



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**TÉCNICAS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LA
LÍNEA GERMINAL; DEBATE ÉTICO-LEGAL**

**GERMLINE GENETIC MODIFICATION;
ETHICAL-LEGAL DEBATE**

Autor: Ana Maes Onsurbe

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

1 de julio de 2020



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....pág. 1
2. OBJETIVO E HIPÓTESIS.....pág. 1-2
3. CONTEXTO CIENTÍFICO.....pág. 2-13
4. METODOLOGÍA.....pág. 13-21
5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....pág. 22-25
6. REFERENCIAS.....pág. 26-27



RESÚMENES

Existen principalmente tres tipos de herramientas para editar genéticamente la línea germinal que son ZFNs, TALENs y CRISPR- Cas9. En estos casos la modificación se lleva a cabo en el embrión diploide por lo que el uso de estas técnicas genera controversias éticas. Tanto las ZFNs como las TALENs son enzimas nucleasas con un dominio de escisión y uno de unión al ADN, que operan uniéndose a la hebra de ADN y generando después un corte. Sin embargo CRISPR-Cas9 es un sistema basado en una combinación de secuencias en un clúster que es utilizado por las bacterias como sistema de respuesta inmunitaria frente a la infección de un virus. La edición genética de la línea germinal es una promesa para la ciencia y la sociedad porque se quiere emplear para la cura de enfermedades genéticas. Es por ello que surgen muchas cuestiones éticas alrededor y se tiene que encontrar un marco jurídico que deje constancia del protocolo que hay que seguir en caso de querer editar genéticamente la línea germinal. Aún no están presentes estas herramientas en la medicina terapéutica puesto que su aplicación clínica supone efectos no deseados tanto 'on target' como 'off target' y además, su investigación implica la formación y posterior destrucción de embriones. Se busca minimizar el número de embriones en juego y por ello la sociedad debe conseguir una regulación exhaustiva sobre cómo actuar para lograr una inserción de estas técnicas en la medicina terapéutica.

CRISPR-Cas9, embrión, ético, modificación genética de la línea germinal, TALENs, ZFNs

There are mainly three types of tools to genetically edit the germ line which are ZFNs, TALENs and CRISPR- Cas9. In these cases the modification is carried out in the diploid embryo so the use of these techniques generates ethical controversy. Both ZFNs and TALENs are nuclease enzymes with an excision domain and a DNA binding domain, which operate by binding to the DNA strand and then generating a cut. However, CRISPR-Cas9 is a system based on a combination of sequences in a cluster that is used by bacteria as an immune response system to infection by a virus. Genetic editing of the germ line is a promise for science and society because it is intended to be used for the cure of genetic diseases. This is why many ethical questions arise around it and a legal framework has to be found to record the protocol to be followed in the event of wanting to genetically edit the germ line. These tools are not yet present in therapeutic medicine since their clinical application involves undesired effects both 'on target' and 'off target' and furthermore, their research involves the formation and subsequent destruction of embryos. The aim is to minimize the number of embryos at stake and therefore society must achieve an exhaustive regulation on how to act to achieve the insertion of these techniques in therapeutic medicine.

CRISPR-Cas9, embryo, ethical, germline genetic modification, TALENs, ZFNs



1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversas técnicas de modificación genética de la línea germinal (**Genetic Germline Modification, GGM**) como los dedos de zinc (**Zinc Finger Nucleases, ZFNs**), las nucleasas activadoras de efectores de la transcripción (**Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs**) o las repeticiones de secuencias cortas palindrómicas regularmente interespaciadas en un clúster (**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR**) asociado a la proteína Cas9 (**CRISPR-Cas9**) (Petersen, 2017).

Estas técnicas permiten la modificación intencional de la genética de la línea germinal y es por ello, que durante décadas se analiza su posible aplicación clínica. Su uso suscita controversias y genera un debate de carácter científico, legal y ético en el que son muchas las razones a favor y en contra de su incorporación a la medicina terapéutica (Van Dijke *et al.*, 2018).

A partir de la descripción detallada de las técnicas y su aplicación práctica analizaremos cuál es el tratamiento jurídico ofrecido hoy en día para ellas en Europa, cuáles son las cuestiones éticas que se plantean en torno a las mismas y cuáles las respuestas jurídicas que se proponen como las más adecuadas.

2. OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo de este estudio de revisión bibliográfica es decidir cuáles son las soluciones bioéticas más adecuadas a esta modalidad de edición genética, tomando como punto de partida la hipótesis de que, la utilización de las herramientas avanzadas de edición genética de la línea germinal como **CRISPR-Cas** son una alternativa muy acertada para la medicina terapéutica.



A partir de ahí, analizar si las distintas técnicas de modificación genética son igual de aceptables desde un punto de vista jurídico y ético y describir cuáles son las principales soluciones que ofrece la regulación positiva. Por último, a la luz de los criterios aportados por organismos relevantes del ámbito de la bioética, decidir en qué términos deberá evolucionar tanto la investigación científica como la legislación en este campo.

3. CONTEXTO CIENTÍFICO

Antes de analizar las implicaciones éticas y jurídicas y la regulación necesaria para la aplicación de estas técnicas es necesario conocerlas desde el punto de vista científico. Existen principalmente tres modalidades de edición genética: los dedos de zinc (ZFNs), las nucleasas activadoras de efectores de la transcripción (TALENs) y el sistema de repeticiones de secuencias cortas palindrómicas regularmente interespaciadas en un clúster y la proteína Cas que va asociada a este (CRISPR-Cas9).

Dedos de zinc (ZFNs)

Las nucleasas de dedos de zinc, ZFNs, son enzimas de restricción híbridas diseñadas artificialmente. Utilizadas durante los últimos años como herramienta para la edición genética (Gupta y Shukla, 2017). Las ZFNs contienen un dominio de unión a DNA que consiste en varias proteínas en forma de dedo de zinc (**Zinc Finger Proteins, ZFPs**) y un dominio de escisión constituido por la proteína Fok I derivada de *Flavobacterium okeanokoites*. La composición típica de una proteína dedo de zinc es de 30 aminoácidos que forman dos láminas beta anti paralelas y que están enfrentadas con una hélice alfa (**Figura 1**). Cada dominio de escisión (Fok I) está unido a ZFPs (de 3 a 6) diseñadas para reconocer la secuencia diana que flanquea el sitio de corte (Gupta y Shukla, 2017).

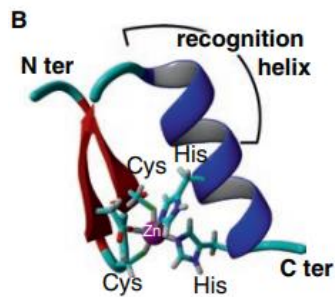


Figura 1. Dominio de unión a DNA de la ZFNs (Liu *et al.*, 2017).

Se suelen utilizar las ZFNs que tienen tres dominios de unión a DNA (ZFPs) resultando así en una especificidad de 9 nucleótidos, es decir, la secuencia de reconocimiento está constituida por 9 nucleótidos. Sin embargo, las ZFNs se emplean por parejas, resultando en una especificidad de reconocimiento de 18 nucleótidos para realizar la escisión de un solo codón (**Figura 2**) (Gupta y Shukla, 2017).

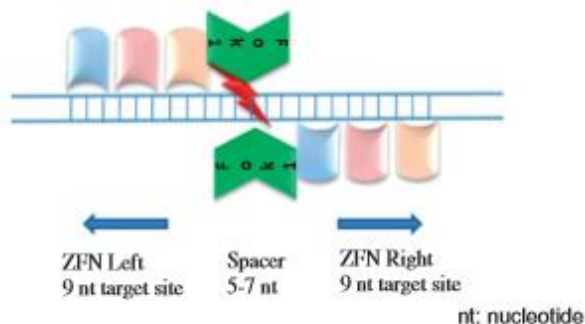


Figura 2. Nucleasa dedos de zinc (Gupta y Shukla, 2017).

Se han diseñado artificialmente nucleasas de este tipo pero con una mayor especificidad en el reconocimiento de la secuencia diana para conseguir una escisión más eficiente. Estas nucleasas poseen 6 dominios Fok I y pueden reconocer el doble de nucleótidos, 18 en vez de 9 (Gupta y Shukla, 2017).

Las ZFNs se han utilizado con fines terapéuticos, principalmente en el tratamiento contra el SIDA causado por el virus VIH que tiene como correceptor fundamental para la infección del organismo el receptor de quimiocinas CCR5 (Jo *et al.*, 2015).



Se conoce que una delección homocigótica de 32 pares de bases del gen CCR5 hace que el individuo sea resistente a la infección. Mediante la utilización de las ZFNs se pueden diseñar células T CD4+ knockout de ese gen. Se extraen células T CD4+ del paciente, se modifican por edición genética mediante ZFNs y se vuelven a inyectar en el paciente. Los resultados de este tratamiento no han presentado efectos adversos (Jo *et al.*, 2015).

Además hay otro gen que interviene en la infección del virus, el gen del correceptor CXCR4. Se ha visto que la inutilización de solo uno de los genes citados anteriormente no es suficiente para garantizar unos resultados terapéuticos definitivos. Por eso, se han diseñado dobles knockout de ambos genes utilizando las ZFNs y tres factores de restricción, en el locus CCR5 (Jo *et al.*, 2015).

Al principio se utilizaron las células T, pero luego la modificación se realizaba sobre células madre hematopoyéticas (HSCs), como en el caso del ‘Paciente de Berlin’ que recibió un trasplante de médula con el gen CCR5 mutado en homocigosis lo que sirvió de cura para la leucemia mieloide que padecía y también para la infección del VIH, ya que no se detectó carga viral después del trasplante y no se le había administrado ningún antiviral (Jo *et al.*, 2015).

Tabla 1. Estado de los estudios clínicos de los ZFNs para enfermedades severas (Jo *et al.*, 2015).

Target disease	Approach	Status
HIV/AIDS (CD4+ T cells)	ZFN knockout	Clinical trial phase 2
HIV/AIDS (hematopoietic cells)	ZFN knockout	Clinical trial phase 1
Beta-thalassemia	ZFN knockout	Pre-clinical
Sickle-cell disease	ZFN knockout	Pre-clinical
Hemophilia A	ZFN insertion	Pre-clinical
Hemophilia B	ZFN insertion	Pre-clinical
Huntington’s disease	Repression by ZFP transcription factor	Pre-clinical
Hunter syndrome	ZFN insertion	Pre-clinical
Hurler syndrome	ZFN insertion	Pre-clinical
Lysosomal storage disorders	ZFN insertion	Pre-clinical

Además de frente al VIH, se ha considerado la posibilidad de utilizar la técnica de las ZFNs en otras enfermedades como por ejemplo, la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X para aumentar el transporte de IL2R-gamma. También se ha utilizado la herramienta sobre células madre humanas de pluripotencia inducida (iPSCs) editando TAP2 y consiguiéndose un número ilimitado de células presentadoras de antígeno lo que funciona como terapia de vacunación. También hay estudios que demuestran que la inserción de transgenes por ZFNs en el locus AAVS1 de iPSCs humanas sirve para corregir el desequilibrio de globinas en la alfa-talasemia. Se pueden utilizar también para editar una versión mutante del factor F9 para el tratamiento de la hemofilia. También puede emplearse en el tratamiento de la anemia falciforme, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Hurler y otras (Tabla 1) (Jo *et al.*, 2015).

Nucleasas activadoras de efectores de la transcripción (TALENs)

Otra de las herramientas para la edición genética son las TALENs, enzimas que contienen dominios de unión a DNA (Figura 3) activadores de efectores de la transcripción (TALEs).

Son factores de invasión de las bacterias del género *Xanthomonas* e intervienen en el proceso infectivo de gran variedad de plantas (Shim *et al.*, 2017).



Figura 3. Dominios TALEs de unión al DNA (Carroll, 2014).



Estos dominios de unión a DNA están formados por 34-35 aminoácidos por monómero donde, dos de estos aminoácidos, el de posición 12 y 13, tienen una gran variabilidad confiriendo así una elevada especificidad en la unión a un par de bases del DNA. Cada monómero de TALE se une con una sola base nitrogenada (Figura 4) (Khan, 2019).

Estos monómeros pueden estar repetidos de 5 a 30 veces, y cada uno de ellos solo reconoce un nucleótido. La secuencia de aminoácidos de los TALEs está muy conservada exceptuadas las posiciones 12 y 13, que son residuos denominados 'residuos variables de repetición' (**Repeat Variable Di-residues, RVDs**). La especificidad en la unión al DNA viene determinada por los RVDs con A, C, G o T (Hegazy y Youns, 2016).

A los dominios TALEs, una vez que se ha identificado y testado la secuencia que se quiere reconocer, se les une la nucleasa Fok I encargada de la escisión. Las ZFNs y las TALENs son similares, de hecho, ambas usan como herramienta de escisión la nucleasa Fok I pero gracias a que cada módulo de TALEs se une únicamente a un nucleótido en vez de a tres, la especificidad de las TALENs es mayor (Carroll, 2014).

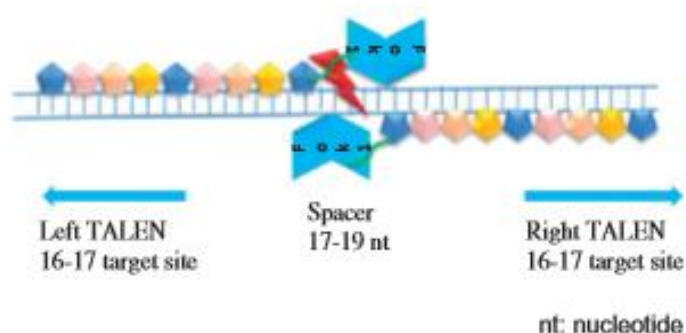


Figura 4. Representación de una TALENs, se observa que cada monómero de TALE se une exclusivamente a un nucleótido de DNA (Gupta y Shukla, 2017).

CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas es un locus compuesto de un operón que contiene la información necesaria para codificar las proteínas Cas, y una matriz formada por secuencias



repetidas intercaladas por secuencias únicas que actúan de espaciadoras y pertenecen al DNA o RNA del organismo invasor. Es parte de la inmunidad adaptativa frente a virus del reino *Bacteria* y de algunos géneros del reino *Archaea* (Chylinski *et al.*, 2013).

Cuando un microorganismo es infectado por un virus, captura una secuencia del DNA o RNA vírico de unas 20-50 pares de bases de longitud, que contiene un motivo de tres nucleótidos adyacente al protoespaciador (**Protospacer Adyacent Motif, PAM**) (Memi *et al.*, 2018). Este fragmento de DNA o RNA es integrado en su genoma como espaciador dentro de un clúster (**Figura 6**). Este clúster se denomina CRISPR, **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats (Carroll, 2014).

Cuando el clúster se transcribe lo hace en forma de un único transcrito que luego se procesa y cada secuencia espaciadora se convierte en un RNA CRISPR (crRNA). Los crRNAs reconocen la secuencia complementaria en el ácido nucleico del organismo invasor y la endonucleasa Cas9 se une a ella y rompe el DNA o el RNA exógeno diana (Waryah *et al.*, 2018).

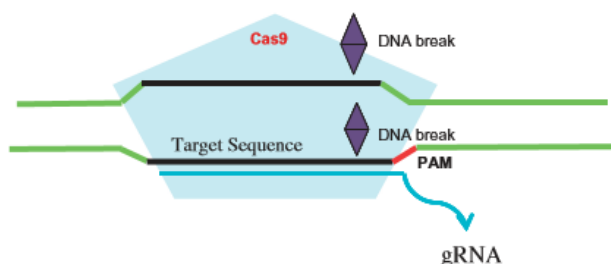


Figura 5. Endonucleasa Cas9 realizando el corte en la secuencia diana del DNA del organismo invasor gracias al reconocimiento del gRNA y la secuencia PAM (Gupta y Shukla, 2017)

Además de los crRNAs se necesitan los tracrRNAs, RNAs secundarios que tienen complementariedad parcial con las secuencias repetidas del clúster. Forman el complejo crRNA/tracrRNA o gRNA (**guide RNA**), que dirige a la proteína Cas9 hasta la secuencia homóloga en el DNA o RNA diana donde se une y realiza un corte (**Figura 5**) (Carroll, 2014).

En resumen, el proceso se explica en tres fases; durante la fase de adaptación, una parte de la secuencia de un ácido nucleico invasor se incorpora como nuevo espaciador dentro de la matriz y la infección es memorizada. Durante la fase de expresión, la matriz se transcribe como una molécula precursora de ARN CRISPR (pre-ARNc) que se somete a procesamiento posterior para generar crRNA cortos y maduros, cada uno complementario a una secuencia invasora única. Durante el fase de interferencia, los crRNA individuales junto los tracrRNAs, guían las proteínas Cas para la destrucción final de los ácidos nucleicos invasores (Figura 6)(Chylinski *et al.*, 2013).

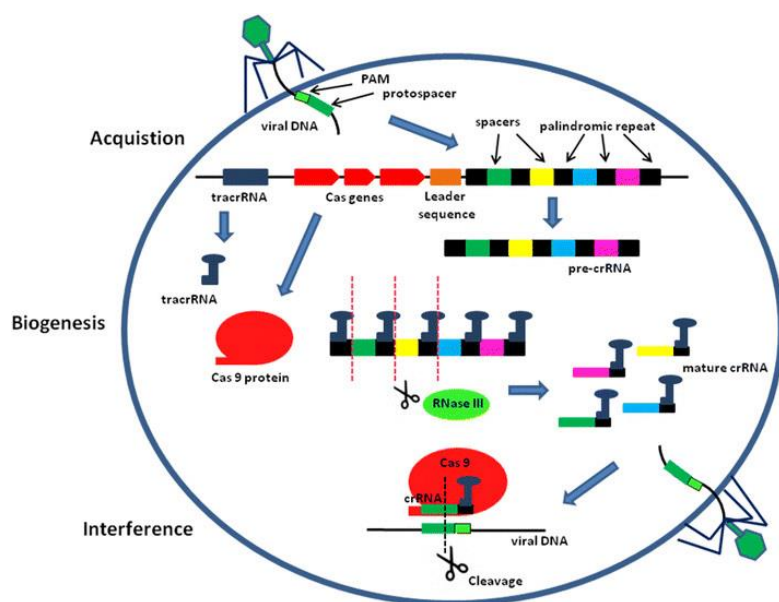


Figura 6. Las tres fases del sistema CRISPR; adquisición, biogénesis e interferencia, en el sistema inmunológico de bacterias y algunas archaeas (Hryhorowicz *et al.*, 2017)

La técnicas de edición genética descritas anteriormente son potentes herramientas para la modificación genética y hacen posible el diseño de knock-ins, knock-outs o knock-downs. Sin embargo, la técnica CRISPR presenta ciertas ventajas con respecto a ZNFs o TALENs, por ejemplo, CRISPR-Cas9 no necesita de ingeniería de proteínas. Además, puede utilizarse para la metilación del DNA o para multiplexación de genes es decir, diseño de múltiples secuencias target en el mismo cromosoma de un huésped (Gupta y Shukla, 2017).



Más allá del uso de CRISPR-Cas para la generación de indeles, es decir, mutaciones por inserción o deleción, se puede emplear el sistema CRISPR con otros fines, por ejemplo, se utiliza para activar o reprimir la expresión de genes modificando los patrones de metilación en las histonas o mediante otras modificaciones de carácter epigenético. También se ha utilizado para el marcaje selectivo del genoma (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2019).

La principal vía por la que el sistema CRISPR-Cas llega a las células y los tejidos es mediante vectores virales. También pueden utilizarse nanopartículas lipídicas o la enzima Cas9 junto a su gRNA convertido en un complejo ribonucleoproteico previamente diseñado. Estas tres maneras de hacer que el sistema CRISPR-Cas actúe sobre las células del tejido correspondiente, tienen una serie de ventajas y desventajas, y por tanto, se utilizará la más adecuada en cada caso específico dependiendo del tejido, la ruta de administración o la técnica de edición que se requiera (Foss *et al.*, 2019).

La estrategia de edición genética que está más avanzada es la de manipulación de las células *ex vivo*, que después se administran al paciente y tienen efectos terapéuticos. Por ejemplo, las células T que se han utilizado con éxito en inmunoterapia. Estas células tienen insertados transgenes que codifican para receptores de antígeno quiméricos programables en el gen constante del receptor α de células T endógenas, con esto se evita el agotamiento de las células T por sobreestimulación y se elimina la expresión del receptor de células T endógenas que podría dirigir la enfermedad por injerto contra el huésped (Pickar-Oliver y Gersbach, 2019).

Otra aplicación terapéutica importante es la de eliminar componentes del sistema de antígeno leucocitario humano para generar donantes celulares universales, que abordarían los desafíos prácticos y económicos de las terapias celulares autólogas específicas del paciente (Pickar-Oliver y Gersbach, 2019).

También se está llevando a cabo actualmente el primer ensayo humano de CRISPR-Cas para tratar la β -talasemia y el primero de edición *in vivo* del genoma por CRISPR-Cas en retina para tratar una forma rara de ceguera (Pickar-Oliver y Gersbach, 2019).



Aproximación de CRISPR-Cas a la medicina clínica

El sistema CRISPR-Cas es también muy útil para la cura de enfermedades que están causadas por la mutación de un único gen, como es el caso de la enfermedad de Huntington. Se han realizado estudios en células de ratón, pero su aplicación en embriones humanos es aún controvertida. Uno de los puntos que más preocupación conlleva es la posibilidad de los efectos secundarios y de que se produzcan cambios genéticos no deseados, esto ocurre si el sistema encuentra una secuencia similar en el DNA a la secuencia target, produciéndose así los efectos ‘off-target’ (Figura 7). Por eso, se han diseñado enzimas Cas9 con una tasa de error más baja (Ledford, 2019).

Sin embargo, los experimentos se han realizado sobre células de ratón y células humanas en cultivo y maduras y no propiamente embriones humanos, esto puede hacer que la tasa de error sea diferente. Se entiende que el número de errores no tiene porqué ser cero, ya que incluso en el proceso natural, existe una pequeña tasa de error (Ledford, 2019).

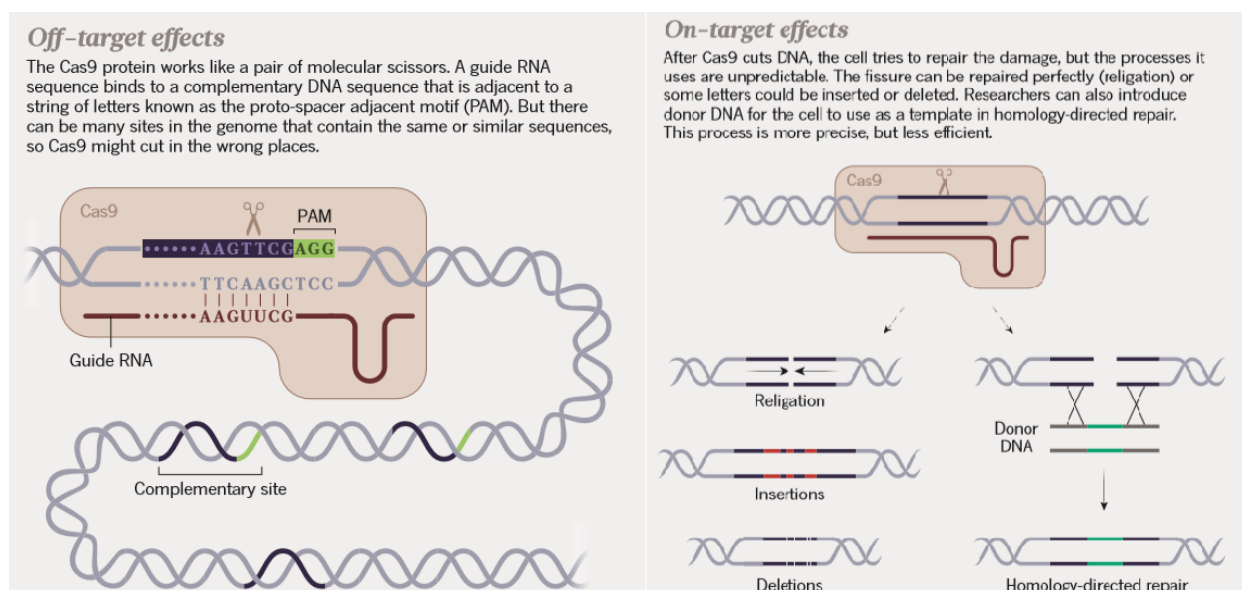


Figura 7. A la izquierda, esquema representativo de los efectos ‘off-target’, a la derecha, explicación de los efectos ‘on target’ (Ledford, 2019).

Además de los efectos ‘off target’ están los efectos ‘on target’ (Figura 7). Después de que la enzima Cas9 corte el DNA, la reparación del daño depende de la célula, pero los procesos de reparación de las células son impredecibles (Ledford, 2019).



Uno de los mecanismos de reparación que utilizan las células, llamado unión no homóloga (**N**on **H**omologous **E**nd **J**oining, NHEJ), a menudo, tiene como consecuencia la eliminación de algunas bases del DNA en el sitio de corte. Otro de los mecanismos es el de reparación homóloga directa (**H**omologous **D**irect **R**eparation, HDR), que permite reescribir la secuencia de DNA ya que se sustituye en el sitio de corte por una secuencia modelo que se copia en ese punto (Ledford, 2019).

Ambos procesos son difíciles de controlar; en el primero por ejemplo, las deleciones en el sitio de corte varían de tamaño produciendo distintas secuencias de DNA. En el segundo, depende del tipo celular y ocurre a una frecuencia mucho menor que la de las deleciones (Ledford, 2019).

Además hay que tener en cuenta que los experimentos se han realizado utilizando células de ratón, donde la técnica de CRISPR es mucho más precisa y eficiente en comparación con embriones humanos (Ledford, 2019).

En 2017, un equipo de investigación utilizó el sistema para corregir embriones humanos que tenían variantes genéticas con problemas de corazón. Esos embriones no fueron nunca implantados pero los resultados mostraron que las células modificadas habían utilizado el genoma de la madre para reparar el daño en el DNA en vez de la secuencia que había sido proporcionada por los investigadores. Esto dio que pensar, puesto que se consideró una manera más fiable de utilizar CRISPR al usar el genoma de la madre y no uno externo, pero desafortunadamente, los investigadores no fueron capaces de repetir los resultados (Ledford, 2019).

La cuestión es, en caso de conseguir una precisión perfecta dentro de la edición genética, ¿qué tipo de cambios en la línea germinal humana podrían hacerse para asegurar que fuesen seguros? (Ledford, 2019)

En 2017, la Academia Nacional de Ciencias, Ingeniería y Medicina de los EE.UU describió las condiciones que deben cumplirse antes de editar un embrión humano destinado a la implantación. Uno de los criterios fue que la secuencia de ADN creada para la edición tiene que ser común en la población y no ha de conllevar riesgo alguno sobre desarrollar cualquier enfermedad. Conseguir estos dos aspectos es muy complicado (Ledford, 2019).



El primer gen heredable que se ha editado en humanos es el gen CCR5, que produce un receptor de células inmunes que permite al VIH afectar a humanos. Si se rompe el gen, no se produce el receptor y la descendencia debería ser resistente al virus. Así lo razonó el científico He Juankui de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Shenzhen, China. Aunque parezca sencillo, un estudio publicado el mismo mes, usando información de UK Biobank revela que la delección de ese gen puede estar relacionada con un acortamiento de la esperanza de vida (Ledford, 2019).

Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de estudios en este área se han realizado con personas europeas. En caso de querer aplicar estas técnicas en personas de África, por ejemplo, tendría que hacerse previamente un estudio exhaustivo de los genes y el entorno de las poblaciones africanas (Ledford, 2019).

Muchas veces, no solo difieren los genes entre individuos de una misma población, sino entre las células de un mismo organismo. Este fenómeno se conoce como **mosaicismo** y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación se ha descubierto que es más común de lo que se creía. Esto puede suponer un problema para la edición genética. Por ejemplo, un embrión que se ha seleccionado para corregir porque posee un gen que causa la enfermedad de Huntington puede contener una mezcla de células corregidas y no corregidas (Ledford, 2019).

Una posible solución sería introducir el sistema CRISPR-Cas9 en los embriones en su estado más temprano de desarrollo cuando son tan sólo una célula. Con ello, se eliminaría el mosaicismo pero todo tendría que ser testado muchas más veces para ser seguro. Aunque se soluciona un problema se genera otro, y es que si la manipulación se hace en un estadio tan temprano que no se sabe si el embrión está sano o no, luego si se manipulan todos, se estarían manipulando los sanos también (Ledford, 2019).

A parte de las barreras técnicas y científicas que aún han de superarse en el campo de la edición genética hereditaria, existen aspectos éticos y sociales en torno al tema también muy difíciles de abarcar. Las consultas han estado en curso y los informes y las declaraciones de posición han venido de las sociedades científicas de todo el mundo (Ledford, 2019).



Se debe lograr un amplio consenso social antes de tomar cualquier decisión, una tarea realmente desalentadora teniendo en cuenta que en la actualidad, la mayoría de las consultas se han llevado a cabo en países ricos y occidentales (Ledford, 2019). Si tan solo un parte de la población mundial tiene acceso a estas técnicas, conoce los detalles técnicos y ha iniciado los ensayos clínicos, no podríamos hablar de consenso mundial en la regulación de las técnicas.

Respecto a la opinión de la sociedad, las encuestas públicas a menudo encuentran apoyo para la edición del genoma heredable si se demuestra que es seguro y se usa para tratar enfermedades genéticas. Muchos científicos y especialistas en ética hacen distinción entre modificar el genoma para mejorar la capacidad atlética, por ejemplo, o cambiar el color de los ojos, en lugar de tratar o prevenir enfermedades. E incluso entonces, hay un debate sobre qué enfermedades podrían justificar tal enfoque. Las condiciones fatales con una contribución genética fuerte y clara, como la enfermedad de Huntington, que es casi inevitable cuando la mutación está presente, son los ejemplos más comunes que se dan. Pero cuando se trata de editar un gen como PCSK9 para prevenir el colesterol alto y evitar enfermedades cardíacas, las cosas son decididamente más grises, dice Feng (Ledford, 2019).

Teniendo en cuenta todos estos condicionantes y la dificultad para regularlos, vamos a analizar a lo largo del siguiente apartado las razones existentes a favor y en contra de las herramientas de modificación genética, así como todas las pautas de regulación desde del punto de vista ético y jurídico que hay en la actualidad, o que se contemplan con perspectiva de futuro.

4. METODOLOGÍA

Comparativa de las técnicas de edición genética

En los últimos años, la técnica CRISPR ha tenido la atención principal en el campo de la ingeniería genómica y epigenómica pero merece la pena compararla con las técnicas previas a su descubrimiento, ZFNs y TALENs. Una vez que hemos descrito cada una de ellas podemos pasar a analizar en qué difieren y qué tienen en común, y cuál de ellas es más



ideónea cuando queramos proceder a la edición del material genético. Algunas de las diferencias más notables están recogidas en la **Tabla 2**.

Por ejemplo, ZFNs y TALENs usan proteínas para detectar y unirse a la secuencia diana del DNA lo que hace que su síntesis resulte laboriosa y cara. En comparación, CRISPR-Cas9 usa secuencias cortas de RNA para unirse a la secuencia target, haciendo que el sistema sea mucho mas versátil, barato y fácil de manejar. A estos factores se debe el éxito de la técnica de CRISPR y la importancia de su descubrimiento en el campo de la edición genética (Petersen, 2017).

Además, CRISPR es mejor opción para la multiplexación y la edición simultánea de edición genómica y epigenómica. (Waryah *et al.*, 2018). Con respecto a la elección de herramienta de edición, los sistemas TALEN y CRISPR / Cas están reemplazando a los ZFN para uso rutinario en el laboratorio teniendo en cuenta sus ventajas de diseño, eficacia y confiabilidad. La especificidad sigue siendo un problema en el sistema CRISPR, pero su simplicidad y el hecho de que se multiplexa fácilmente son ventajas únicas.



Tabla 2. Diferencias principales entre las técnicas de edición genética (Waryah *et al.*, 2018).

	ZINC FINGERS	TALENs	CRISPR-Cas9
Origen	Factores de transcripción eucarióticos	Patógenos de plantas	Sistema inmunitario de las bacterias
Tipo de reconocimiento	Proteína y DNA o proteína y RNA 1:3- Cada dominio ZF reconoce un sitio de 3 pb	Proteína y DNA 1:1- cada repetición TALE se une a 1 bp	RNA-DNA 1:1- se une la base complementaria entre el gRNA y el DNA target
Tamaño	Cada dedo son 20-30 aminoácidos. Se suelen utilizar las proteínas 6ZF.	Cada repetición TALE es de 33-35 aminoácidos. Se suelen utilizar 20 repeticiones.	Las enzimas Cas9 que se suelen utilizar es la <i>SpCas9</i> o la <i>dCas9</i> que tienen aproximadamente 1400 aminoácidos aunque con otras proteínas Cas9 esto puede cambiar
Especificidad	Alta frecuencia de uniones off-target	Baja frecuencia de uniones off-target	Frecuencia variable de uniones off-target pero la especificidad se mejora considerablemente utilizando las variantes altamente específicas de proteína Cas9 (<i>SpCas9</i>)
Influencia de la cromatina y el microambiente	Pueden unirse a cromatina condensada y DNA hipermetilado	Las uniones pueden separarse en regiones de cromatina condensada	Estudios sugieren que la <i>SpCas9</i> puede unirse a cromatina condensada y a DNA hipermetilado
Flexibilidad y potencial para multiplexación	Cada proteína debe ser diseñada y construida para cada nueva secuencia target	Cada proteína debe ser diseñada y construida para cada nueva secuencia target; las repeticiones pueden generar problemas para la clonación	El diseño y clonaje de los gRNAs es simple y eficiente
Forma de transporte	Puede acomodarse incluso en vectores con límite de capacidad	Necesitan de vectores de más capacidad y puede encontrar problemas en los vectores lentivirales debido al elevado número de repeticiones	Necesitan de vectores de gran capacidad. Se suelen transportar en complejos ribonucleoproteicos (RNP)



Sin embargo, algunos de los pares ZFN actuales son muy efectivos y muy específicos, el del gen CCR5, por ejemplo. Los ZFN también tienen la ventaja de un tamaño pequeño. Las secuencias de codificación para dos proteínas de cuatro dedos ocupan poco más de 2 kb y son transportadas fácilmente por plásmidos o vectores virales. Las secuencias de codificación TALEN tienen aproximadamente 3 kb cada una, y la secuencia de codificación Cas9 tiene más de 4 kb.

Teniendo en cuenta las diferencias principales entre las técnicas y algunas de las aplicaciones en las que podrían utilizarse, podemos resumir las ventajas del uso de cada una de ellas y sus limitaciones en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Ventajas y limitaciones de las herramientas de modificación genética de la línea germinal (Gupta y Shukla, 2017).

HERRAMIENTA DE EDICIÓN	Ventajas	Limitaciones
ZFNs	Fácil de transportar hasta la secuencia target deseada La eficiencia en la unión a la secuencia target es variable	Elevada frecuencia de efectos 'off-target' Rendimiento no alto en el targeting
TALENs	Muy eficientes y fáciles de diseñar Elevada eficiencia en unión al target	Más complicado de transportar hasta la secuencia target Las repeticiones pueden causar cortes no deseados en las secuencias de DNA Poco efecto 'off-target'
CRISPR-Cas9	Muy eficiente Fácil de multiplexar Elevada eficiencia de unión al target	Efecto 'off-target' muy variable



Implicaciones éticas y sociales

La complejidad de las técnicas de edición junto a los efectos ‘off-target’ y ‘on-target’ que llevan consigo, hacen que la modificación genética de la línea germinal sea un reto para la ciencia y la medicina, al que además se añade el componente social, ético y jurídico por tratarse de la edición de embriones humanos.

Todavía existen muchos riesgos desconocidos y consecuencias no deseadas de estas tecnologías y además es difícil regularlas adecuadamente porque cuesta definir qué usos son aceptables y bajo qué condiciones médicas. Una regulación óptima de estas técnicas habría de basarse en el más amplio consenso internacional y garantizar el acceso en condiciones de igualdad de toda la sociedad (Ormond *et al.*, 2019).

Al tratarse de modificaciones sobre la línea germinal, el impacto de la edición repercutirá sobre las generaciones futuras, un aspecto también a considerar ya que dificulta la inserción de las técnicas en la medicina actual. También hay que tener en cuenta la investigación preclínica sobre los embriones, el gran número de embriones y la protección a los donantes que se necesitaría (Ormond *et al.*, 2019).

La necesidad de intervención física y el daño potencial durante el embarazo y/o a la madre es también un aspecto preocupante, así como la investigación para validar las intervenciones. A nivel pediátrico existe preocupación sobre el posible impacto en el desarrollo (Ormond *et al.*, 2019).

Sin embargo, existen varios estudios que demuestran la viabilidad de la corrección genética en embriones humanos diploides y por tanto, reflejan que estas técnicas pueden ser aplicadas a embriones humanos para corregir alteraciones concretas de nucleótidos. Aun así, la eficiencia no es del 100% y el mosaicismo o las variaciones alélicas no deseadas pueden seguir ocurriendo. Por ejemplo, en muchas jurisdicciones, la creación de embriones humanos específicamente para fines de investigación está prohibido (Rossant, 2018).

La edición genética de la línea germinal se ha considerado la solución última en medicina para erradicar las enfermedades genéticas en las familias y en la sociedad. Pero como hemos descrito anteriormente, su utilización en medicina terapéutica conlleva



controversias. Entre ellas, el riesgo para las generaciones futuras, la transgresión entre las leyes de lo natural y lo divino, y la utilización de las herramientas con fines de mejora genética y sin propósitos médicos (Ishii, 2017).

En las observaciones finales de la Cumbre Internacional de Edición de Genes Humanos de 2015 que se celebró la Academia Nacional de Ciencias, Ingeniería y Medicina (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, NASEM) se señaló que sería irresponsable proceder con cualquier uso clínico de la edición genética de la línea germinal. Sin embargo, el informe final de NASEM en 2017 concluyó de manera diferente, afirmando que los ensayos con edición del genoma de la línea germinal solo deben permitirse dentro de un marco reglamentario sólido y eficaz (Ishii, 2017).

Se considera que hay que establecer un seguimiento para aquellos niños que nazcan por la vía de la edición genética de la línea germinal. Teniendo en cuenta que la terapia de edición somática requiere varios años de seguimiento, ¿cuánto tiempo debería aplicarse un seguimiento en los niños que han nacido editados genéticamente?

Se ha propuesto una fase de seguimiento clínico de 15 años para monitorizar a los niños que estén bajo edición genómica de la línea germinal (Evitt *et al.*, 2015). Sin embargo, el plazo es insuficiente en el caso de enfermedades de aparición tardía. Por ejemplo, la edad en que aparece la enfermedad de Huntington es en torno a los 30 años o posterior.

Se propuso también que se sometieran inicialmente a exámenes periódicos y que se dejaran más tarde, pero tal y como se resume en la Cumbre, sería irresponsable todavía proceder a cualquier uso clínico de la edición genética germinal sin antes establecerse un protocolo de seguimiento ético y razonable para el paciente (Ishii, 2017).

Otra pregunta que surge alrededor de todo esto es; ¿debe la seguridad social cubrir los costes de los usos clínicos de las técnicas de edición genética de la línea germinal para impedir el desarrollo de una enfermedad?

Si los países no cubren los costes, el beneficio de la edición del genoma germinal solo se daría entre los segmentos más aventajados de la sociedad, aumentando las diferencias en las clases sociales (Ishii, 2017).

Una encuesta entre 39 países revela que el 74% de ellos prohíbe expresamente la edición genética de la línea germinal. Como consecuencia de los controvertidos aspectos éticos, algunos países establecerán o mantendrán la prohibición. Sin embargo, algunos países siguen adelante con la inserción de la edición como herramienta para la fertilidad clínica (Ishii, 2017).

El primer report de edición genética directa sobre embriones humanos fue publicado en marzo de 2015. Aunque el estudio se hiciera sobre embriones tripnucleares no viables y mostrara mosaicismo y mutaciones off-target, desencadenó una serie de respuestas por parte de organizaciones y grupos en todo el mundo (Rossant, 2018).

Tras una reunión de la Cumbre Internacional sobre edición de genes humanos celebrada en Washington en diciembre de 2015, la Academia Nacional de Ciencias (National Academy of Sciences, NAS) y la Academia Nacional de Medicina (National Academy of Medicine, NAM) estableció un grupo de trabajo internacional para considerar las cuestiones científicas, éticas y sociales que surgen al hablar de edición genética de la línea germinal (Rossant, 2018).

Las principales recomendaciones del comité (Figura 8) han sido respaldadas por otros informes publicados en el último año. En el informe del comité, no se contempla una prohibición total de la edición genética de la línea germinal sino que se propone un conjunto de criterios estrictos y mecanismos de supervisión que tendrían que cumplirse antes de que se consideraran las aplicaciones clínicas específicas (Rossant, 2018).

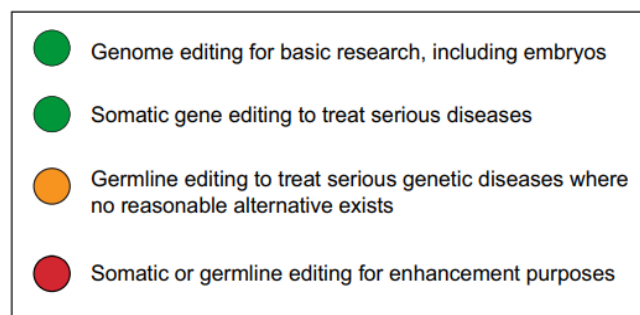


Figura 8. Recomendaciones del informe de la NAS sobre en qué casos proceder a la edición genética. En verde, se puede proceder bajo regulación, en naranja, se procede siempre que sea con extrema cautela y bajo estricta supervisión y en rojo, no se procede (Rossant, 2018).

La expansión de la edición de genes humanos, ya sea somática o germinal, más allá del tratamiento o prevención de enfermedades graves, es decir, en relación a estrategias de mejora genética se prohibió definitivamente (Rossant, 2018).

Una encuesta sobre la opinión de la edición del genoma llevada a cabo por Scheufele y sus compañeros en los Estados Unidos sugirió que había un cambio positivo en la percepción y aceptación de algunas formas de edición de genes humanos (Scheufele *et al.*, 2017).

La creación de la Asociación de Investigación Responsable e Innovación en la Edición Genética (Association for **R**esponsible **R**esearch and **I**nnovation in **G**enome **E**ding, ARRIGE) establece estrategias internacionales para supervisar el progreso de la edición genética y evaluar las normas éticas y de regulación (Rossant, 2018).

Se pueden utilizar embriones de primates no humanos como un comparador útil para el estudio del desarrollo humano. En especial, se han utilizado para analizar las posibles diferencias entre germoplastos de roedores y primates, y para, una vez aplicada la edición de genes se explore la función genética con más detalle. No son un reemplazo en la investigación sobre los embriones humanos pero sí un complemento importante. También se han desarrollado embrioides, gastruloides y estructuras similares a sacos amnióticos a partir de las células madre pluripotentes humanas (Rossant, 2018).

Más allá de los riesgos potenciales y aún desconocidos de la edición del genoma de la línea germinal, hay varias formas de que el impacto de estas nuevas tecnologías sea éticamente problemático si funciona cuando y como se pretende. Como se ha resumido anteriormente, no hay todavía una buena base de pruebas de alta calidad que respalden y apoyen el uso de la edición del genoma de la línea germinal, sigue habiendo consecuencias de riesgo desconocido para la salud y las cuestiones éticas no se han explorado del todo ni resuelto por completo por la sociedad (Ormond *et al.*, 2017).



Razones a favor y en contra

Tabla 4. Principales razones a favor y en contra de las GGM reportadas por categoría (Van Dijke *et al.*, 2018)

	Razones a favor	Razones en contra
Introducción de las GGM en la medicina clínica, ¿sí o no?	Pueden prevenir del sufrimiento a un niño y por ende a sus padres por curar una enfermedad genética	Pueden suponer riesgos para la salud del niño y las siguientes generaciones debido a los efectos ‘off-target’ y ‘on-target’
	Pueden ser una terapia de bajo coste si se usa CRISPR-Cas9	Pueden ser inefectivas
	Puede considerarse no ético privar a un niño y/o a la sociedad del acceso a estas técnicas que te liberan del sufrimiento	Pueden encontrarse con una necesidad clínica pequeña que ya tenga una alternativa disponible
	Pueden ser aceptadas ya que existen otros medios con resultados comparables	Puede contribuir a la inequidad entre países si el acceso depende de las riquezas u otros privilegios
		Pueden ser mal utilizadas por algunos científicos
		Pueden resultar en la comercialización de la tecnología, dando lugar a una posible explotación
		Pueden entrar en conflicto con los principios de consentimiento informado ya que no hay ningún agente disponible para dar consentimiento
		Pueden afectar a la dignidad humana

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las perspectivas de futuro para la edición de la línea germinal cambiarían si la edición del gen target pudiera llevarse a cabo en líneas celulares progenitoras estables que pudieran producir óvulos y espermatozoides *in vitro* (Rossant, 2018).

Una mejor comprensión de los orígenes de las células germinales en ratones en comparación con los embriones humanos debería ayudar a promover una mejor gametogénesis de las células madre pluripotentes humanas. La perspectiva a largo plazo de que las células madre específicas de un paciente sean editadas *in vitro* y luego diferenciadas en óvulos o espermatozoides funcionales, con la corrección validada de un defecto hereditario, no está fuera de discusión (Rossant, 2018). De hecho, podría considerarse una vía válida para la inserción de las técnicas en la medicina clínica en un futuro próximo.

Por otra parte, la rápida proliferación de las terapias de edición genética de la línea germinal mediante CRISPR-Cas9 (CRISPR-Cas9 Germline Editing Therapies, CGET) implican un riesgo importante y es por eso fundamental que estas tecnologías se adopten solo después de un examen minucioso y adecuado. El uso inapropiado de la modificación genética generaría la desconfianza del público de científicos que buscan desarrollar las CGETs (Evitt *et al.*, 2015).

El desarrollo de las CGET puede dividirse en tres fases: investigación preclínica, ensayos clínicos y distribución post-autorización. Antes de cada una de estas fases, las autoridades financieras y los puntos de regulación deben asegurar que las terapias propuestas cumplen con las directrices de seguridad y ética. En la investigación sobre cualquier terapia, los científicos deben obtener financiación y la aprobación ética de parte de la institucional apropiada (Evitt *et al.*, 2015).

Las normas preliminares de seguridad deben verificar la especificidad de las modificaciones hechas con CRISPR en una línea celular modelo y asegurar que el nuevo ADN introducido en el genoma se propaga a través de las generaciones a un ritmo normal.



Uno de los mayores riesgos de las CGET es la introducción de alelos con efectos secundarios no deseados que sólo se reconocen en las generaciones posteriores a la edición inicial de los genes. Teniendo en cuenta además que una edición genética perjudicial no puede ser eliminada de la población una vez que se introduce en la línea germinal (Evitt *et al.*, 2015).

El beneficio de una edición genética terapéutica con garantía de transmisión no supera el costo de sus complicaciones imprevistas. Si una edición genética es beneficiosa, los receptores probablemente elegirán proporcionar el mismo tratamiento a sus hijos. Si no, una modificación irreversible no debería propagarse dentro de la población de forma acelerada (Evitt *et al.*, 2015).

Sostenemos que existen dos casos para una investigación apropiada de los CGET. En el primer caso, los efectos terapéuticos que se consigan mediante la edición de la línea germinal no pueden lograrse como consecuencia de la selección de embriones y el Diagnóstico Genético Prenatal (**P**renatal **G**enético **D**iagnosis, **PGD**). En las enfermedades monogénicas, los CGET confieren beneficios terapéuticos únicos cuando uno de los padres es homocigótico para una enfermedad dominante o ambos padres son homocigóticos para una enfermedad recesiva. Las enfermedades poligénicas son a menudo demasiado complejas para remediarlas mediante edición genética sin que conlleve efectos secundarios nocivos.

En el segundo caso, las enfermedades predominantes dentro de una población presentan un uso ético incluso si el embrión es seleccionado a través de **PGD** y es utilizado por los padres para evitar tener un hijo con una enfermedad. Sostenemos que los embriones son portadores de un estatus moral intermedio entre la vida no humana y un feto. Como tal, la destrucción embrionaria sobre el curso de un programa de investigación debe ser minimizado (Evitt *et al.*, 2015)

Sin embargo, los embriones en estado de enfermedad también se destruirán cada vez que los padres realicen un **PGD** durante un ciclo de fertilización *in vitro* (**FIV**). Como resultado, el desarrollo de un CGET está moralmente justificado cuando la pérdida de embriones en el **PGD** supere la pérdida de embriones durante la investigación en **CRISPR** (Evitt *et al.*, 2015).



Se ha propuesto un modelo de regulación para las CGETs (Figura 9) para encontrar las soluciones técnicas y éticas específicas para estas terapias (Evitt *et al.*, 2015).

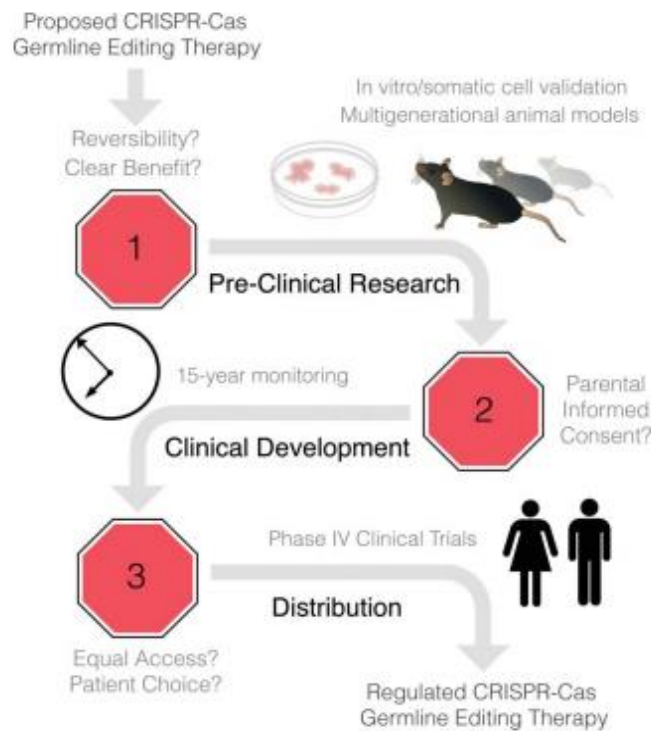


Figura 9. Modelo de regulación de las terapias en desarrollo de CRISPR para la edición genética de la línea germinal (Evitt *et al.*, 2015).

Tal y como se observa en la figura, las CGETs se dirigen a las enfermedades monogénicas sin tratamiento alternativo y a las enfermedades generalizadas para las cuales la pérdida de embriones a través del tratamiento PGD es mayor que la pérdida de embriones durante la investigación de las CGET. Durante la investigación preclínica los investigadores muestran la viabilidad de la técnica en concepto de seguridad y eficacia en modelos animales multigeneracionales de cada vez mayor complejidad. Antes del desarrollo clínico los comités de supervisión específicos de las CGET y los reguladores federales deben asegurar que los protocolos de ensayos clínicos de las CGET incluyen estándares elevados del consentimiento informado de los padres para participar (Evitt *et al.*, 2015).



Durante el desarrollo clínico y la distribución, los desarrolladores de las CGET llevan a cabo ensayos clínicos de 15 años de duración en las fases I y III de acuerdo con las normas de las terapias de transferencia de genes y hay una última fase, la IV, que consiste en el post-marketing de estos casos clínicos (Evitt *et al.*, 2015).

Antes de la distribución, los legisladores federales tienen que aprobar que se reserve la autonomía de decisión y se combata la discriminación contra los grupos de pacientes que optan por no participar en las CGETs. Además de asegurar la igualdad de acceso a las CGET para los pacientes marginados que optan por la inclusión (por ejemplo, los pacientes de bajo nivel socioeconómico) (Evitt *et al.*, 2015).

Con esto podemos decir que la regulación de las CGET y otras terapias que involucren la utilización de herramientas de la modificación genética puede seguir este esquema de tal modo que se minimicen los riesgos técnicos y se resuelvan las cuestiones éticas que se generen alrededor. Sin embargo, todavía surgen muchas complicaciones cada vez que se quiere aplicar en un caso clínico real y a un paciente real. Si se continúa trabajando en esta línea es muy probable que se llegue a conseguir una inserción cuasi perfecta de las técnicas en la medicina terapéutica.

6. REFERENCIAS

- Carroll, D. (2014) "Genome Engineering with Targetable Nucleases", *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), pp. 409-439. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035418.
- Chylinski, K., Le Rhun, A. y Charpentier, E. (2013) "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems", *RNA Biology*, 10(5), pp. 726-737. doi:10.4161/rna.24321.
- Van Dijke, I., Bosch, L., Bredenoord, A. L., Cornel, M., Repping, S. y Hendriks, S. (2018) "The ethics of clinical applications of germline genome modification: A systematic review of reasons", *Human Reproduction*, 33(9), pp. 1777-1796. doi:10.1093/humrep/dey257.
- Evitt, N. H., Mascharak, S. y Altman, R. B. (2015) "Human Germline CRISPR-Cas Modification: Toward a Regulatory Framework", *American Journal of Bioethics*, 15(12), pp. 25-29. doi:10.1080/15265161.2015.1104160.
- Foss, D. V., Hochstrasser, M. L. y Wilson, R. C. (2019) "Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics", *Transfusion*, 59(4), pp. 1389-1399. doi:10.1111/trf.15126.
- Gupta, S. K. y Shukla, P. (2017) "Gene editing for cell engineering: trends and applications", *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), pp. 672-684. doi:10.1080/07388551.2016.1214557.
- Hegazy, W. A. H. y Youns, M. (2016) "TALENs construction: Slowly but surely", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(7), pp. 3329-3334.
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J. y Słomski, R. (2017) "CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering", *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), pp. 233-240. doi:10.1007/s00005-016-0427-5.
- Ishii, T. (2017) "The ethics of creating genetically modified children using genome editing", *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 24(6), pp. 418-423. doi:10.1097/MED.0000000000000369.
- Jo, Y. Il, Kim, H. y Ramakrishna, S. (2015) "Recent developments and clinical studies utilizing engineered zinc finger nuclease technology", *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel, 72(20), pp. 3819-3830. doi:10.1007/s00018-015-1956-5.
- Khan, S. H. (2019) "Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Elsevier Ltd., 16(June), pp. 326-334. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.027.
- Ledford, H. (2019) "CRISPR babies: when will the world be ready?", *Nature*, 570(7761), pp. 293-296. doi:10.1038/d41586-019-01906-z.
- Liu, Z., Cai, Y. y Sun, Q. (2017) "Genome Editing in Animals", 1630, pp. 141-152. doi:10.1007/978-1-4939-7128-2.
- Memi, F., Ntokou, A. y Papangeli, I. (2018) "CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations", *Seminars in Perinatology*. Elsevier Inc., 42(8), pp. 487-500. doi:10.1053/j.semperi.2018.09.003.
- Ormond, K. E., Bombard, Y., Bonham, V. L., Hoffman-Andrews, L., Howard, H., Isasi, R., Musunuru, K., Riggan, K. A., Michie, M. y Allyse, M. (2019) "The clinical application of gene editing: Ethical and social issues", *Personalized Medicine*, 16(4), pp. 337-350. doi:10.2217/pme-2018-0155.
- Ormond, K. E., Mortlock, D. P., Scholes, D. T., Bombard, Y., Brody, L. C., Faucett, W. A., Garrison, N. A.,



Hercher, L., Isasi, R., Middleton, A., Musunuru, K., Shriner, D., Virani, A. y Young, C. E. (2017) "Human Germline Genome Editing", *American Journal of Human Genetics*. Elsevier Company., 101(2), pp. 167-176. doi:10.1016/j.ajhg.2017.06.012.

Petersen, B. (2017) "Basics of genome editing technology and its application in livestock species", *Reproduction in Domestic Animals*, 52, pp. 4-13. doi:10.1111/rda.13012.

Pickar-Oliver, A. y Gersbach, C. A. (2019) "The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 20(8), pp. 490-507. doi:10.1038/s41580-019-0131-5.

Rodríguez-Rodríguez, D. R., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M. A., Garza-Rodríguez, M. D. L. y Barrera-Saldaña, H. A. (2019) "Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review)", *International Journal of Molecular Medicine*, 43(4), pp. 1559-1574. doi:10.3892/ijmm.2019.4112.

Rossant, J. (2018) "Gene editing in human development: Ethical concerns and practical applications", *Development (Cambridge)*, 145(16 Special Issue), pp. 2017-2019. doi:10.1242/dev.150888.

Shim, G., Kim, D., Park, G. T., Jin, H., Suh, S. K. y Oh, Y. K. (2017) "Therapeutic gene editing: Delivery and regulatory perspectives", *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 38(6), pp. 738-753. doi:10.1038/aps.2017.2.

Waryah, C. B., Moses, C., Arooj, M. y Blancafort, P. (2018) *Zinc fingers, TALEs, and CRISPR systems: A comparison of tools for epigenome editing*, *Methods in Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-4939-7774-1_2.