fuera del blanco" (Broeders et al., 2020).

Una estrategia que minimiza los OTE utiliza Cas9 nickase (Cas9n), una variante que induce rupturas de DNA monocatenarias (SSB; single strand break), en combinación con un par de sgRNA dirigidos a ambas hebras del DNA en la ubicación prevista para producir el DSB.

Aunque la vía de reparación del genoma por HDR puede facilitar una edición deseada, su baja frecuencia en comparación con NHEJ, hace que su utilidad para la edición precisa de genes en intervenciones clínicas sea muy limitante. La mejora de la eficiencia de HDR se ha logrado mediante la supresión de la vía NHEJ a través de la LIG4 y DNA-PKcs. Otras estrategias que mejoran la eficiencia de HDR incluyen el uso de una plantilla de oligodesoxinucleótido monocatenario (ssODN; single-stranded oligodeoxynucleotide), que contiene brazos de homología para facilitar la recombinación y la secuencia de edición deseada. Se ha demostrado que las plantillas de ssODN diseñadas racionalmente con complementariedad de longitud optimizada aumentan las tasas de HDR hasta un 60% en células humanas para la sustitución de un solo nucleótido. Además, la etapa del ciclo celular juega un papel clave en la determinación de la vía de reparación del daño del DNA que puede tomar una célula. Los eventos de HDR generalmente están restringidos a las fases tardías S y G2 del ciclo celular, dada la disponibilidad de la cromátida hermana para servir como plantilla en estas etapas, mientras que NHEJ predomina en las fases G1, S y G2 (Uddin et al., 2020).

4.2.3 Monitoreo de efectos no deseados dentro y fuera del blanco

Las mutaciones fuera del blanco son más difíciles de detectar que las variantes en el objetivo, ya que pueden estar presentes en cualquier parte del genoma. Aunque la secuenciación del genoma completo ofrece una evaluación imparcial de alto rendimiento para detectar OTE no deseados, es costosa. Cuando se aplica a clones de células que se han editado *ex vivo*, la secuenciación del genoma completo proporciona una opción valiosa. Sin embargo, cuando se aplica a poblaciones celulares sin expansión clonal, la secuenciación del genoma completo es menos eficiente, ya que puede fallar en la detección de eventos poco abundantes que eventualmente podrían conducir a la transformación oncogénica (Broeders et al., 2020).

4.2.4 Influencia de p53

Cas9 ha mostrado una mayor eficiencia de edición en células con un gen p53 alterado, y se demostró que la inhibición transitoria de p53 aumenta la eficiencia de

edición en células madre pluripotentes humanas, células epiteliales pigmentarias de la retina y, más recientemente en HSPC (Broeders et al., 2020).

Desde su descubrimiento hace 40 años, al p53 se le conoce como "el guardián principal del genoma" (Ho, Xiong, Lane & Lane, 2019). p53 tiene varias funciones que incluyen el control del ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se han observado mutaciones o deleciones de p53 en casi la mitad de los cánceres humanos, lo que indica su posible papel en la patogénesis de varios tipos de cáncer (Azer, 2018), por lo que la inhibición transitoria de p53 también puede dejar a las células más vulnerables a mutagénesis fuera del objetivo (Broeders et al., 2020). Lo que representa un problema de seguridad importante para las aplicaciones clínicas de CRISPR/Cas9 inductora de DSB.

Otras variaciones de Cas9, como la endonucleasa inactiva catalíticamente Cas9 en la que los dominios de nucleasa están desactivados, pueden proporcionar utilidad terapéutica al tiempo que reducen los riesgos por la inducción de DSB (Uddin et al., 2020). Dos cambios de un solo aminoácido convierten la nucleasa Cas9 en una Cas9 catalíticamente inactiva o "muerta" (dCas9; dead Cas9), que se asocia con su secuencia diana de DNA a través del emparejamiento de bases simple de una guía corta de RNA a la que se une (O'Geen, Bates, Carter, Nisson, Halmai, Fink, Rhie, Farnham & Segal, 2019).

dCas9 puede alterar temporalmente la expresión de genes específicos sin introducir DSB, mediante la interferencia o la activación del gen. El objetivo del sistema CRISPR de interferencia (CRISPRi; CRISPR interference) se basa en evitar la unión de la RNAPolimerasa al promotor o actuar como un terminador de la transcripción bloqueando el avance de la RNAPolimerasa. De esta manera, se consigue impedir la transcripción de los genes de interés, y por consiguiente impedir su expresión. Otra forma de controlar la expresión de los genes se basa en la activación CRISPR (CRISPRa; CRISPR activation). El funcionamiento de CRISPRa tiene la misma base que CRISPRi, es decir, utiliza la proteína dCas9, pero con la diferencia de que el complejo sgRNA/dCas9 va unido a un activador transcripcional para aumentar la expresión de los genes objetivo (Pérez, 2019).

También se pueden considerar otras variantes como Cas9n, que induce SSB en lugar de DSB. Las modificaciones adicionales de estas variantes Cas9 han llevado al desarrollo de editores básicos y editores principales, una innovación clave para la aplicación terapéutica segura de la tecnología CRISPR (Uddin et al., 2020).

4.2.5 Control espaciotemporal de la actividad de CRISPR/Cas9

Una vez introducidas en una célula, las RNP son incontrolables, capaces de formar DSB en lugares donde el gRNA se una dentro del genoma, lo que ha llevado a los investigadores a buscar métodos novedosos para ejercer un control espaciotemporal sobre la actividad CRISPR/Cas9. Carlson et al. desarrollaron el sistema CRISPRoff, que consiste en un sgRNA con dos grupos o-nitrobencilo fotoescindibles en las posiciones 57 y 74 (donde la posición 1 es el extremo 5' del RNA), estos nuevos sgRNA se conocen como sgRNA de doble ruptura (DBsgRNA; dual-breakage sgRNA) y se fragmenta en respuesta a la luz, evitando la formación de nuevos DSB. Los sgRNA de CRISPRoff se sintetizan químicamente e incorporan residuos fotoescindibles que contienen grupos o-nitrobencilo en las posiciones ya definidas. Este grupo o-nitrobencilo sufre una escisión en respuesta a la luz ultravioleta, provocando que los sgRNA se fragmenten.

Para demostrar la eficacia del sistema CRISPRoff, Carlson et al. probaron los DBsgRNA *versus* gRNA. Resultando que los DBsgRNA no expuestos a la luz formaron DSB a una frecuencia similar a los sgRNA estándar y generaron un perfil de INDELS similar. Mientras que los DBsgRNA mostraron una disminución en la edición cuando se iluminaron cuatro horas después de la transfección en comparación con las células que permanecieron en la oscuridad. Es importante destacar que la iluminación no disminuyó la frecuencia de edición de los sgRNA estándar, lo que sugiere que la incorporación de enlazadores fotoescindibles fue totalmente responsable de la disminución.

En conjunto, CRISPRoff permite un control estricto de la edición desde una perspectiva espacial y temporal, ampliando la caja de herramientas de la edición de genes. Sin embargo, por el momento, CRISPRoff no puede ser probado en

aplicaciones *in vivo*, debido a la baja penetración de la luz ultravioleta a través de los tejidos (Carlson, Kelso, Kadina, Joshi, Rossi, Walker, Stoner & Maures, 2020).

4.2.6 Inmunogenicidad y seguridad

Los sistemas CRISPR/Cas son complejos de proteínas derivados de bacterias y arqueas, algunas de las cuales, como *S. aureus* (SaCas9) o *S. pyogenes* (SpCas9) son agentes infecciosos comunes en la población humana. Un estudio reciente de Charlesworth et al. sobre la presencia de anticuerpos preexistentes, informó que el 78% de los sujetos involucrados en el estudio presentaban anticuerpos contra SaCas9 y el 58% presentaban anticuerpos contra SpCas9. Además, el análisis de muestras de sangre indicó que el 78% tenía células T anti-SaCas9 y el 67% tenía células T anti-SpCas9 (Charlesworth et al., 2019). La detección de células T anti-Cas9 podría representar un serio desafío para la ingeniería genómica, ya que la exposición a una respuesta de células T citotóxicas podría eliminar las células modificadas.

Para minimizar los efectos de posibles reacciones inmunes, los investigadores pueden seguir varias estrategias. En un enfoque, la actividad de edición de genes se puede controlar espaciotemporalmente, lo que tiene un gran potencial para uso clínico. Los componentes de edición de genes pueden, por ejemplo, dirigirse a órganos con privilegios inmunitarios como el ojo o a órganos tolerogénicos como el hígado. Las estrategias que implican la modulación inmunitaria podrían prevenir los efectos secundarios derivados de las proteínas Cas bacterianas o de los antígenos derivados de los vehículos de administración. Una evaluación adecuada de los enfoques candidatos y los posibles efectos perjudiciales será esencial para el uso seguro de la ingeniería del genoma de precisión en la clínica (Broeders et al., 2020).

4.2.7 Requisito del Motivo Adyacente del Protoespaciador (PAM)

Una limitación adicional de la tecnología es el requisito de un PAM cerca del sitio objetivo. Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) es uno de los Cas9 más utilizados con un sitio de reconocimiento de PAM canónico relativamente corto: 5'NGG3', donde N es cualquier nucleótido. Sin embargo, SpCas9 es relativamente

grande y difícil de empaquetar en vectores AAVV, el vehículo de administración más común para la terapia génica. *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) es un ortólogo más pequeño que puede empaquetarse más fácilmente en vectores AAVV, pero tiene una secuencia PAM más larga: 5'NNGRRT3' o 5'NNGRR(N)3', donde R es cualquier purina (adenina (A) o guanina (G)), lo que reduce aún más la ventana de sitios de orientación terapéutica. Se han creado variantes de SaCas9 diseñadas, como KKH SaCas9, que reconoce un 5'NNNRRT3' PAM, ampliando los sitios de dirección humanos de 2 a 4 veces. Sin embargo, los OTE se observan con frecuencias similares a las de SaCas9 de tipo salvaje y deben tenerse en cuenta al diseñar cualquier aplicación terapéutica. Otras variantes de SpCas9 también se han diseñado para ampliar la ventana del gen objetivo, incluida SpCas9-NG, que reconoce el PAM mínimo NG, y xCas9, que reconoce una amplia gama de PAM, incluidos NG, GAA y GAT. Una comparación entre ambas variantes reveló que mientras SpCas9-NG tenía un reconocimiento de PAM más amplio, xCas9 tenía una frecuencia de OTE más bajas en células humanas (Uddin et al., 2020).

5.0 CRISPR/Cas9 vs. otras tecnologías de edición genética

Hasta el momento se han abordado conceptos básicos para entender la edición genética y se han descrito de forma general las tecnologías más empleadas en el campo como MN, ZFN y TALEN, profundizando en CRISPR/Cas9, por lo que es necesario proporcionar una evaluación comparativa entre estos métodos de edición. En la Tabla 3 se presenta un breve análisis comparativo entre MN, ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9.

Table 3. Análisis comparativo de MN, ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9

	MN	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Mecanismo de reconocimiento	Proteína – DNA	Proteína – DNA	Proteína – DNA	RNA – DNA
Nucleasa	I-SceI	FokI	FokI	Cas9
Restricciones de reconocimiento	Las secuencias nuevas son difíciles de reconocer.	Requiere secuencias ricas en guanina (G).	Se requiere una timina (T) al principio y una adenina (A) al final.	Requiere la presencia de un PAM.
Eficiencia	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Alta
Diseño	Requiere un complejo diseño de proteínas.	Requiere un complejo diseño de proteínas.	Requiere un complejo diseño de proteínas.	Relativamente sencillo.
Limitaciones críticas	Versatilidad de reconocimiento limitada.	Costosa y requiere mucho tiempo de construcción.	Requiere mucho tiempo para su construcción.	Efectos fuera de objetivo.
Potencial citotóxico	Bajo	Bajo a moderado	Bajo	Bajo
Edición simultánea	Baja	Baja	Baja	Alta
Costo	Bajo	Bajo	Alto	Bajo

6.0 Marco regulatorio internacional y nacional de la modificación genética humana

La precisión y eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 para la edición de genes, ha revolucionado la generación de alteraciones genéticas y epigenéticas definidas en células en cultivo y en organismos, desde microbios hasta plantas y animales (Rossant, 2018). Las aplicaciones en curso incluyen, la creación de modelos animales para el estudio de enfermedades como la DMD, la edición de células somáticas para el tratamiento del cáncer, etc. Todas estas aplicaciones vienen con sus propios problemas regulatorios y éticos que requieren un debate informado. Sin embargo, la atención mundial se ha centrado en los problemas que rodean la aplicación clínica de la **HGGE** (Edición genética de la línea germinal humana).

Aunque la seguridad y eficacia de la HGGE aún no se ha demostrado, la idea de poder erradicar diversas enfermedades asociadas a la herencia y rediseñar el genoma humano utilizando tecnologías de edición del genoma, como CRISPR/Cas9, se está volviendo una realidad (Townsend, 2020), por lo que es esencial poder contar con un marco de referencia ampliamente reconocido para gobernar y regular eficazmente tales prácticas, de modo que, es algo tranquilizador que los avances biotecnológicos en la edición del genoma ya hayan llevado a las instituciones científicas a formular recomendaciones (Marinelli & Del Río, 2020).

En los párrafos siguientes se presenta la información más relevante del estatus actual del marco normativo a nivel internacional, posteriormente se muestra lo correspondiente al estado regulatorio nacional mexicano y finalmente se ofrecen las recomendaciones que, de acuerdo con el informe de la Comisión Internacional sobre el Uso Clínico de la Edición del Genoma de la Línea Germinal Humana, deben ser tomadas en cuenta al momento de construir una regulación robusta, nacional e internacional, para la aplicación clínica de la HGGE.

6.1 Regulación Internacional sobre la edición genética de la línea germinal humana (HGGE)

El estatus legal y regulatorio de la HGGE varía considerablemente entre los diferentes países. Actualmente, la HGGE está prohibida por ley en docenas de

naciones, incluidas muchas de Europa y los E.U.A. (International Commission on the Clinical Use of Human Germline Genome Editing, 2020). Algunos países han establecido políticas prohibitivas, un ejemplo es Israel, que en 2016 aprobó la Enmienda de la Ley No. 3 de Prohibición de Intervención Genética (Clonación Humana y Cambio Genético en Células Reproductivas), 5776/2016. E.U.A. estableció la Ley de Asignaciones Consolidadas 2016 Sec. 749, que prohíbe a la FDA gastar presupuesto federal en la revisión o aprobación de solicitudes sobre el uso en investigación de productos biológicos en los que un embrión humano se crea o modifica intencionalmente para una modificación genética hereditaria (Ishii, 2017).

La Comisión Internacional sobre el Uso Clínico de la Edición del Genoma de la Línea Germinal Humana fue convocada por la Academia Nacional de Medicina de los EUA, La Academia Nacional de Ciencias de los E.U.A. y The Royal Society del Reino Unido. La Comisión tiene la tarea de desarrollar un marco para que los científicos, los médicos y las autoridades reguladoras lo consideren al evaluar las posibles aplicaciones clínicas de la edición hereditaria del genoma humano. Este marco podría utilizarse en el desarrollo de una ruta potencial desde la investigación hasta el uso clínico, si un país llega a la conclusión de que las aplicaciones de HHGE son aceptables. El objetivo de la Comisión es preparar el camino para un acuerdo internacional sobre criterios y estándares específicos que deberían cumplirse antes de que la HGGE pueda considerarse permisible.

La OMS también estableció un comité global multidisciplinario de expertos para examinar los desafíos científicos, éticos, sociales y legales asociados con la edición del genoma humano, tanto somático como hereditario. El Comité Asesor de Expertos en Edición del Genoma Humano asesorará al director general de la OMS sobre los mecanismos adecuados de supervisión y gobernanza, tanto a nivel nacional como mundial (International Commission on the Clinical Use of Human Germline Genome Editing, 2020).

La Autoridad Europea de Medicamentos (EMA; European Medicines Agency), que está a cargo de supervisar el acceso de los medicamentos al mercado, incluidos los medicamentos de terapia avanzada, ha establecido directrices científicas y

reglamentarias sobre la edición de genes como un tema de su agenda futura. La Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG; European Society of Human Genetics) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE; European Society of Human Reproduction and Embryology) ya han hecho una contribución en ese sentido, destinada a difundir información, proporcionar orientación y estimular debates científicos y públicos. En particular, se deben abordar cinco aspectos distintos: las implicaciones técnicas y las complejidades de la edición de genes, sus diversas aplicaciones (cuyos límites aún no se conocen del todo), la experiencia clínica relevante con respecto al manejo del riesgo reproductivo, las regulaciones legales específicas que deben ser promulgadas, y las cuestiones y preocupaciones éticas y sociales vinculadas con la edición de genes de la línea germinal. Dada la naturaleza esencial de tales elementos, tanto ESHG como ESHRE convocaron a sus comités (respectivamente, el Comité de Política Pública y Profesional de ESHG y el Comité de Ética de ESHRE) para la elaboración de un documento de posición y recomendaciones (Marinelli & Del Río, 2020).

Un grupo de expertos de E.U.A. promovió una moratoria temporal para evitar la edición de células germinales para aplicación clínica. Dos de las preocupaciones centrales de la moratoria, están relacionados con la capacidad de la técnica para hacer el cambio genético en el segmento de DNA adecuado, o lograr los resultados esperados sin crear nuevos problemas. Algunos grupos de especialistas en genética humana de Europa, Canadá, E.U.A., África, Gran Bretaña y Australia apoyan esta moratoria y mencionan que llevar a cabo la edición genética de células que culminen en un embarazo humano sería inapropiado. Sin embargo, no encuentran razón para prohibir esta práctica, si es realizada fuera del organismo vivo, con fines de investigación (INCyTU, 2018).

Aun cuando la HHGE con fines de reproducción está prohibida en gran parte del mundo, el uso de embriones supernumerarios (aquellos embriones generados durante una fecundación *in vitro* y que no fueron utilizados) o células derivadas de estos con fines de investigación está permitida en varios países, entre ellos, Reino Unido, Francia, Suiza, Suecia, China, Bulgaria, República Checa, Finlandia, Grecia

y Portugal. En 2015 investigadores chinos editaron genéticamente cigotos humanos anormales (que no eran viables para su gestación), para realizar investigación básica. Posteriormente fueron eliminados. En el Reino Unido se permite el uso de embriones supernumerarios y la creación de embriones con fines de investigación (INCyTU, 2018).

6.2 Regulación nacional mexicana sobre la edición genética de la línea germinal humana (HGGE)

La atención regulatoria de las tecnologías genéticas en México se ha concentrado en gran parte sobre los organismos genéticamente modificados (OGMs), con un enfoque particular sobre la bioseguridad y la agricultura (Chan & Medina, 2018). La Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) es un órgano del Poder Ejecutivo Federal que se encarga, al más alto nivel, de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso de los OGMs (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), 2015), se formó en el año 2000 para coordinar la política de seguridad de la biotecnología y supervisar todos los aspectos de la producción, importación, exportación y uso de OGMs. Estas funciones se formalizaron en 2005 por la aprobación y publicación de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, de ahora en adelante Ley de Bioseguridad, que fue creada con el fin de gestionar los riesgos asociados con los transgénicos y promover el desarrollo ético de esta área de la biotecnología (Chan & Medina, 2018).

En la Ley de Bioseguridad no se contempla la responsabilidad de regular la modificación genética humana, al establecer en las fracciones XX y XXI del artículo 3 lo siguiente:

ARTÍCULO 3.- Para los efectos de esta Ley, se entiende por:

XX. Organismo: Cualquier entidad biológica viva capaz de reproducirse o de transferir o replicar material genético, quedando comprendidos en este concepto los organismos estériles, los microorganismos, los virus y los viroides, sean o no

celulares. Los seres humanos no deben ser considerados organismos para los efectos de esta Ley.

XXI. Organismo genéticamente modificado: Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna que se define en esta Ley, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta Ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma.

Y de manera explícita, en la fracción V del artículo 6 de la misma ley se declara que:

ARTÍCULO 6.- Quedan excluidos del ámbito de aplicación de esta Ley:

V. El genoma humano, el cultivo de células troncales de seres humanos, la modificación de células germinales humanas y la bioseguridad de hospitales, cuya regulación corresponde a la Ley General de Salud (LGS), y a los Tratados Internacionales en los que los Estados Unidos Mexicanos sean parte;

En el Decreto por el que se adiciona la fracción IX Bis al artículo 3o.; se adiciona un Título Quinto Bis y su Capítulo Único denominado “El Genoma Humano”; y el artículo 421 Ter de la Ley General de Salud, publicado el día 16 de noviembre del 2011 en la página del Diario Oficial de la Federación (DOF), se abordan principalmente los usos de la información genética, como el consentimiento de la persona para someterse a estudios genéticos, el derecho a la protección de la confidencialidad de sus datos derivados de estudios genéticos y las sanciones que aplican a quien infrinja las disposiciones contenidas en el Capítulo Único del Título Quinto Bis de esta Ley, pero en ningún momento se trata de forma explícita la modificación genética humana.

El Código Penal para la Ciudad de México es el único instrumento jurídico que cuenta con un capítulo destinado específicamente a la manipulación genética en el que se señalan sanciones en relación con el tema de manipulación genética, en su artículo 154, se declara que:

ARTÍCULO 154. Se impondrán de dos a seis años de prisión, inhabilitación, así como suspensión por igual término para desempeñar cargo, empleo o comisión públicos, profesión u oficio, a los que:

I. Con finalidad distinta a la eliminación o disminución de enfermedades graves o taras, manipulen genes humanos de manera que se altere el genotipo;

II. Fecunden óvulos humanos con cualquier fin distinto al de la procreación humana; y

III. Creen seres humanos por clonación o realicen procedimientos de ingeniería genética con fines ilícitos.

En cuanto a la regulación de la investigación con uso de embriones humanos, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su Capítulo IV de la Investigación en Mujeres en Edad Fértil, Embarazadas, durante el Trabajo de Parto, Puerperio, Lactancia y Recién Nacidos; de la utilización de Embriones, Obitos y Fetos y de la Fertilización Asistida, en sus artículos 43 y 55, establece lo siguiente:

ARTICULO 43.- Para realizar investigaciones en mujeres embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio y lactancia; en nacimientos vivo o muertos; de utilización de embriones, óbitos o fetos; y para la fertilización asistida, se requiere obtener la carta de consentimiento informado de la mujer y de su cónyuge o concubinario de acuerdo a lo estipulado en los artículos 21 y 22 de este Reglamento, previa información de los riesgos posibles para el embrión, feto o recién nacido en su caso.

El consentimiento del cónyuge o concubinario sólo podrá dispensarse en caso de incapacidad o imposibilidad fehaciente o manifiesta para proporcionarlo; porque el concubinario no se haga cargo de la mujer, o, bien, cuando exista riesgo inminente para la salud o la vida de la mujer, embrión, feto o recién nacido.

ARTICULO 55.- Las investigaciones con embriones, óbitos, fetos, nacimientos muertos, materia fetal macerada, células, tejidos y órganos extraídos de éstos, serán realizadas de acuerdo a lo dispuesto en el Título Décimo Cuarto de la Ley y en este Reglamento.

En el artículo 149 del código penal para la Ciudad de México se establece que:

ARTÍCULO 149. A quien disponga de óvulos o espermatozoides para fines distintos a los autorizados por sus donantes, se le impondrán de tres a seis años de prisión y de cincuenta a quinientos días multa.

En virtud de la escasa especificidad del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, de que en el Título Décimo Cuarto de la LGS, en lo referente a embriones, únicamente se da a conocer la definición del concepto de embrión, el destino final de estos y la prohibición del uso, para cualquier finalidad, de tejidos embrionarios o fetales producto de abortos inducidos, y de que a nivel estatal, el Código Penal de la Ciudad de México prohíbe el uso de gametos donados para un fin distinto al establecido en el consentimiento del donante, lo que parecería permitir el uso de gametos destinados a la investigación científica si se concede la autorización, pero está prohibida la fertilización de los huevos para cualquier propósito que no sea la reproducción. Esto se opone a la creación de embriones específicamente para la investigación, que puede ser importante en el trabajo de edición de genes, pero no el uso de embriones sobrantes. Se prohíbe la manipulación de los genes humanos “con el fin de alterar el genotipo” para cualquier propósito que no sea la eliminación o la mejora de la enfermedad, pero no está claro lo que se quiere decir con esto. Se prohíbe cualquier procedimiento de ingeniería genética para “fines ilícitos”, pero no describe qué tipo de extremos serían ilícitos, es claro que estas disposiciones podrían ser malinterpretadas, puesto que se enmarcan en términos muy amplios (Chan & Medina, 2018).

6.3 Recomendaciones para la construcción de un robusto sistema regulatorio nacional

El vacío jurídico en relación con la investigación biomédica y la tecnología presenta un problema con varias aristas. Se genera incertidumbre para los científicos que trabajan en las universidades e instituciones de investigación nacional de salud en cuanto a si determinadas actividades de investigación están permitidas y en qué medida. También puede estimular el turismo científico y médico con el fin de evadir leyes más restrictivas en otras jurisdicciones, y así ofertar el acceso a intervenciones

que no están disponibles bajo regulaciones más estrictas (Chan & Medina, 2018), por ejemplo, en México se llevó a cabo un procedimiento, en el cual no se usó edición genética, pero dio lugar a un embrión cuyo material genético mitocondrial fue modificado en algún momento de su generación, durante un proceso conocido como reemplazo mitocondrial (INCyTU, 2018).

El 27 de septiembre de 2016 se dio a conocer el nacimiento del primer producto intervenido con una técnica de reemplazo mitocondrial (Palacios & Medina, 2016). Las mitocondrias son orgánulos celulares presentes en todas las células del organismo, excepto en los eritrocitos, y son integradores cruciales de varias vías metabólicas celulares, incluida la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea, la gluconeogénesis y la cetogénesis. Las mitocondrias también tienen un papel relevante en otros procesos celulares importantes, incluida la termogénesis, el metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de los lípidos, la biosíntesis del grupo hemo y los grupos de hierro-azufre, la homeostasis del calcio y la apoptosis (Gorman, Chinnery, DiMauro, Hirano, Koga, McFarland, Suomalainen, Thorburn, Zeviani & Turnbull, 2016).

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos genéticos que se caracterizan por mitocondrias disfuncionales. Las mutaciones en el mtDNA o en genes del nDNA relacionados con las mitocondrias pueden resultar en disfunción mitocondrial. Esto conduce a una amplia gama de alteraciones celulares, como la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, la homeostasis anormal del calcio, la apoptosis desregulada y la generación de energía insuficiente en varios órganos, especialmente aquellos con alta demanda energética. La enfermedad generalmente afecta a múltiples órganos en diferentes ubicaciones y gravedad; sin embargo, existen algunas formas que solo afectan a un único órgano (por ejemplo, los ojos en la neuropatía óptica hereditaria de Leber) (Molnar & Kovacs, 2018). En esos casos, es posible realizar un reemplazo mitocondrial para evitar transmitir la enfermedad a la siguiente generación. En México, este proceso se realizó en cinco óvulos, que fueron posteriormente fertilizados y de ellos se obtuvieron cuatro

embriones. Uno de ellos se implantó en la madre y dio lugar a un bebé que nació sano (INCyTU, 2018).

De especial interés fue el hecho de que el procedimiento de reemplazo mitocondrial ocurrió en México. Uno de los científicos detrás de esta intervención fue citado diciendo que él y su equipo fueron a México para realizar el procedimiento porque, en México, no hay reglas (Palacios & Medina, 2016).

Por la ocurrencia de eventos como el anterior descrito, es evidente que México necesita la creación de un marco regulatorio robusto en materia de biotecnología en el que se establezcan los criterios específicos que deben cumplirse para que cualquier aplicación de HGGE proceda en el territorio, con el fin de prevenir usos no permitidos y sancionar cualquier conducta indebida.

La Comisión Internacional sobre el Uso Clínico de la Edición del Genoma de la Línea Germinal Humana, a través de su Informe sobre la Edición Hereditaria del Genoma Humano, recomienda que los problemas que deberán abordarse a través de los sistemas nacionales, dondequiera que se proponga realizar HGGE, incluyen:

- dar una dirección clara e inequívoca a los investigadores y médicos sobre la legalidad de HGGE;
- garantizar que los investigadores y los médicos se adhieran a las normas de la ciencia responsable, incluidos los principios de derechos humanos, bioética y las directrices, estándares y políticas aplicables;
- brindar transparencia sobre cualquier solicitud de HGGE que se esté considerando;
- brindar transparencia a la comunidad mundial sobre cualquier intención de permitir un uso clínico aprobado de HGGE;
- crear procesos y mecanismos claros para la revisión, aprobación y supervisión de cualquier uso clínico inicial de HGGE en humanos;
- establecer mecanismos para circunscribir el uso clínico de HGGE, incluso para limitar y controlar cualquier uso más allá del alcance de una indicación permitida; y

- Ser receptivo al consenso científico internacional sobre el estado actual de las tecnologías HGGE, especialmente en áreas de seguridad y usos propuestos, con el objetivo de coordinar protocolos y compartir datos en la mayor medida posible.

6.4 Recomendaciones para la construcción de un sistema de coordinación y colaboración global

Si bien los países tienen autoridad para tomar decisiones con respecto a la investigación o el uso clínico de la HGGE, es fundamental contar también con cooperación científica y ética internacional para permitir la armonización de los sistemas regulatorios más allá del territorio nacional (International Commission on the Clinical Use of Human Germline Genome Editing, 2020). La armonización es un proceso mediante el cual se identifican aspectos de convergencia legislativa, reglamentaria o de políticas y se hacen compatibles las diferencias. Al hacerlo, se buscan estándares comunes o mínimos y la equivalencia entre jurisdicciones en la naturaleza y adopción de la legislación, los reglamentos y las políticas nacionales. La armonización busca lograr una aproximación o coordinación de diferentes ordenamientos jurídicos (Townsend, 2020). Por lo tanto, una vía traslacional para la HGGE requiere sistemas de gobernanza que se extiendan más allá de los países individuales para permitir una discusión transparente sobre cualquier uso clínico aprobado de HGGE y los resultados obtenidos. Esto es porque:

- Existe un interés colectivo de la humanidad en el uso de una tecnología novedosa que puede resultar en cambios hereditarios en el genoma humano;
- Las comunidades clínicas y de investigación que desarrollan estas tecnologías son globales y las tecnologías tienen implicaciones más allá de las fronteras nacionales;
- Los ciudadanos de diferentes países que deseen acceder a HGGE viajarán a los países donde esté disponible; y
- Cualquier uso inicial de HGGE involucraría a un pequeño número de personas, y sería importante recopilar y comparar información a través de las

fronteras nacionales para comprender mejor los primeros datos de seguridad y eficacia en humanos y para promover enfoques comunes.

Con respecto tanto a la investigación biomédica como a la práctica clínica, en general, los países han enmarcado poderes de concesión de licencias y deberes profesionales complementarios dentro de su legislación, sus reglamentos y sus sistemas de salud, o mediante la creación de órganos de supervisión estatutarios o, en menor medida, a través de la legislación. en sectores o tecnologías específicas. El enfoque varía de un país a otro o se define en alianzas regionales. Cualquier mecanismo propuesto para la gobernanza internacional de HGGE deberá prever al menos tres funciones:

1. Un panel asesor científico internacional para proporcionar evaluación técnica continua y evaluación de los avances en la ciencia y las tecnologías de las que depende la HGGE y para hacer recomendaciones sobre su idoneidad y preparación para usos clínicos particulares.
2. Un organismo internacional para evaluar y hacer recomendaciones sobre cómo cruzar los principales umbrales asociados con el uso clínico de HGGE, basado en la consideración de una amplia gama de perspectivas sociales y científicas. En el contexto actual, un umbral representa un límite que distingue un uso actualmente aceptado de otro que no lo está. Antes de cruzar cualquier umbral, será importante que la comunidad global evalúe no solo el progreso en la investigación científica, sino también las preocupaciones éticas y sociales adicionales que podrían plantear las circunstancias de usos particulares, así como los resultados, éxitos o preocupaciones que se hayan observado en cualquier uso humano de HGGE realizado hasta ahora.
3. Un mecanismo internacional mediante el cual las personas u organizaciones de un país pueden plantear inquietudes técnicas o éticas derivadas del trabajo de HGGE realizado en su propio país o en otro país.

7.0 Consideraciones éticas acerca de la edición genética humana

Las consideraciones éticas y las preocupaciones sobre la alteración del DNA humano se remontan al menos a 48 años atrás, cuando, al comienzo de la revolución de la biología molecular, Bernard Davis planteó la perspectiva de "modificar el patrón de genes de un ser humano" (Coller, 2019). Sin embargo, primero hay que preguntarse ¿en qué situaciones podemos pensar en esta modificación? (Marfany, 2019).

Sabiendo de ante mano que, la HGGE tiene el potencial de: prevenir la transmisión de variantes genéticas que se sabe inequívocamente que están asociadas con una enfermedad o afección grave, disminuir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o afección grave y mejorar a un ser humano (Coller, 2019), la evaluación ética de la HGGE se divide, en términos generales, en dos categorías: las 7.1 consideraciones éticas derivadas de su posible fracaso y las 7.2 consideraciones éticas derivadas de su éxito, (Ormond, Mortlock, Scholes, Bombard, Brody, Faucett, Garrison, Hercher, Isasi, Middleton, Musunuru, Shriner, Virani & Young, 2017). A continuación, se presentan las principales preocupaciones éticas que envuelven a la modificación genética de la HGGE.

7.1 Consideraciones éticas derivadas del posible fracaso de la HGGE

Exponer a las personas a consecuencias para la salud de las intervenciones con efectos potencialmente dañinos es motivo de preocupación cuando dichos riesgos no superan sus beneficios potenciales. En la HGGE, aún no se ha determinado la magnitud de los riesgos potenciales de consecuencias deseadas o no deseadas (Marfany, 2019). Por lo que considerar las preocupaciones éticas referentes al fracaso de la HGGE es igual de importante que considerar aquellas derivadas de su éxito.

7.1.1 Riesgos desconocidos e impredecibles de crear nuevas variantes del genoma

Las aplicaciones de edición génica con el potencial de crear secuencias de DNA novedosas, no identificadas previamente en humanos, representan un riesgo imprevisto y no deseado. Es probable que estas secuencias se introduzcan cuando

se utilice la edición mediante CRISPR/Cas9 para inactivar un gen, como se realiza habitualmente en los animales, ya que el procedimiento se basa en la reparación de la rotura de la doble hebra mediante la NHEJ (Coller, 2019), donde los extremos rotos del DNA se reparan o se ligan sin el uso de una plantilla homóloga (Rein et al., 2018), lo que introduce secuencias impredecibles que pueden alterar la transcripción y/o traducción normal del gen (Coller, 2019). El riesgo más acentuado son las mutaciones fuera del objetivo. Tales mutaciones involuntarias pueden conducir al desarrollo de cáncer u otras enfermedades (Nordgren, 2019).

7.1.2 Potencial de daño que se extenderá a múltiples generaciones

Si una edición genética hereditaria daña, existe la posibilidad de que ese daño se extienda más allá del individuo inicial hasta su progenie. Esto complicaría la planificación familiar y podría llevar a la decisión de no tener hijos o someterse a reproducción asistida en combinación con el diagnóstico genético preimplantacional, con sus riesgos y costos asociados, para evitar la transmisión de la edición dañina del DNA. En los casos en los que el diagnóstico genético previo a la implantación no pudiera evitar la transmisión de la edición dañina, el individuo debería considerar someterse a otro procedimiento de edición para corregir la edición dañina (Coller, 2019).

7.2 Consideraciones éticas derivadas del éxito de la HGGE

Más allá de los riesgos potenciales y aún desconocidos de la HGGE, hay varias formas en las que el impacto de estas nuevas tecnologías podría ser éticamente problemático si funcionan según lo previsto (Marfany, 2019).

7.2.1 Desafiando el papel de Dios en la creación

La tradición judeocristiana occidental dominante reconoce la legitimidad y la importancia de las intervenciones médicas para proteger la salud humana basándose en la creencia de que los humanos están hechos a imagen y semejanza de Dios y, por lo tanto, los humanos tienen la obligación de proteger la creación de este. Del mismo modo, las religiones de esta tradición tienden a enfatizar la importancia de tener hijos, en algunos casos incluso convirtiéndolo en una

obligación. Por lo tanto, con la excepción de aquellas religiones que se oponen a la edición de embriones o la fertilización in vitro, es poco probable que se opongan a la HGGE realizada para prevenir la transmisión de una enfermedad o discapacidad grave, especialmente cuando la discapacidad resulta en infertilidad.

Las preocupaciones religiosas podrían ser mucho más intensas si se usa la HGGE para mejorar el desempeño humano o incluso reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad al realizar cambios novedosos en la secuencia del DNA. Una encuesta llevada a cabo en 2016 por el Pew Research Center en adultos de los EUA, encontró que el 46% de las personas sentían que la edición del genoma para dar a los bebés un riesgo de enfermedad mucho menor "cruza una línea, por lo que es una intromisión con la naturaleza" la mayoría de las personas encuestadas que expresaron esta opinión eran religiosos (Coller, 2019).

7.2.2 Falta de consentimiento informado

El consentimiento informado es el acto más importante de la relación médico-paciente debido a que se plasma el momento en el que se formaliza el vínculo del cual derivan derechos y obligaciones para las partes (Vázquez, Ramírez, Vázquez, Cota & Gutiérrez, 2017). En investigación clínica, el consentimiento informado se entiende como la autorización voluntaria de un sujeto de investigación, con una comprensión completa de los riesgos involucrados en la práctica de procedimientos de investigación (Carreño, 2016). Este principio no puede cumplirse plenamente cuando el participante de la investigación es un niño o cuando la investigación involucra a un feto, por lo que el consentimiento lo tienen que dar ambos padres (Coller, 2019).

7.2.3 Impacto negativo en personas con discapacidades relacionadas con variantes genéticas

Históricamente, las personas con trastornos genéticos que producen fenotipos identificables como "anormales", han sido estigmatizadas, intimidadas, discriminadas e incluso agredidas físicamente (Coller, 2019).

Los métodos de prueba cada vez más sofisticados, especialmente las pruebas prenatales no invasivas, permiten la detección de rasgos genéticos en el feto que pueden causar discapacidades. Un resultado positivo, a menudo, influye en la decisión de las mujeres embarazadas de interrumpir el embarazo. Aunado a lo anterior, el énfasis que la edición del genoma humano pone en “corregir” mutaciones, ha provocado que los críticos afirmen que estos métodos envían un mensaje negativo a las personas con discapacidad (Rubeis & Steger, 2019).

Por otro lado, sabemos que las mutaciones son una parte esencial de la evolución, cuyos pros y contras no se pueden juzgar instantáneamente. Las mutaciones, que hoy parecen dañinas pueden ser la preparación de la naturaleza para el mañana (Krishan, Kanchan, Singh, Baryah & Puri, 2018).

7.2.4 Mejora de la raza humana

En 1998 James Watson argumentó que “si pudiéramos hacer mejores seres humanos sabiendo cómo agregar genes, ¿por qué no deberíamos hacerlo? ¿Qué tiene de malo? ¿Quién nos está diciendo que no lo hagamos? (Hofmann, 2018). Si los avances en el desarrollo de CRISPR/Cas9, nos dieran una herramienta exacta y precisa, ¿por qué no deberíamos implementar la HGGE con el fin de mejorar la raza humana?

La aplicación más problemática desde el punto de vista ético para la edición del genoma es la mejora de la raza humana, al aumentar rasgos como la inteligencia, la fuerza, la resistencia, el atractivo físico, entre otros (Eissenberg, 2019). Un claro ejemplo son los regímenes totalitarios y democráticos que han demostrado su voluntad de imponer el control sobre la reproducción humana con fines políticos (Coller, 2019), a una aplicación con esta intención se le conoce como eugenesia.

La eugenesia se refiere tanto a la selección de rasgos positivos (eugenesia positiva) como a la eliminación de enfermedades o rasgos vistos negativamente (eugenesia negativa). La eugenesia en cualquiera de sus formas es preocupante porque podría usarse para reforzar los prejuicios y las definiciones de normalidad en nuestras sociedades (Ormond et al., 2017). La eugenesia surgió a finales del siglo XIX como

una ciencia que se ocupaba de la mejora de las cualidades hereditarias. De hecho, se consideró la ciencia de vanguardia de la época, ya que se desarrolló y practicó en varios países. Estados Unidos de América iba a la delantera del movimiento eugenésico e inició la esterilización involuntaria a través de leyes. En 1907, Indiana se convirtió en el primer estado en promulgar una ley destinada a la esterilización de "inadaptados sociales". En 1926, 23 estados tenían leyes de esterilización involuntaria motivadas principalmente por ideas eugenésicas. En Alemania, la esterilización patrocinada por el Estado comenzó a principios de la década de 1930, después de que se aprobara la legislación para alentar, pero no exigir, la esterilización de pacientes considerados "no aptos". La esterilización obligatoria de los "no aptos", promovida durante décadas por figuras prominentes de la medicina alemana, se convirtió rápidamente en política oficial poco después de que Hitler asumiera el poder, en 1933.

Los ejemplos contemporáneos de eugenesia positiva ampliamente discutidos entre los bioéticos incluyen la selección del sexo, las pruebas genéticas y la controversia más reciente sobre los "bebés de diseño". Un ejemplo de eugenesia negativa contemporánea es el caso de la esterilización de reclusas en las cárceles de California, realizada sin el permiso legal adecuado para hacerlo o sin los procedimientos adecuados de consentimiento informado. Como resultado, se promulgó una ley que prohíbe el uso de la esterilización como método anticonceptivo para cualquier recluso bajo la supervisión del Departamento de Correcciones y Rehabilitación o en una instalación correccional del condado en el estado de California (Grodin, Miller & Kelly, 2018).

7.2.5 Bebés de diseño

Un "bebé de diseño" es un embrión cuya composición genética ha sido seleccionada o modificada para erradicar un defecto específico o para asegurar que un gen en particular esté presente (Grodin, Miller & Kelly, 2018).

Los padres con frecuencia tienen ciertos deseos con respecto a las características de sus futuros hijos. La HGGE podría permitir a los padres "mejorar" los rasgos visibles de su descendencia. El uso de la HGGE en esta dirección está destinado a

los beneficios percibidos o las preferencias de los padres, más que a los beneficios para su futuro hijo. Los padres que buscan la mejora genética valoran un aspecto social de su hijo más que el niño en sí. Por lo que, se puede esperar que ocurran diversos problemas, como discordias familiares y juicios entre familias y médicos si el niño tiene características que no cumplen con las expectativas de los padres. Aunque el término "mejoramiento genético" tiene problemas conceptuales, su uso para mejorar la apariencia de los niños sería difícil de justificar debido a cuestiones como la mercantilización de los niños, así como a los riesgos irremediables para su salud (Ishii, 2017).

7.2.6 Edición del genoma para la prevención de enfermedades

La prevención de enfermedades mediante la modificación de variantes asociadas con el riesgo ocupa un término medio entre el tratamiento y la mejora y recae en ambas categorías (Coller, 2019). Por ejemplo, el gen PCSK9, desempeña un papel en el metabolismo del colesterol y los ácidos grasos, las mutaciones en este gen se han asociado con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante (PCSK9 proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 [*Homo sapiens* (human)], 2020). Si existen fármacos para inactivar la actividad enzimática del gen PCSK9, sospecho que la mayoría de las personas considerarían la inactivación de un gen PCSK9 en un paciente con antecedentes de varios ataques cardíacos y niveles elevados de colesterol. Realizar la misma modificación genética en el hermano menor del paciente, que aún no ha sufrido un infarto, pero tiene un nivel elevado de colesterol, probablemente se consideraría un acto de prevención. Pero ¿qué hay de realizar la misma intervención en el hijo del paciente para disminuir su riesgo futuro de enfermedad cardiovascular? ¿eso es prevención, mejora o ambas? (Coller, 2019).

7.2.7 Creación de presión social para modificar a los niños para mantener un campo de juego nivelado con niños modificados por otros padres

Parece evidente que, si incluso un pequeño porcentaje de padres decide modificar el DNA de su hijo para reducir el riesgo de que el niño desarrolle enfermedades o mejorar las capacidades funcionales del niño, otros padres se sentirán presionados a modificar el DNA de sus hijos para nivelar el campo de juego en el que competirán.

Esto puede desencadenar una "carrera armamentista" genética de los padres en la que se intentan ediciones cada vez más arriesgadas (Coller, 2019).

7.2.8 Desigualdad social

Dos cuestiones éticas importantes relacionadas con la edición de la línea germinal ocurren a nivel social: la primera, preocupaciones relacionadas con la eugenesia, la segunda, preocupaciones relacionadas con la justicia social y la igualdad de acceso a las tecnologías. El uso clínico de la HGGE es hipotético en este punto, por lo tanto, cualquier discusión sobre el acceso o el precio es especulativa. Dicho esto, es probable que la edición del genoma de la línea germinal humana sea costosa, el acceso probablemente sea limitado geográficamente y puede que no esté cubierto por los sistemas de salud. Por lo tanto, la enfermedad genética, que alguna vez fue un denominador común universal, podría convertirse en un artefacto de clase, ubicación geográfica y cultural. A su vez, la reducción de la incidencia y la menor sensación de riesgo compartido podrían afectar los recursos disponibles para los individuos que enfrentan enfermedades genéticas (Ormond et al., 2017).

8.0 Conclusión

El sistema para edición genética CRISPR/Cas9, que le valió el Premio Nobel de Química 2020 a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, empezó con un descubrimiento casual impulsado por la curiosidad científica, algunos años más tarde y gracias al avance tecnológico, se adoptó rápidamente en cada laboratorio dedicado a las ciencias de la vida, debido a que es una herramienta de bajo costo, fácil de usar, con alta eficiencia y que no requiere un complicado diseño de proteínas.

En un contexto en el que enfermedades como el cáncer encabezan la lista de las principales causas de muerte al año a nivel mundial, y enfermedades ligadas a la herencia como la SCD no cuentan con un modelo de manejo que aborde las necesidades de la enfermedad aguda y crónica, mientras busca opciones curativas, CRISPR/Cas9 representa el camino a la tierra prometida. Sin embargo, para llevar a CRISPR/Cas9 del laboratorio a la clínica falta recorrer un largo camino, en el que

se busque garantizar la eficacia y seguridad del tratamiento, y cada intervención sea sustentada con bases científicas y éticas sólidas, bajo la supervisión de un marco regulatorio robusto, que no deje cabida a actos deshonestos gobernados por la búsqueda de beneficios personales.

Es claro que ni CRISPR/Cas9 ni los sistemas legales a nivel mundial, y menos aún en México, están listos para que la edición genética humana sea una realidad, no obstante, este es el momento en el que la comunidad científica, ética, regulatoria y la población en general se involucren en amplio debate con el fin de construir una vía que asegure el respeto a las garantías individuales sin caer en resoluciones políticas prohibitivas que restrinjan el avance de la tecnología.

El propósito de la presente investigación se centró en describir el potencial de CRISPR/Cas9 como una herramienta de modificación genética aplicable a nivel de investigación básica, tratamiento y prevención de enfermedad y discapacidad mediante la edición de células somáticas, edición de la línea germinal humana, que conlleva cambios hereditarios, y el riesgo del uso de la edición del genoma para “mejora”, gracias a lo cual se logró poner en relieve los principales retos técnicos, los vacíos legales en México y las preocupaciones éticas más notables, a vencer para que la edición genética humana pueda ser trasladada al área clínica, con el fin de beneficiar a pacientes con enfermedades que en la actualidad no cuentan con una cura, sin exponerlos a actividades criminales.

Para finalizar, y de manera personal, la elaboración del presente TMA me ha permitido asimilar la importancia de la colaboración entre la ciencia, la ética y la regulación, pues, es gracias a esta unión que como ciudadanía nos podemos beneficiar del progreso científico, sin poner en riesgo nuestros derechos humanos. Por otro lado, resulta imperativo mencionar la importancia de formar científicos con humanidad, que tengan por objetivo aportar invenciones positivas para las personas y no solo para su bolsillo. También, es fundamental diseñar nuevos métodos de divulgación científica a fin de involucrar a la población en temas de ciencia, pues esta educación es una clave fundamental para evitar la aplicación de tratamientos engañosos.

Queda pendiente a futuras investigaciones dar seguimiento a la mejora del sistema CRISPR/Cas9, así como la elaboración de propuestas legales que ayuden a reforzar el marco regulatorio nacional e internacional, con el propósito de buscar el bien común.

9.0 Referencias

Adli. M. (2018). The CRISPR tool kit for genoma editing and beyond. *Nature Communications*. Vol. 9. 1 – 13. DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2.

Al-Balas. Q, Dajani. R, Al-Delaimy. (2020). The Ethics of Gene Editing from an Islamic Perspective: A Focus on the Recent Gene Editing of the Chinese Twins. *Science and Engineering Ethics*. Vol. 26. 1851 – 1860. DOI: 10.1007/s11948-020-00205-5.

Anzalone. A, Randolph. P, Davis. J, Sousa. A, Koblan. L, Levy. J, Chen. P, Wilson. C, Newby. G, Raguram. A, Liu. D. (2019). Search-and-replace genoma editing without double-strand break sor donor DNA. *Nature*. Vol. 576. 149 – 157. DOI: 10.1038/s41586-019-1411-4.

Azer. S. (2018). MDM2-p53 Interaction in Human Hepatocellular Carcinoma: What Is the Role of the Nutlins and New Therapeutic Options? *Journal of Clinical Medicine*. Vol. 7. 1 – 19. DOI: 10.3390/jcm7040064.

Bbosa. N, Kaleebu. P, Ssemwanga. D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Current Opinion HIV AIDS*. Vol. 14. 153 – 160. DOI: 10.1097/COH.0000000000000534.

Benenson. I, Porter. S. (2018). Sickle Cell Disease. Bone, Joint, Muscle and Motor Complications. *Orthopaedic Nurses*. Vol. 37. 221 – 227. DOI: 10.1097/NOR.0000000000000464.

Beyer, M, E. (2016). Incógnitas de nuestro ADN. *¿Cómo ves?* Vol. 217. 8 – 13.

Broeders. M, Herrero. P, Ernst. M, van der Ploeg. A, Pijnappel. P. (2020). Sharpening the Molecular Scissor: Advances in Gene-Editing Technology. *iScience*. Vol. 23. 1 – 19. DOI: 10.1016/j.isci.2019.100789.

Brooker, R, J. (2018). *Genetics: Analysis & Principles*. Nueva York. Estados Unidos de América. McGraw Hill Education.

Brunello. L, Marshall. L. (2018). Sickle Cell Disease. *Nature Reviews*. 1. DOI: 10.1038/nrdp.2018.10.

Calos. MP. (2017). Genome Edicting Techniques and Their Therapeutic Applications. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 101. 42-51. DOI: 10.1002/cpt.542.

Cao. Y, Jia. F, (2020). Legal response to the gene-edited babies evento. *Medicine Science and Law*. Vol. 0. 1 – 2. DOI: 10.1177/0025802420953672.

Carlson. J, Kelso. R, Kadina. A, Joshi. S, Rossi. N, Walker. J, Stoner. E, Maures. T. (2020). CRISPRpf enables saptio-temporal control of CRISPR editing. *Nature*. Vol. 11. 1 – 7. DOI: 10.1038/s41467-020-18853-3.

Caroll. D. (2017). Genome Editing: Past, Present, and Future. *YAEL JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*. Vol. 90. 653 – 659.

Carreño. J. (2016). Consentimiento Informado en Investigación clínica: un Proceso Dinámico. *Persona y Bioética*. Vol. 20. 232 – 243. DOI: 10.5294/PEBI. 2016.20.2.8.

Carroll. K, Makarewich. C, McAnally. J, Anderson. D, Zentilin. L, Liu. N, Giacca. M, Bassel. R, Olson. E. (2016). A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A*. Vol. 113. 338 – 343. DOI: 10.1073/pnas.1523918113/-/DCSupplemental.

CCR5 C – C motif chemokine receptor 5 [*Homo sapiens* (Human)]. (2020). Ubicación: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1234#gene-expression>.

Chan. S, Medina. M. (2018). Edición genética y desafíos en la regulación inatarnacional: Lecciones desde México. Médina. M, Capdevielle. P. *Bioética laica. Vida, muerte, género, reproducción y familia*. (pp. 61 – 85). Ciudad de México, México. UNAM. Instituto de Investigaciones Jurídicas.

Chandrasekaran. A, Song. M, Kim. K, Ramakrishna. (2018). Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells. *Progress in Molecular Biology and Traslational Science*. Vol. 159. 157 – 173. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2018.05.001.

Código Penal para el Distrito Federal. Gaceta Oficial del Distrito Federal, Ciudad de México, México. 16 de junio de 2002. Última Reforma 29 de julio de 2020.

Coller. B. (2019). Ethics of Human Genome Editing. *Annual Reviews*. Vol. 70. 289 – 305. DOI: 10.1146/annurev-med-112712-094629.

Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM. (2015). Orden Jurídico Nacional e Internacional de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/normatividad/vigente/Orden-juridico/eBookOrdenJuridico20151203.pdf>

Cowgill. B, Bogart. L, Corona. R, Ryan. G, Schuster. M. (2008). Fears about HIV Transmission in Families with an HIV-Infected Parent: A Qualitative Analysis. *Pediatrics*. Vol. 122. e950 – e958. DOI: 10.1542/peds.2008-0390.

Darío. S, (2017). El impacto ético de las nuevas tecnologías de edición genética. *Revista Bioética*. Vol. 25. 3. 454 – 461. DOI: 10.1590/1983-80422017253202.

De Almeida. W, Catafesta. E, Ferreira. I, Takada. S, Lotufo. D, Parente C. (2020). Prevention of HIV transmission with sperm washing within fertile serodiscordant couples undergoing non-stimulated intrauterine insemination. *AIDS Care. Psychological and Socio-medical Aspects of AIDS/HIV*. 1 – 8. DOI: 10.1080/09540121.2020.1739201.

Decreto por el que se adiciona la fracción IX Bis al artículo 3o.; se adiciona un Título Quinto Bis y su Capítulo Único; y el artículo 421 Ter de la Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. 16 de noviembre de 2011.

Demerci. S, Leonard. A, Haro. J, Uchida. N, Tisdale. J. (2019). CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology– Cell Biology and Translational Medicine*. Vol. 1144. 37 – 52. DOI: 10.1007/5584_2018_331.

Eissenberg. J. (2019). The Brave New World of Gene Editing and Molecular Medicine. *Science of Medicine*. Vol. 116. 497 – 502.

Fernández. M. (2016). *Regulación de la Reparación de los cortes de doble cadena en el ADN: Papel de la nedilación de proteínas*. (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Galetto. R, Duchateau. P, Pâques. F. (2009). Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases. *Expert Opinion on Biological Therapy*. Vol. 9. 10. 1289 – 1303. DOI: 10.1517/14712590903213669.

Gao. Q, McNelly. E. (2015). The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. *Comprehensive Physiology*. Vol. 1. 1223 – 1239. DOI: 10.1002/cphy.cl40048.

Gene Editing may have Increased Mortality for Chinese Twins. (2019). *American Journal Mededical Genetics A*. Vol. 179. 1685-1686. DOI: 10.1002/ajmg.a.61319.

Gorman. G, Chinnery. P, DiMauro. S, Hirano. M, Koga. Y, McFarland. R, Suomalainen. A, Thorburn. D, Zeviani. M, Turnbull. D. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature*. Vol. 2. 1 – 22. DOI: 10.1038/nrdp.2016.80.

Grodin. M, Miller. E, Kelly. J. (2018). The Nazi Physicians as Leaders in Eugenics and “Euthanasia”: Lessons for Today. *American Journal of Public Health*. Vol. 108. 53 – 57. DOI: 10.2105/ AJPH.2017.304120.

Gupta. D, Bhattacharjee. O. Mandal. D, Sen. M, Dey. D, Dasgupta. A, Kazi. T, Gupta. R, Sinharoy. S, Acharya. K, Chattopadhyay. D, Ravichandiran. V, Roy. S, Ghosh. D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*. Vol. 232. 116636. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116636.

Hausman. D. (2019). What is cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*. Vol. 62. 778 – 784. DOI: 10.1353/pbm.2019.0046.

Hendel. A, Bak. R, Clark. J, Kennedy. A, Ryan. D, Roy. S, Steinfeld. I, Lunstad. B, Kaiser. R, Wilkens. A, Bacchetta. R, Tsalenko. A, Dellinger. D, Bruhn. L, Porteus. M. (2015). Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genoma editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*. Vol. 33. 985-989.

Ho. T, Xiong. B, Lane. T, Lane.D. (2019). How the Other Half Lives: What p53 Does When It Is Not Being a Transcription Factor. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 21. 1 – 19. DOI: 10.3390/ijms21010013.

Hofmann. B. (2018). The gene-editing of super ego. *Medicine, Health Care and Philosophy*. Vol. 21. 295 – 302. DOI: 10.1007/s11019-018-9836-z.

Hryhorowicz. M, Lipiński. D, Zeyland. J, Słomski. R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. Vol. 65. 233-240. DOI: 10.1007/s00005-016-0427-5.

International Commission on the Clinical Use of Human Germline Genome Editing. (2020). *Consensus Study Report. Heritable Human Genome Editing. Prepublication*. Washington, DC.

Ishii. T. (2017). The ethics of creating genetically modified children using genome editing. *Current Opinion*. Vol. 24. 418 – 423. DOI: 0.1097/MED.0000000000000369.

Ishino. Y, Krupovic. M, Forterre. P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 200. e00580 – 17. DOI: 10.1128/JB.00580-17.

Jiang. F, Doudna. J. (2017). CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*. Vol. 46. 505-529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

Kantor. A, McClements. M, MacLaren. R. (2020). CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 21. 1 – 21. DOI: 10.3390/ijms21176240.

Karimian. A, Azizian. K, Parsian. H, Rafieian. S, Shafield. V, Kheyrollah. M, Yousefi. M, Majidinia. M, Yousefi. M, Majidinia. M, Yousefi. B. (2018). CRISPR/Cas technology as a potent molecular tool for gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 234. 12267 – 12277. DOI: 10.1002/jcp.27972.

KC. M, Clifford. S. (2019). A new era of gene editing for the treatment of human diseases. *Swiss Medical Weekly*. Vol. 149. 1 – 13. DOI: 10.4414/smw.2019.20021.

- Khan S, Mahmood M, Rahman S, Zafar H, Habibullah S, Khan Z, Ahmad A. (2018). CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *Journal of Biomedical Science*. Vol. 25. 1 – 18. DOI: 10.1186/s12929-018-0425-5.
- Krishan. K, Kanchan. T, Singh. B, Baryah. N, Puri. S. (2018). Germline Editing: Editors Cautionary. *La Clínica Terapéutica*. Vol. 169. e58 – e59. DOI: 10.7417/T.2018.2053.
- Kumar. P, Nagarajan. A, Uchil. P. (2019). Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*. Vol. 7. 519 – 525. DOI: 10.1101/pdb.top096271.
- Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación. 18 de marzo de 2005.
- Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. 7 de febrero de 1984. Última reforma: 24 de enero de 2020.
- Li. J, Røise. J, He. M, Das. R, Murthy. N. (2020). Non-viral strategies for delivering genome editing enzymes. *Advances Drug Delivery Reviews*. Vol. 160. 1 – 19. DOI: 10.1016/j.addr.2020.09.004.
- Liu. C, Zhang. L, Liu. H, Cheng. K. (2017). Delivery Strategies of the CRISPR-Cas9 Gene-Editing System for Therapeutic Applications. *Journal of Controlled Release*. Vol. 266. 17 – 26. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012.
- Ma. Y, Zhang. L, Qin. C. (2019). The first genetically gene-edited babies: It's "irresponsible and too early". *Animal Models and Experimental Medicine*. Vol. 2. 1 – 4. DOI: 10.1002/ame2.12052.
- Maeder. L, Gersbach. C. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Oficial Journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*. Vol. 24. 3. 430 – 446. DOI: 10.1038/mt.2016.10.
- Makarova K.S., Koonin E.V. (2015) Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology*. Vol 1311. 45 – 75. DOI:10.1007/978-1-4939-2687-9_4.

Maletich. D, de Matos. S. (2016). HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology*. Vol. 495. 173 – 184. DOI: 10.1016/j.virol.2016.05.003.

Manghwar. H, Lindsey. K, Zhang. X, Jin. S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Cell Press*. Vol. 24. 1102 – 1125. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.006

Marinelli. S, Del Río. A. (2020). Beginning of life ethics at the dawn of a new era of genome editing: are bioethical precepts and fast-evolving biotechnologies irreconcilable? *La Clínica Terapéutica*. Vol. 171. 407 – 411. DOI: 10.7417/CT.2020.2249.

Marfany. G. (2019). Interrogantes y retos actuales de la edición genética. Revista de Bioética y Derecho. *Perspectivas Bioéticas*. Vol. 47. 17 – 31.

McGinn. J, Marraffini. L. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature*. Vol. 17. 7 – 12. DOI: 10.1038/s41579-018-0071-7.

Memi. F, Ntokou. A, Papangeli. I. (2018). CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Seminars in Perinatology*. Vol. 42. 487-500. DOI: 10.1053/j.semperi.2018.09.003.

Molnar. M, Kovacs. G. (2018). Mitochondrial diseases. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 145. 147 – 155. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00010-9

Naidoo. M, Anthony. K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Neurobiology*. Vol. 57. 1748 – 1767. DOI: 10.1007/s12035-019-01845-w.

Nordgren. A. (2019). Designing Preclinical Studies in Germline Gene Editing: Scientific and Ethical Aspects. *Bioethical Inquiry*. Vol. 16. 559 – 579. DOI: 10.1007/s11673-019-09947-9.

Núñez. E, Ruíz. B, Ruíz. J. (2018). Edición genética en humanos. La gran controversia. *¿Cómo ves?* Vol. 246. 8 – 17.

O'Brien. C, Morello. R. (2018). Modeling Rare Bone Diseases in Animals. *Current Osteoporosis Reports*. Vol. 16. 458 – 465. DOI: 10.1007/s11914-018-0452-x.

Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión. (2018). Edición genética en medicina. *Foro Consultivo Científico y Tecnológico*. Vol. 10. 1 – 6.

O'Geen. H, Bates. S, Carter. S, Nisson. K, Halmai. J, Fink. K, Rhie. S, Farnham. P, Segal. D. (2019). Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. *Epigenetics & Chromatin*. Vol. 12. 1 – 20. DOI: 10.1186/s13072-019-0275-8.

Ormond. K, Mortlock. P, Scholes. D, Bombard. Y, Brody. L, Faucett. W, Garrison. N, Hercher. L, Isasi. R, Middleton. A, Musunuru. K, Shriner. D, Virani. A, Young. C. (2017). Human Germline Genome Editing. *The American journal of human genetics*. Vol. 101. 167 – 176. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.06.012.

Palacios. C, Medina. M. (2017). Mitochondrial replacement techniques and México's rule of law: on the legality of the first maternal spindle transfer case. *Journal of Law and the Biosciences*. 50 – 69. DOI: 10.1093/jlb/lsw065.

Pawluk. A, Davidson A, Maxwell K. (2017). Anti-CRISPR: Discovery, mechanism and function. *Nature*. Vol. 16. 12-17. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.120.

PCSK9 proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 [*Homo sapiens* (human)]. (2020). Ubicación: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255738>.

Pérez. A. (2019) *CRISPR más allá de la edición genómica*. (Trabajo fin de grado). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid, España.

Raposo, V. (2019). The First Chinese Edited Babies: A Leap of Faith in Science. *JBRA Assisted Reproduction*. Vol. 23. 193 – 199. DOI: 10.5935/1518-0557.20190042.

Redel. B, Prather. R. (2016). Meganucleases Revolutionize the Production of Genetically Engineered Pigs for Study of Human Diseases. *Toxicologic Pathology*. Vol. 44. 3. 428 – 433. DOI: 10.1177/0192623315613160.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial de la Federación. México. 6 de enero de 1987. Última Reforma: 2 de abril de 2014.

Rein. L, Yang. H, Chao. N. (2018). Applications of Gene Editing Technologies to Cellular Therapies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Vol. 24. 1537 – 1545. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.03.021.

Rossant. J. (2018). Gene editing in human development: ethical concerns and practical applications. *Development*. Vol. 145. 1 – 3. DOI: 10.1242/dev.150888.

Roy P, Saikia B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*. Vol. 53. 441 – 442. DOI: 10.4103/0019-509X.200658).

Rubeis. G, Steger. F. (2018). A burden from birth? Non-invasive prenatal testing and the stigmatization of people with disabilities. *Bioethics*. 1 – 7. DOI: 10.1111/bioe.12518.

Safari. F, Hatam. G, Behbahani. A, Rezaei. V, Barekati. M, Petramfar. P, Khademi. F. (2020). CRISPR System: A High-throughput Toolbox for Research and Treatment of Parkinson's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Vol. 40. 477 – 493. DOI: 10.1007/s10571-019-00761-w.

Safier. L, Grossman. L, Sauer. M, Douglas. N. (2017). Sperm Washing with Insemination and Preexposure Prophylaxis: An Innovative Approach to Treating HIV-Serodiscordant Couples. *American Journal of obstetrics and Gynecology*. 1 – 6. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.02.038.

Santillán. P, Grether. P, Medina. M, Chan. S, Tapia. R, Brena. I, Canales. R, Linares. J, Mendoza. H, Muñoz. L, Schiavon. R. (2020). Reflexiones sobre la ingeniería genética: a propósito del nacimiento de gemelas sometidas a edición génica. *Gaceta Médica de México*. Vol. 156. 53 – 59. DOI: 10.24875/GMM.19005182.

Scully. R, Panday. A, Elango. R, Willis. N. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 20. 11. 698 – 714. DOI: 10.1038/s41580-019-0152-0.

Secretaría de Salud (SS), (2020). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Recuperado de: https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/37_Manual_VIH-SIDA_2020.pdf.

Terapia de transferencia de células T, (2019), lugar de publicación: *Instituto Nacional del Cáncer*, EUA, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/terapia-transferencia-de-celulas-t>.

The Royal Swedish Academy. (2020). The Nobel Prize in Chemistry 2020. Noruega. *The Nobel Prize*. Recuperado de: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>.

Townsend. B. (2020). Human genome editing: how to prevent rogue actors. *BMC Medical Ethics*. Vol. 21. 1 – 10. DOI: 10.1186/s12910-020-00527-w.

Uddin, F. Rudin. C, Sen. T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*. Vol. 10. 1 – 17. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387.

Urrutia, A. (2011). Diez años del genoma humano: promesas rotas y hallazgos inesperados. *¿Cómo ves?* Vol. 146. 10 – 14.

Vázquez. A, Ramírez. E, Vázquez. J, Cota. F, Gutiérrez. F, Gutiérrez. J. (2017). Consentimiento informado. ¿Requisito legal o ético? *Historia, Ética y Filosofía*. Vol. 39. 175 – 182.

Wang. J, Lei. K, Han. F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Science*. Vol. 22. 3855 – 3864. DOI: 10.26355/eurrev_201806_15270.

Ware. R. (2017). Technological Advances in Sickle Cell Disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. Vol. 67. 102 – 103. DOI: 10.1016/j.bcmed.2017.09.011.

Watanabe. D, Saito. Y, Tsuda. M, Ohsawa. R. (2020). Increased awareness and decreased acceptance of genome-editing technology: The impact of the Chinese twin babies. *PLoS ONE*. Vol. 15. 1 – 13. DOI: 10.1371/journal.pone.0238128.

- Wells. D. (2018). Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms*. Vol. 11. 1 – 3. DOI: 10.1242/dmm.035774.
- Wilbie, D., Walther, J., Mastrobattista, E. (2019). Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Accounts of chemical research*. Vol. 52, 1555 – 1564. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00106.
- Xie, Y. Zhan. S, Ge. W, Tang. P. (2019). The potential risks of C-C chemokine receptor 5-edited babies in bone development. *Bone Research*. Vol. 7. 1 – 4. DOI: 10.1038/s41413-019-0044-0.
- Xu. M. CCR5-Δ32 biology, gene editing, and warnings for the future of CRISPR-Cas9 as a Human and Humane gene editing tool. *Cell & Bioscience*. Vol. 10. 1 – 6. DOI: 10.1186/s13578-020-00410-6.
- Xu, X, Wan. T, Xin. H, Li. D, Pan. H, Wu. J, Ping, Y. (2019). Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genoma editing. *The Journal of Gene Medicine*. Vol. 7. 1 – 18. DOI: 10.1002/jgm.3107.
- Ye. Z, Zhang. X, Liang. J, Tang. Y. (2019). The Challenges of Medical Ethics in China: Are Gene-Edited Babies Enough? *Science and Engineering Ethics*. 1 – 3. DOI: 10.1007/s11948-019-00090-7.
- Yin. H, Kauffman. K, Anderson. D. (2017). Delivery technologies for genoma editing. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 16. 387 – 399. DOI: 10.1038/ndr.2016.280.
- Yoshimi. K, Kunihiro. Y, Keneko. T, Nagahora. H, Voigt. B, Mashimo. T. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nature Communications*. Vol. 7. 1 – 10. DOI: 10.1038/ncomms10431.
- Young. C, Mokhonova. E, Quinonez. M, Pyle. A, Spencer. M. (2017). Creation of a Novel Humanized Dystrophic Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Application of a CRISPR/Cas9 Gene Editing Therapy. *Journal Neuromuscular Diseases*. Vol. 4. 139 – 145. DOI:10.3233/JND-170218.

Yumlu. S, Bashir. S, Stumm. J, Kühn. R. (2019). Efficient Gene Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9. *CRISPR Gene Editing. Methods Biology. Vol. 1961.* 137 – 151. DOI: 10.1007/978-1-4939-9170-9_10.

Zafer, M. Horvath. H, Mmeje. O, van der Poel. S, Semprini. A, Rutherford. G, Brown. J. (2015). Effectiveness of semen washing to prevent HIV transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril. Vol. 105.* 645 – 655. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.028.

Zhao. X, Wei. C, Li. J, Xing. P, Li. J, Zheng. S, Chen. X. (2017). Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica. Vol. 49.* 8. 665 – 668. DOI: 10.1093/abbs/gmx055.

Zhang. C, Quan. R, Wang. J. (2018). Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Human Molecular Genetics. Vol. 27.* R79 – R88. DOI: 10.1093/hmg/ddy120.