

Universidad de Chile
Vicerrectoría de Asuntos Académicos
Programa Académico de Bachillerato

Tecnología CRISPR-Cas y sus implicancias bioéticas

Monografía para la obtención del grado de
Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas

Presenta
Javiera Nicole Ponce Farías

Bajo la dirección de
Daniela Seelenfreund Hirsch

Santiago, Chile, 2021.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
¿EN QUE CONSISTE CRISPR-CAS9?	5
1. Aspectos técnicos	5
2. Aspectos históricos de su descubrimiento.....	9
3. CRISPR como herramienta	12
IMPLICANCIAS ÉTICAS DE SUS DISTINTAS APLICACIONES	17
1. ¿Qué es la bioética?	17
2. CRISPR y la bioética.....	20
3. ¿Es correcto cambiar el genoma humano?	23
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS	31

RESUMEN

Hechos como el descubrimiento de la estructura de doble hélice del DNA o el Proyecto Genoma Humano han revolucionado la ciencia contemporánea. Estos últimos años, con el hallazgo del sistema CRISPR-Cas9 que permite la modificación de secuencias genéticas de forma eficaz y simple, nos lleva a pensar que la ciencia no tiene límites. Esta poderosa herramienta permite tener nuevas posibilidades para salvar vidas, crear nuevos tratamientos e incluso combatir la escasez de alimentos mediante el uso de genes y la modificación de su genoma. Sin embargo, nos hace cuestionarnos ¿Qué o quién limita a la ciencia genética? Esto se responde con el concepto de bioética, el cual fue acuñado por Van Rensselaer Potter durante la década de los 70 y se define como el estudio de la moralidad del comportamiento humano en la ciencia. El objetivo de asociar el sistema CRISPR-Cas9 con la bioética es regular el uso de técnicas para obtener un beneficio para la humanidad, respetando los derechos humanos y guiándose por principios éticos y morales establecidos, disminuyendo la cantidad de consecuencias no deseadas.

En la presente monografía primero se describirán los principales aspectos técnicos de CRISPR-Cas9, haciendo un recorrido de su trayectoria histórica y nombrando su aplicación en las distintas áreas del conocimiento. Luego, se analizarán las implicancias bioéticas de su uso, explicando conceptos claves y comparando la visión de distintos autores respecto a un tema tan controversial como lo es modificar la línea germinal humana.

Palabras clave: *CRISPR-Cas9, bioética, modificaciones genéticas.*

INTRODUCCIÓN

CRISPR, del acrónimo en inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas, es una tecnología que ha marcado un antes y un después en la historia del conocimiento biológico y que en la actualidad se utiliza en miles de laboratorios en todo el mundo. Es una herramienta que permite la edición del genoma con extrema precisión, simpleza y versatilidad, pudiendo ser utilizado por cualquier persona con conocimientos básicos de técnicas en genética.

Estas características permitieron a Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna ganar en conjunto el Premio Nobel de Química durante el 2020, convirtiéndose en dos de las siete mujeres que han sido galardonadas con el premio desde su inauguración en el año 1905. La Real Academia Sueca de Ciencias informó en su comunicado de prensa que se les otorgó el premio por descubrir una de las herramientas más ingeniosas de la historia de la tecnología genética, que está provocando un impacto revolucionario en las ciencias de la vida, dado que permite cambiar el genoma humano en el transcurso de unas pocas semanas (Premio Nobel, 2020).

Su descubrimiento, como la mayoría de las innovaciones, fue inesperado. Durante el estudio sobre la bacteria *Streptococcus pyogenes* Emmanuelle Charpentier descubrió una molécula desconocida que llamó tracrRNA. Su investigación demostró que dicha molécula es parte de un sistema inmunológico adaptativo utilizado por microbios para defenderse de los virus invasores mediante registro y focalización de sus secuencias de DNA (Lander, 2016). Dicho RNA es codificado cerca de un gen relacionado con la proteína Cas, la cual actúa como una especie de tijeras genéticas. Charpentier publicó su descubrimiento en 2011, mismo año que comenzó a trabajar junto a Jennifer Doudna, logrando aislar y recrear en un tubo de ensayo el sistema CRISPR durante el año 2012. Ambas investigadoras lograron simplificar sus componentes para facilitar su aplicación y de esta forma demostrar que es una herramienta que se puede controlar para modificar cualquier molécula de DNA.

En la actualidad su uso ha aumentado exponencialmente, con dos clases identificadas de tijeras genéticas con distintos tipos y subtipos muy variados entre sí, donde la mayoría suele dirigirse al DNA, sin embargo, uno de dichos sistemas es capaz de dirigirse al RNA. Estos sistemas se han adaptado para transformarse en una técnica simple y confiable para la edición y análisis del genoma de todo tipo de organismos. Dentro de esta gran variedad de mecanismos, los sistemas de tipo II, denominado comúnmente CRISPR-Cas9 por requerir una única proteína Cas, de tipo Cas9 y dos pequeños RNA corresponde al sistema más adecuado para desarrollar aplicaciones biotecnológicas, principalmente por dos razones, en palabras de Charpentier y Marraffini (2014), Cas9 logra una escisión de DNA muy eficiente, en comparación con los demás sistemas, por requerir un conjunto mínimo de componentes, lo que facilita la optimización del sistema en organismo heterólogos.

De esta forma, su real importancia radica en la amplia gama de aplicaciones, que no se limitan solo al ámbito de la medicina, donde además de corregir genes alterados, puede utilizarse con otros fines en la agricultura, la ganadería, el cuidado del medio ambiente y otras aplicaciones más extravagantes, como por ejemplo la producción de animales complejos (Gómez-Tatay, 2019).

A raíz del enorme poder de esta herramienta genética surgen, sin embargo, una serie de preguntas: ¿Cuáles son los problemas que enfrenta la bioética frente a las distintas aplicaciones de CRISPR? ¿Debe quedar solo en manos de los científicos? ¿Existe algún ente regulador? ¿Se requiere o no la presencia de dicho regulador? ¿Es correcto utilizar dicha herramienta en todos los casos?

Estas preguntas han generado un arduo debate internacional, tanto entre científicos como entre filósofos. La actual discusión es de suma importancia para garantizar un desarrollo seguro y acorde con el respeto a la dignidad humana, ya que es una herramienta que nos da la posibilidad de reescribir el libro de la vida. No obstante, es imposible evaluar las consecuencias de ello en el presente. Es por esto que el objetivo del presente trabajo es analizar posibles respuestas respecto a dicha problemática,

específicamente cuando se busca modificar la línea germinal humana, en base al conocimiento científico y filosófico que existe sobre esta tecnología revolucionaria. Para ello se contextualizará su origen, se describirá su funcionamiento y áreas en las que puede ser utilizada esta herramienta para darle sustento a la discusión bioética entre los aspectos positivos y negativos de su implementación dentro de la ciencia, que en muchos sentidos, otorga un beneficio a la humanidad.

¿EN QUÉ CONSISTE CRISPR-CAS9?

1. Aspectos técnicos

Las bacterias y arqueas durante millones de años han desarrollado estrategias de defensa frente a ácidos nucleicos extraños, como por ejemplo genomas virales o plásmidos (Hryhorowicz et al. 2017), debido a que su DNA no se encuentra protegido en un núcleo celular, sino que está libre en el citoplasma. Entre estos mecanismos de protección destaca la absorción de fagos, bloqueo de la inyección de fagos, infección abortiva de fagos, y sistemas de modificación y restricción.

Con el descubrimiento del sistema inmunológico adaptativo denominado CRISPR y sus proteínas asociadas Cas se amplió el espectro de sistemas de defensas conocidos. El sistema de CRISPR está presente en el 40% de las especies bacterianas y el 90% de las arqueas estudiadas (Mojica et al. 2000). Por el contrario, actualmente no se han encontrado secuencias CRISPR en ningún genoma eucariota (Ishino et al. 2018). Corresponde, en palabras simples a un mecanismo de resistencia altamente adaptativo y hereditario que incorpora secuencias cortas de virus y otros elementos genéticos móviles en el *locus* CRISPR del hospedador, para ser transcritos y procesados en pequeños RNA que posteriormente guiarán la destrucción de los ácidos nucleicos invasores (Charpentier y Marraffini, 2014). Cabe destacar que el enfoque de esta monografía será describir el sistema tipo II, por ser el más utilizado para edición genética debido a su simpleza, en comparación a los sistemas CRISPR-Cas de tipo I y III que son bastantes complejos (Hryhorowicz et al. 2017).

El *locus* donde se encuentran codificados los elementos del sistema CRISPR/Cas cuenta con una región promotora, encargado de guiar la transcripción de todos los elementos (Chávez, 2018). Luego, se encuentra la matriz CRISPR que se compone de cuatro genes que codifican las proteínas Cas9, Cas1, Cas2 y Cns2, además del crRNA transcodificado (tracrRNA), como se muestra en la **figura 1**. Dicha matriz contiene regiones repetidas, separadas por regiones espaciadoras, que son derivadas de los elementos genéticos invasores (Lander, 2016). Los espaciadores codifican pequeñas moléculas de RNA, denominados RNA CRISPR o crRNA, las cuales guían a la proteína Cas al sitio blanco

(Chávez, 2018). Específicamente, el gen Cas9 codifica una nucleasa que confiere inmunidad al cortar el DNA invasor, el cual coincide con los espaciadores presentes. Por otro lado, los genes Cas1, Cas2 y Cns2 codifican proteínas que permiten la adquisición de nuevos espaciadores a partir del DNA invasor (Lander, 2016).

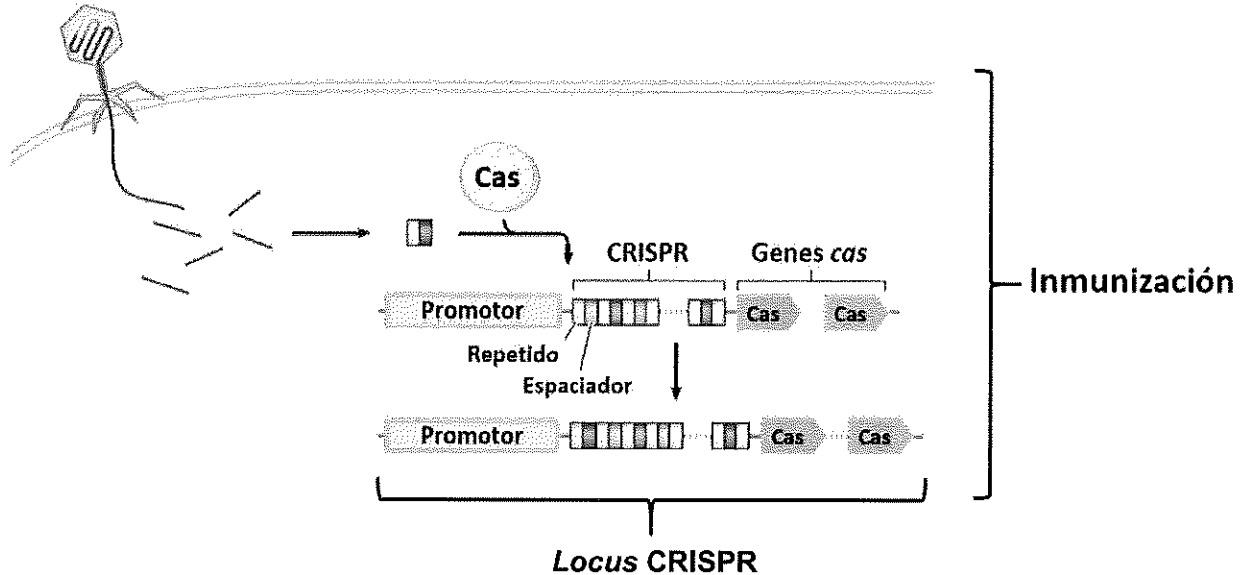


Figura 1. Matriz CRISPR. Se indican las regiones repetidas (sin color), separadas por regiones espaciadores representadas por variados colores, los que provienen del DNA invasor. Adaptado de Chávez 2018.

El mecanismo mediante el cual el sistema CRISPR/Cas codifica el sistema inmune adaptativo de estos microorganismos se puede dividir en tres etapas (Charpentier y Marraffini, 2014), representadas en la **figura 2**, que corresponden a:

I. Etapa de adaptación.

Luego de la infección por un DNA exógeno, proveniente de un virus o plásmido, la proteína Cas reconoce la molécula extraña, ya que en un primer momento reconoce el Motivo Adyacente al Protoespaciador (PAM), y promueve la incorporación de una pequeña región del genoma invasor en la matriz CRISPR (Chávez, 2018). Después de la duplicación de la repetición en el extremo 5' de la matriz CRISPR, el complejo de adaptación inserta dicho DNA en la matriz de forma que se transforma en un nuevo espaciador (Makarova et al. 2020).

II. Etapa de expresión.

Corresponde a la biogénesis de crRNA, dicho en otras palabras, la matriz de los espaciadores repetidos se transcriben como un crRNA maduro, el cual posteriormente actuará como un espaciador que guiará a la proteína Cas para que ésta reconozca el elemento genético invasor (Charpentier y Marraffini, 2014). En definitiva, la matriz de esta herramienta va generando un registro y memoria de los invasores que atacan a los organismos procariontes.

III. Etapa de interferencia.

Los pequeños trozos de crRNA anteriormente formados actúan como guías para dirigir al complejo de ribonucleoproteína Cas, tanto de Cas1 como de Cas2, hacia las células diana afín del genoma viral o plasmídial. El resultado es la destrucción del genoma invasor protegiendo a la célula infectada (Charpentier y Marraffini, 2014). Además, los dominios conservados de Cas son cruciales para su actividad (Chávez, 2018).

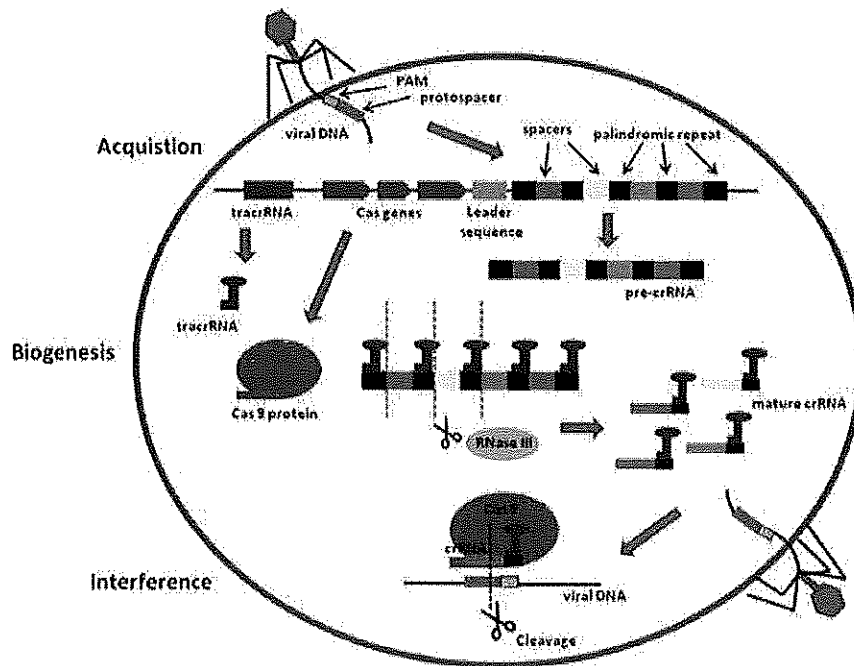


Figura 2. Tres etapas del mecanismo del sistema CRISPR. En la parte superior se observa la etapa de adaptación. En el centro, la etapa de expresión o biogénesis. En la parte inferior se muestra la etapa de interferencia. Adaptado de Hryhorowicz et al. 2016.

El dominio de helicasa (HNH) abre la doble hélice del DNA, mientras que el dominio de nucleasa (RuvC) corta el DNA en la región definida por crRNA (Sapranauskas et al. 2011), de forma que escinde e inactiva la hebra complementaria de DNA exógeno y la hebra no complementaria, respectivamente. De esta forma, se genera un quiebre de doble hebra conocida como DSB por su siglas en inglés *Double Strand Break* (Hryhorowicz et al. 2017; Makarova et al. 2020).

Ahora bien, como se nombró anteriormente, es necesario un sitio adicional de reconocimiento de la secuencia invasora, por parte de una secuencia corta de DNA denominada como PAM, por sus siglas *Protospacer Adjacent Motif*, Motivo Adyacente al Protoespaciador. Está compuesta por 2 a 6 pares de bases ubicadas inmediatamente después de la secuencia de DNA que codifica Cas9. Se cree que PAM es indispensable para evitar la autoinmunidad, especialmente en la etapa de interferencia puesto que sin este elemento de reconocimiento adicional, los crRNA reconocerían su propio gen codificante y la nucleasa podría generar cortes en su propio genoma (Chávez, 2018). Es preciso mencionar que dichas secuencias del elemento PAM son únicas para cada organismo, dado que la selección de espaciadores almacenados depende de dicho elemento, según la especie de proteína Cas9 con la que cuentan (Hryhorowicz et al. 2017).

El mecanismo empleado por el sistema CRISPR/Cas9 también requiere de la maduración previa de los crRNA para que otorguen correctamente inmunidad a los organismos, la cual se lleva a cabo cerca de la matriz de CRISPR. Para esto se forma una molécula híbrida de RNA y proteína entre el crRNA y la proteína Cas (Chávez, 2018). En primer lugar, se produce una pequeña molécula de crRNA con una región complementaria a la secuencia repetida del *locus* CRISPR, denominado tracrRNA. La proteína Cas se une a dicha secuencia, gracias a las enzimas presentes, formando un complejo que se aparea con las secuencias repetidas precursoras del crRNA. De esta manera, se forma un RNA de doble hebra (dsRNA) que posteriormente va a ser cortado por la enzima RNasa III, generando una molécula madura que contiene a la proteína Cas junto con los tracrRNA y el crRNA. El procedimiento descrito se resume en la **figura 3**. (Chávez, 2018).

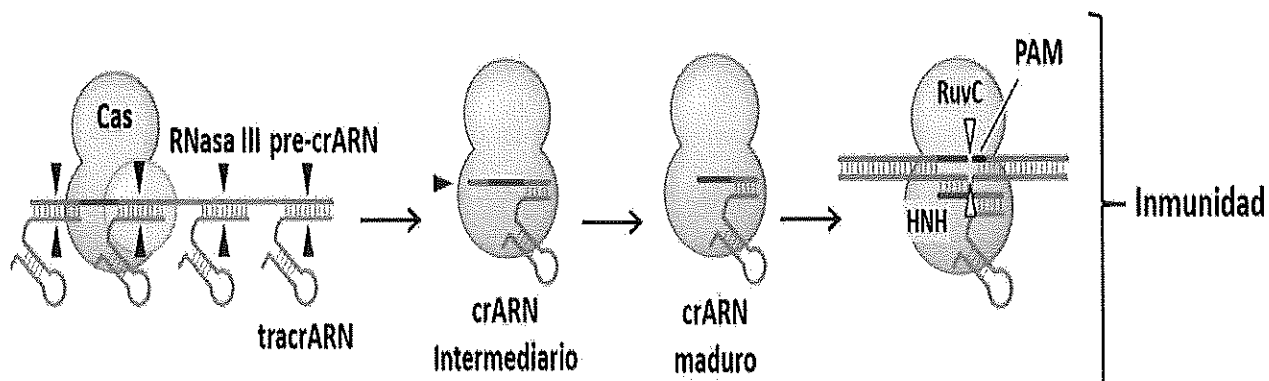


Figura 3. Maduración de crRNA. La molécula de crRNA posee una región complementaria a la matriz CRISPR, llamada tracrRNA, a la cual se unen proteínas Cas formando un complejo de doble hebra, el cual va a ser cortado para completar la maduración del crRNA. Adaptado de Chávez 2018.

Todos los elementos del sistema CRISPR/Cas se expresan de manera consecutiva, de forma de estar preparados en caso que ocurra una infección. En resumen, cuando una bacteria es infectada por un DNA invasor, el complejo formado por tracrRNA, crRNA y Cas escanea dicha molécula en busca de elementos de reconocimiento. Una vez localizada la secuencia, Cas corta el DNA exógeno para protegerse de la posible amenaza (Chávez, 2018).

2. Aspectos históricos de su descubrimiento

La historia de los avances de la ciencia permite estudiar el contexto que impulsa dicho progreso, la planificación, la curiosidad y la aplicación práctica llevada a cabo por varios científicos y científicas (Lander, 2016). Debido a esto es de suma importancia conocer la historia aun en desarrollo detrás de CRISPR, la cual permite que esta poderosa herramienta hoy en día se pueda utilizar en todo el mundo.

La historia comienza en un laboratorio de microbiología en Japón en el año 1987, donde un grupo de científicos, entre los cuales destaca Y. Ishino, describieron por primera vez a CRISPR como “una serie de repeticiones directas cortas intercaladas con secuencias cortas presentes en el genoma de *Escherichia coli*” (Doudna y Charpentier, 2014). Debido

a la tecnología de la época esta primera descripción fue sin muchas especificaciones. Casi en paralelo, en 1989 el español Francisco Mojica quien trabajaba en la arquea *Haloferax mediterranei*, las cuales presentan una tolerancia extrema a la sal, notó que dicho componente afectaba a las enzimas de restricción que cortaban su genoma (Lander, 2016). Mojica comenzó a caracterizar los fragmentos alterados, encontrando en uno de ellos una secuencia repetida casi perfecta que no se parecía a ninguna familia de repeticiones conocida anteriormente, dedicando los siguientes años de su carrera a su estudio (Lander, 2016). Cabe destacar que la secuencia descubierta por Mojica es de una estructura similar, pero de una secuencia distinta (y única) respecto a la descrita por los científicos japoneses.

Debido a esto, Mojica y su equipo fueron los primeros en darse cuenta que la presencia de estructuras similares en microorganismos tan distantes debía ser una función importante en procariontes (Lander, 2016). Denominó su descubrimiento como SRSRs, por sus siglas en inglés *Short Regularly Spaced Repeats* o repeticiones cortas espaciadas regularmente, nombre que posteriormente se cambió a CRISPR por sugerencia propia, siendo aceptado por gran parte de la comunidad científica para evitar una mayor confusión debido a los diferentes nombres que se utilizaron inicialmente por parte de varios grupos de científicos (Ishino et al. 2018).

Llegada la década del 2000, Mojica ya había observado el *locus* CRISPR en 20 microorganismos diferentes, gracias a la invención de máquinas de secuenciación automatizada y el desarrollo de procedimientos eficientes para secuenciar el DNA durante la década de los noventa (Ishino et al. 2018). Dos años más tarde, diversos investigadores duplicaron dicho número y comenzaron a catalogar las características más importantes de los *loci*, incluyendo a los genes cercanos específicos presumiblemente asociados a las funciones de CRISPR (Lander, 2016).

A pesar de estos avances, se desconocía la verdadera función del sistema, surgiendo distintas hipótesis relacionadas principalmente con la reparación del DNA o la regulación génica (Doudna y Charpentier, 2014). En el año 2005 surgió una idea clave al descubrir

que muchas de esas secuencias espaciadoras derivan de plásmidos y virus (Doudna y Charpentier, 2014). Además, en conjunto con el descubrimiento que el *locus* se transcribe y la observación de que los genes Cas codifican proteínas con dominios putativos de nucleasa y helicasa, se propuso que CRISPR-Cas es un sistema de defensa adaptativo que utiliza RNA como memoria de invasores pasados.

Durante el 2007, experimentos con la bacteria *Streptococcus thermophilus* otorgaron la primera evidencia experimental de la inmunidad adaptativa por parte de CRISPR-Cas. La inserción de la secuencia de un fago en la región espaciadora del CRISPR de *S. thermophilus* hizo que la cepa fuera resistente al fago correspondiente. La resistencia desapareció al eliminar la secuencia específica del protoespaciador del genoma fágico (Ishino et al. 2018). Este hallazgo permitió que la industria farmacológica utilizara la inmunización contra fagos como una primera aplicación de esta herramienta con fines terapéuticos (Gupta et al. 2019). Un año más tarde, el grupo de van der Oost's demostró que los crRNA actúan como guías en un complejo de proteínas Cas, para impedir la proliferación de virus en *E.coli* (Doudna y Charpentier, 2014; Ishino et al. 2018). El mismo año se informó también de la actividad dirigida al DNA del sistema CRISPR-Cas en el patógeno *Staphylococcus epidermis* (Gupta et al. 2019). Estudios posteriores demostraron que en entornos naturales los virus son capaces de reconocer a sus hospederos bacterianos o arqueales examinando los espaciadores de CRISPR, demostrando así que los virus evolucionan constantemente para evitar ser afectados por este sistema inmune (Doudna y Charpentier, 2014).

Mediante análisis bioinformáticos se identificó a Cas9 como una proteína multifuncional con dos dominios putativos de nucleasa, la helicasa HNH y la nucleasa RuvC, los cuales interfieren en la transformación de los plásmidos (Doudna y Charpentier, 2014). El año 2010 se demostró que dicha proteína podría ser la responsable del corte de ambas hebras del DNA en plásmidos y fagos invasores (Gupta et al. 2019). Un año más tarde se informaba que tracrRNA se codifica río arriba del *locus* de CRISPR de tipo II en *Streptococcus pyogenes*, siendo esencial para la maduración del crRNA por parte de la ribonucleasa III y Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014). Luego, durante el año 2012 se

demonstró que la proteína presente en la *S. pyogenes* es una endonucleasa de DNA guiada por los RNAs tracrRNA y crRNA (Doudna y Charpentier, 2014).

Durante el mismo año, se diseñó el complejo tracrRNA y crRNA como una única guía denominada sgRNA, que se caracteriza por contar con una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' que determina el sitio diana del DNA mediante el apareamiento de bases, y que cuenta con una estructura de doble hebra en el lado 3' de la secuencia que se une a Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014), como se observa en la **figura 3** de la sección anterior. Esto permitió crear un sistema simple de dos componentes, en el cual se puede modificar la secuencia guía del sgRNA, es decir, la secuencia de 20 nucleótidos, de forma de programar CRISPR-Cas9 para dirigirlo a cualquier DNA de interés, el cual debe ser adyacente a un PAM. Por consiguiente, el año 2013 se publicaron dos artículos donde se aplicó el sistema CRISPR-Cas para editar por primera vez el genoma en neuronas humanas y células renales de ratón (Ishino et al. 2018; Gupta et al. 2019). Finalmente, en 2014 dos grupos independientes lograron realizar un *screening* funcional de genes (Gupta et al. 2019).

Gracias a esta adaptación, el sistema CRISPR-Cas9 utilizado por *S. pyogenes* fue conocido rápidamente y utilizado por la comunidad científica, dado que permite editar o modificar específicamente el genoma de una amplia gama de células y organismos (Charpentier y Marraffini, 2014), en comparación con herramientas anteriores, como ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*) y TALEN (*Transcription Activator Like Effector Nucleases*). Estas últimas requieren una modificación mediante ingeniería de proteínas para modificar cada sitio del DNA diana, lo que implica una mayor inversión, requiere de varios meses de trabajo y cuenta con una eficacia escasa o moderada (Gupta et al. 2019).

3. CRISPR como herramienta

El sistema CRISPR-Cas de tipo II se ha utilizado rápida y ampliamente para modificar el genoma en variados tipos de células y organismos, desde ratones y monos hasta células T humanas y células madre, así como plantas, insectos, bacterias y hongos (Wright et al. 2016).

Respecto al área de la investigación básica, es un sistema eficiente para la ingeniería del genoma de animales, donde los plásmidos que expresan Cas9 y el sgRNA diseñado pueden introducirse en las células mediante transfección y usarse en la transferencia nuclear de células somáticas (Hryhorowicz et al. 2017). Por otro lado, en esta área, las herramientas que permiten modificar el genoma con un alto rendimiento son útiles para la reproducción de cepas económicamente valiosas, donde destaca el sistema CRISPR por su rápida adaptación para la edición del genoma de células eucariontes (Ishino et al. 2018). En bacterias esta herramienta no fue tan revolucionaria dado que existen otros métodos, como por ejemplo la recombinación homóloga (HR).

Es un área que está en constante desarrollo, debido a que surgen y se diversifican los conjuntos de herramientas de DNA basados en CRISPR-Cas para la edición del genoma, silenciar genes y el cribado de todo el genoma para el estudio de bacterias y arqueas (Doudna y Charpentier, 2014; Ishino et al. 2018). La capacidad de Cas9 para unirse al DNA en sitios definidos por el RNA guía y la PAM permite aplicaciones más allá de la modificación permanente del DNA. Específicamente, una versión catalíticamente desactivada de Cas9, denominada dCas9, se ha utilizado para regular genes dirigidos a escala del todo el genoma (Doudna y Charpentier, 2014). Particularmente, durante el año 2016, un grupo de científicos desarrolló una técnica para editar el genoma mediante CRISPR-Cas y recombinación heteróloga utilizando plantillas de DNA lineales monocatenarias o bicatenarias aplicadas con éxito en *E. coli*, esto además en forma reversible (Ishino et al. 2018).

Esta herramienta también es útil para llevar a cabo experimentos de biología molecular, puesto que puede unirse a secuencias de DNA sin escindirlos. Esto puede ser aplicable para identificar una posición a estudiar u obtener imágenes de *loci* específicos en células vivas, mediante la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) con dCas9, que se une a la secuencia diana en función del sgRNA optimizado estructuralmente (Doudna y Charpentier, 2014; Ishino et al. 2018). Esta forma de obtener imágenes potencialmente podría mejorar las tecnologías actuales para estudiar las dinámicas conformacionales de

los cromosomas nativos. Asimismo, se puede controlar la expresión génica uniendo dCas9 a la región promotora o al marco de lectura abierto de un gen (Doudna y Charpentier, 2014). Definitivamente las posibilidades utilizando dCas9 son infinitas y el trabajo futuro podrá explotar dichas variaciones de las tecnologías (Charpentier y Marraffini, 2014).

Por otro lado, en el área de la biomedicina, el sistema CRISPR se puede utilizar como agente antimicrobiano al escindir de manera selectiva el genoma de patógenos de interés, por lo tanto, se espera que sea una opción para el control de bacterias resistentes a antibióticos (Ishino et al. 2018). Además, a diferencia de los antimicrobianos convencionales, esta herramienta puede programarse de forma específica para que actúe únicamente en un tipo de población bacteriana, quedando intacta otras poblaciones del cuerpo (Chávez, 2018). Sin embargo, surge un impedimento técnico respecto a los métodos de administración a las personas, los cuales deben superarse para usarlo como agente terapéutico.

La aplicación de CRISPR en biomedicina es válida sobre todo a la creación de medicamentos para tratar enfermedades genéticas. CRISPR-Cas es capaz de reemplazar un gen mutado endógeno por una copia correcta del gen y en la mayoría de los casos con una sola dosis. Para esto, se suelen utilizar células madre y células progenitoras hematopoyéticas (HSPC) basadas en esta herramienta (Nidhi et al. 2021). Es debido a esta dificultad que los medicamentos más caros en el mundo sean aquellos que implementan la terapia génica, como por ejemplo el Zolgensma utilizado como único tratamiento para la Atrofia Muscular Espinal (AME) o Luxturna que logra curar la distrofia retiniana. Otra aplicación de esta herramienta es para controlar la infección latente provocada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), ya que puede destruir los provirus del VIH, modificando el genoma de las células T y células T CD4+ primarias para hacerlas resistentes (Nidhi et al. 2021). Igualmente es capaz de detectar la secuencia específica del VIH-1.

Asistido por CRISPR-Cas, también es posible detectar la secuencia del SARS-CoV-2, causante de la pandemia mundial de COVID-19. Un ensayo dual “todo en uno”, denominado AIOD-CRISPR, utiliza una pareja de crRNA para detectar ácidos nucleicos de este mortal virus (Nidhi et al. 2021). Asimismo, otro grupo de científicos actualmente se encuentran desarrollando una herramienta de diagnóstico basada en CRISPR de alta sensibilidad para detectar las varias cepas genéticas del SARS-CoV, la cual promete un tiempo menor de ejecución y una mayor efectividad que la RT-PCR (Nidhi et al. 2021).

De igual forma, CRISPR-Cas9 puede ir más allá de la investigación o medicina, pudiéndose implementar incluso en el área de la agricultura. La Reacción en Cadena Mutagénica (MCR) basada en esta herramienta es un ejemplo de ello. Dicho sistema permite que una mutación en un cromosoma se copie así misma, tanto en células somáticas como germinales, de forma que todas las crías hereden el cambio (Hryhorowicz et al. 2017). La MCR podría utilizarse para eliminar enfermedades como la malaria o la fiebre amarilla, al mismo tiempo que se podría alterar algunas especies de insectos para evitar plagas y así prevenir la resistencia a pesticidas y herbicidas en las plantaciones (Hryhorowicz et al. 2017).

La ingeniería de cultivos se encuentra en un alza exponencial debido a la actual escasez de alimentos, destacando que dichos cultivos no son considerados organismo genéticamente modificados (Wright et al. 2016). Las productoras agrícolas pueden combinar el fitomejoramiento tradicional con técnicas innovadoras como el fitomejoramiento molecular o la edición de genes específicos. La edición selectiva del genoma actualmente ha aumentado la productividad en cultivos de arroz y trigo, aumentando su tamaño, el peso o la extensión del tallo (Nidhi et al. 2021). También, se puede utilizar esta herramienta con el objetivo de reducir los niveles de glicoalcaloides, el cual es un esteroide tóxico para el ser humano, de forma hacer los cultivos comercialmente más atractivos, mejorando el color y la vida útil de frutas y verduras (Nidhi et al. 2021).

En definitiva, haciendo un resumen de lo mostrado en este capítulo, CRISPR-Cas9 es una herramienta única, de gran precisión y muy eficiente, capaz de editar una gran cantidad de genes, los cuales cuentan con funciones y rasgos importantes para el mejoramiento de la agricultura, la ingeniería biomédica o la investigación básica. Sin embargo, los campos de aplicación de esta tecnología parecen ser ilimitados, siendo imposible nombrarlos todos, lo cual significa una gran oportunidad para mejorar la calidad de vida de toda la humanidad si es utilizada en forma apropiada.

IMPLICANCIAS ÉTICAS DE SUS DISTINTAS APLICACIONES

1. ¿Qué es la bioética?

El término bioética es relativamente reciente, acuñado durante la segunda mitad del siglo XX, y significa ética de la vida o ética de la biología, debido a que está compuesta del griego *Bios*, vida y *Ethos*, ética (Molina, 2011). Sin embargo, su definición es mucho más compleja y cuenta con varias perspectivas según el autor o disciplina involucrada, siendo imposible llegar a un consenso para obtener una única explicación. Pese a ello, se pueden distinguir dos grandes enfoques respecto a este término. El primero ubica a la bioética dentro de la filosofía práctica, siendo un tipo de ética aplicada que implica la interacción entre personas y sistemas biológicos (Osorio, 2005). Por otro lado, el segundo enfoque se basa en la definición publicada durante los años 70 por el bioquímico Van Rensselaer Potter, la cual indica que es una disciplina intelectual e interdisciplinaria cuyo objeto de estudio es que el problema de la supervivencia de la humanidad actúe como puente entre la ética clásica y las ciencias de la vida (Osorio, 2005 y Molina, 2011).

La bioética se encarga de afrontar las realidades por las que pasa la ciencia, la investigación y el desarrollo, sobre todo hoy en día que es un tiempo de rápidos avances en todas las áreas del conocimiento científico. Esto bajo una perspectiva que busca evitar la deshumanización y el deterioro de la vida en sí (Molina, 2011). Debido a que se caracteriza por ser multidisciplinaria e interdisciplinaria, su objetivo es aclarar y en lo posible resolver preguntas que surgen durante la investigación y el desarrollo biomédico y biotecnológico, dentro de sociedades que están en constante evolución.

El libro *Encyclopedia of Bioethics* fue publicado en el año 1978 con el objetivo de presentar de manera concisa y completa el amplio conocimiento que se tenía hasta el momento sobre los aspectos éticos. En este texto se define la bioética, bajo una corriente principialista, como “el estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de las ciencias de la vida y de la salud, analizados a la luz de los valores y principios morales” (Molina, p.112, 2011). La finalidad de esta implica elaborar lineamientos éticos fundados en los valores y derechos humanos, respetando toda creencia religiosa, y teniendo como fundamento lo racional y la metodología científica. Dichos lineamientos deben poder ser

aplicados, y estar sujetos a cambios según los actuales y futuros códigos deontológicos profesionales (Molina, 2011).

El concepto de principlismo nombrado en el párrafo anterior hace alusión al modo de referirse a aquellas teorías que se estructuran alrededor de una pluralidad de principios de obligación, acuñado por los filósofos Beauchamp y Childress (Molina, 2011). Dichos autores formularon cuatro principios para orientar la bioética, los cuales se caracterizan por ser *prima facie*, es decir, se deben seguir siempre y cuando no entre en conflicto con otro de igual rango; y no tener jerarquías en su aplicación, la cual depende de las circunstancias y consecuencias de la situación en estudio (Molina, 2011). El principlismo destaca por considerar a los sujetos capaces de tomar decisiones, reconociendo la dignidad humana. Dichos principios son (Molina, 2011):

1. Respeto a la autonomía: es la necesidad de respetar la capacidad de las personas autónomas de tomar decisiones. Considera la regulación personal, sin interferencias externas y limitaciones que le impidan tomar una decisión.
2. No maleficencia: obligación de no causar daño o hacer mal intencionadamente, evitándolo o rechazándolo. Hay que promover el bien, por sobre la maleficencia.
3. Beneficencia: realizar un análisis respecto al perjuicio-beneficio y costo-beneficio. Es más que solo no causar daño, sino que es contribuir con el bienestar y ayudar a las personas.
4. Justicia: es garantizar la distribución justa de los beneficios, riesgos y costos. La justicia distributiva busca solidaridad social, mediante la distribución igual, equitativa y apropiada de bienes materiales, derechos y responsabilidades.

Con el tiempo se han agregado otros principios, como por ejemplo la dignidad del ser humano, la sacralidad de la vida o la seguridad de esta. En paralelo a los principios nombrados anteriormente, en el año 1975 se llevó a cabo la Conferencia de Asilomar en California sobre el DNA recombinante, organizada por Paul Berg y Maxine Singer, para debatir riesgos biológicos y la regulación de la biotecnología, luego de detener los estudios que utilizaban la tecnología del DNA recombinante con la intención de primero

establecer pautas consensuadas para trabajar de manera segura la manipulación genética. Esto demostró la capacidad de autorregulación de los científicos. Se llegó al acuerdo de prohibir clonar genes de patógenos o virus oncogénicos y se exigió el uso de bacterias defectuosas que no puedan sobrevivir fuera del laboratorio en casos de escape accidental. Esto sigue siendo un tema trascendental hasta el día de hoy que estamos viviendo una pandemia y algunos especulan que el SARS-CoV-2 escapó de un laboratorio de Wuhan, aunque todavía el origen de este potente virus no está definido.

Años más tarde, específicamente en 1990, se creó ELSI, de las siglas *Ethical, Legal and Social Implications Research Program* o en español Programa de Investigación de las Implicancias Éticas, Legales y Sociales desarrollado por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano en Estados Unidos. Su intención es facilitar el diálogo para identificar posibles problemas futuros y solucionarlos antes de que ocurran. El programa ELSI tuvo un papel importante con todo lo relacionado al gran hito que significó el Proyecto Genoma Humano (PGH), el cual se inició en Estados Unidos en el año 1992.

Los objetivos del PGH eran preparar un mapa del genoma humano y secuenciar el DNA de los cromosomas de dicho genoma (Santos y Vargas, 2002). El PGH fue un proyecto ambicioso. El año 2000 presentó su primer borrador oficial con el 90% del genoma, siendo anunciado por el expresidente de Estados Unidos Bill Clinton, donde se suponía que la secuencia completa contaría con 30.000 a 35.000 genes. Además, facilitó el desarrollo de métodos computacionales eficientes que permitieron acelerar el proyecto. Esto significó un mayor poder curativo para la medicina, tanto predictiva como genómica (terapia somática). También, es un aporte para la industria farmacéutica, ya que se podrían elaborar fármacos según el genoma de cada persona lo que facilita el desarrollo de la medicina personalizada.

Aunque una de las principales promesas fue que permitiría realizar terapia genética, específicamente modificar la línea germinal, o crear nuevas formas de vida modificadas con genes humanos para obtener órganos utilizados en trasplantes. Estos aspectos provocaron discusiones bioéticas debido a las graves consecuencias sociales no

deseadas. A causa de esto en ELSI participan una gran variedad de especialistas de distintas áreas como genetistas, historiadores, abogados y sociólogos para llevar a cabo investigaciones y proyectos educativos, al mismo tiempo que analizan políticas y desarrollan recomendaciones programáticas.

Posteriormente, a finales de la década de los noventa se llevó a cabo la Convención para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano en materia de Aplicaciones de la Biología y la Medicina (1997), también llamada Convención de Oviedo, y la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO (1997). En ambos documentos se establece que el respeto a la dignidad humana está por encima de las aplicaciones que pueden generarse al respecto y restringen la modificación del genoma humano exclusivamente por razones terapéuticas como la prevención, diagnóstico de enfermedades o terapia; siempre y cuando no se pretenda modificar el genoma de la descendencia (Santillán-Doherty et al. 2020).

Además, al principlialismo se sumó la Conferencia general de la UNESCO, la cual aprobó durante el 2005 la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. En esa declaración se definieron 15 principios de la Bioética, que incluyen entre ellos la Dignidad y los Derechos Humanos; los beneficios y evitar los efectos nocivos; la autonomía y la responsabilidad individual; el consentimiento; la privacidad y confidencialidad; la no discriminación ni estigmatización; el respeto a la diversidad cultural; la solidaridad y la cooperación; la responsabilidad social y de salud; la división equitativa de los beneficios; el proteger a las generaciones futuras y al medio ambiente, la biosfera y la biodiversidad (Molina, 2011).

2. CRISPR y la bioética

Los seres humanos han aprendido a manipular las características genéticas y fenotípicas de seres vivos hace miles de años, a pesar de no saber el trasfondo génico de dichos cambios (Santillán-Doherty et al. 2020). La agricultura y la domesticación de especies son ejemplo de ello. Con el tiempo, los avances científicos han permitido comprender mejor estos fenómenos evolutivos. En ese sentido, la ingeniería genética consiste en

herramientas y técnicas que sirven para modificar el DNA, con la idea de obtener alteraciones funcionales principalmente. Un experimento que marcó un antes y un después dentro de esta área ocurrió en 1996 con la oveja Dolly, el primer mamífero clonado del mundo a partir de células especializadas, las cuales fueron extraídas de una glándula mamaria perteneciente a una oveja de 6 años de edad.

Debido al rápido crecimiento del uso de CRISPR alrededor del mundo existe una controversia de ideas dentro de la comunidad científica y toda la sociedad. Por un lado, algunos prometen resultados favorables, mientras que otros afirman que está en compromiso la vida en general. Incluso si el genoma se edita como se desea, aún desconocemos la compleja relación entre la información genética y los fenotipos biológicos, por lo tanto, es difícil evaluar las consecuencias de su uso debido a que no están claras y dependen del contexto (Brokowski y Adli, 2019). Es importante considerar que la viabilidad de dichas modificaciones está sujeta a una exhaustiva reflexión ética que debe justificar el “por qué”, el “para qué” y el “cuándo” de algo del que solo conocemos parcialmente el “cómo” (Santillán-Doherty et al. 2020). Hay que tener en cuenta que la humanidad es capaz de realizar muchas acciones, sin embargo, no es necesario que todas estas se lleven a cabo. Igualmente, aunque la tecnología de CRISPR-Cas9 no es inherentemente “buena” o “mala”, su aplicación en sí es cuestionable.

Más allá de la medicina, ciertas aplicaciones de CRISPR como la mejora en cultivos y ganado pueden tener un mayor impacto para la humanidad. Como se mencionó anteriormente, una posible aplicación de esta herramienta es para combatir la escasez de alimentos, lo que de por sí tiene un peso moral considerando el número de personas que no tienen acceso a suficiente alimento. Sin embargo, surgen otras preocupaciones éticas respecto a la accesibilidad y el valor de estos productos (Brokowski y Adli, 2019).

Otra aplicación de esta herramienta es la tecnología de genética dirigida, también denominada de impulso genético, la cual se define como una modificación genética diseñada para propagarse por toda la población a tasa más altas de lo normal de la

herencia. Esto proporciona una herramienta para eliminar enfermedades erradicando a los vectores de estas y a especies invasoras.

Un claro ejemplo de esto es *Aedes aegypti*, el mosquito que transmite el Dengue. Un grupo de investigadores desarrolló machos estériles editados genéticamente para prevenir la reproducción del vector y así reducir la propagación de la enfermedad; sin embargo, esto puede significar la extinción de especies enteras, lo que traería cambios ambientales impredecibles (Nidhi et al. 2021). Este método puede inducir, silenciar e incluso insertar un nuevo gen. Además puede ocurrir la copiar de dicha mutación en un cromosoma homólogo, lo que asegura que toda la descendencia contará con esta modificación. Esto significa un riesgo mayor, por lo mismo, hasta la fecha no se ha liberado a la naturaleza ningún organismo modificado de esta forma (Nidhi et al. 2021). Esto difiere de la Técnica del Insecto Estéril (TIE), la cual consiste en esterilizar insectos en masa por radiación para luego liberarlos en una zona delimitada y actualmente es utilizada alrededor del mundo por cuidar el medio ambiente, ya que los organismo se pueden adaptar evolutivamente a este modificación mientras que con la técnica de genética dirigida no pueden escapar de esta.

Es de suma importancia que los investigadores desarrollen nuevas formas de control, e inhibición para revertir, o incluso eliminar, sistemas de genética dirigida es caso de un evento inesperado. En definitiva, la discusión en torno a utilizar CRISPR debe centrarse en estudiar exhaustivamente los daños y garantías de los efectos de esta tecnología. Se deben realizar estudios en modelos de cultivo celular y posiblemente en modelos animales esperando resultados favorables que no alteren otros factores metabólicos (González-Ávila et al. 2021).

A causa de estos cuestionamientos que aún no tienen solución, actualmente muy pocos países están desarrollando posibles leyes que regulen el uso de técnicas de ingeniería genética como esta y la posterior solicitud de patente, que suele ser un trámite complicado. Específicamente en el caso de Chile, la ley N° 20.120 de septiembre de 2006 sobre la investigación en el ser humano indica resumidamente que la libertad para llevar

a cabo actividades de investigación en seres humanos tiene como límite el respecto de los derechos y libertades esenciales de la naturaleza humana; prohíbe la clonación de seres humanos; y autoriza la terapia génica solo en células somáticas. Quienes vayan en contra de esta ley serán sancionados con la suspensión por tres años del ejercicio profesional y con la prohibición absoluta de ejercer en territorio nacional en caso de reincidencia. Sin embargo, varios consideran que esta ley es ambigua, ya está obsoleta y no está actualizada con los avances tecnológicos de los últimos años. La legalidad no es garantía de ética.

Sumado a todo esto, existe la controversia sobre quien debería tener acceso a CRISPR, como ocurre con la mayoría de los nuevos avances tecnológicos. Se espera que las nuevas aplicaciones de esta herramienta sean rentables para los dueños de las patentes y que los precios de los productos desarrollados será elevado. Esto se transforma en un problema ético al momento que el financiamiento de estos proyectos fue con subvenciones de fondos gubernamentales, ya que probablemente solo una parte de la sociedad podrá tener acceso a ellos, siendo que los beneficios de CRISPR pueden salvar vidas (Brokowski y Adli, 2019). Se debe fomentar las leyes que vayan en contra de precios inalcanzables. En concreto, a medida que esta tecnología evoluciona, también lo harán las discusiones sobre los marcos éticos y legales sobre los usos de CRISPR.

3. ¿Es correcto cambiar el genoma humano?

La opinión se encuentra dividida en dos grandes grupos, los que rechazan esta herramienta por problemas éticos que implica la terapia germinal y los que opinan que puede tener un uso legítimo para evitar principalmente enfermedades genéticas. Dicha división existe respecto a la edición genética sobre la línea germinal, ya que actualmente existe un consenso a favor de su uso en células somáticas. Parece que la tendencia entre los científicos es aceptar la investigación sobre embriones, pero impedir la implantación en un útero, de hecho ya se han autorizado estudios de este tipo en China, Corea del Sur, Estados Unidos e Inglaterra. Específicamente en el caso de Chile, en la actualidad está completamente prohibido.

La modificación de células germinales genera una gran preocupación para la sociedad, sobre todo en ciertos sectores religiosos, políticos, científicos y comunitarios. Esto debido a que dichos cambios pueden ser heredados, es decir, las modificaciones integradas en el genoma humano se podrían distribuir y afectar a toda la población (Santillán-Doherty et al. 2020). Todo esto sin conocer a ciencia cierta los efectos que puedan tener, por lo tanto, se debe tener precauciones en la seguridad y efectos imprevistos. A pesar de esto, actualmente se están realizando cientos de estudios en este aspecto. Por este motivo y el impacto que podría significar CRISPR para las sociedades, es imprescindible realizar un análisis bioético. La mayoría de los autores aclaran que la modificación del genoma de células germinales, es decir, modificar gametos y embriones afecta los principios de básicos de la bioética (Santillán-Doherty et al. 2020) relativos a:

1. Autonomía: los herederos no pueden decidir sobre la modificación en su genoma. Debido a esto es importante realizar un consentimiento informado en toda intervención génica.
2. Beneficencia/ No maleficencia: preferir los potenciales beneficios frente a los riesgos que representa. Es inmoral ensayar en humanos técnicas que arriesgan la salud y calidad de vida del ser en gestación (Santos y Vargas, 2002).
3. Equidad: puede llevar a una distribución desigual de beneficios, riesgos o daños entre los distintos grupos de una sociedad.

Esto permite que científicos y éticos no puedan eludir los mandatos y prohibiciones de la ética invocando a la libertad de la ciencia y la investigación, ya que sus límites están en el valor del cuerpo, la vida, la autodeterminación y la dignidad de las personas (Bergel, 2002). En este sentido, no se encuentra en juego solo la dignidad e integridad de los individuos que pueden ser concebidos, sino que el propio destino de la especie humana. Existe una responsabilidad social que no puede ser eludida, ya que su labor trasciende su campo de actuación (Bergel, 2002).

A pesar de esto, algunos autores u organizaciones no consideran que estos argumentos sean sustentables en contra del uso de CRISPR. Según el Consejo de Ética Alemán

realizado en 2019, citado en Greely (2019), en el caso de enfermedades hereditarias monogénicas, es decir, aquellas que alteran solo un gen, y asumiendo la eficacia de la tecnología y la suficiente seguridad, no existen razones categóricas para prohibir la modificación de la línea germinal humana debido a la aplicación de conceptos éticos anteriormente nombrados, más bien, podrían permitir tales intervenciones por proteger la vida y la libertad. Sin embargo, destacan la importancia de proteger la dignidad humana.

Otros autores como Greely (2019), consideran que el concepto de línea germinal humana es complejo o incluso ni siquiera existe. Para él, cada persona tiene una línea germinal humana única o quizás pueda tener múltiples genomas germinales debido a una mutación, por ejemplo, en los precursores de los óvulos o espermatozoides. Además, dicho genoma tiene secuencias similares al de muchos animales y está en constante cambio debido a múltiples factores. Greely distingue entre las intervenciones que causan una modificación ya presente en humanos, y las que buscan una modificación nunca antes vista. En este último, caso como la línea germinal está en constante cambio, no sería poco ético ya que tal vez una persona ya cuenta con esa modificación “naturalmente”. Asimismo, considera que no son cambios irreversibles debido a que puede modificarse posteriormente en caso de un error, del mismo modo que nada asegura que pasará a la siguiente generación. Pone como ejemplo el uso de los celulares inteligentes, cuyos efectos sociales no fueron previstos y actualmente no se pueden revertir. En definitiva, considera que se debe cuestionar la seguridad, la equidad o mejoras al sistema CRISPR-Cas9, pero que no existen razones éticas para no utilizar esta nueva tecnología siempre que se cumpla con los límites bioéticos ya establecidos.

Debido a estas múltiples visiones, como consenso internacional se recomienda el uso de CRISPR exclusivamente en situaciones cuya única finalidad sea el tratamiento o prevención de una enfermedad o discapacidad, especialmente cuando no se cuenta con otra alternativa, bajo una estricta supervisión y siguiendo criterios específicos. Estos criterios se establecieron durante la Cumbre Internacional sobre la Edición Genética en Humanos realizada en diciembre del año 2015, la cual mostró también como las diferencias culturales influyen en dicha regulación, puesto que, por ejemplo para Estados

Unidos es un tema debatible si los embriones tienen derechos humanos o no, mientras que para China, pionera en la investigación genética, no es un tema de discutible debido a que, según el filósofo Confucio, el ser humano comienza a partir del nacimiento. Se llegó al acuerdo de evitar modificar la lineal germinal humana hasta resolver los problemas de seguridad y eficacia que significa el uso de CRISPR.

Cabe mencionar que la mayor parte de la comunidad científica está de acuerdo en rechazar el uso de la edición genética para usos no terapéuticos, como por ejemplo elegir el color de los ojos, en otras palabras, para el "mejoramiento" genético por no ser éticamente aceptable. Sin embargo, modificar la lineal germinal humana permitiría llevar a cabo ideales humanos éticamente legítimos, como por ejemplo para personas estériles o que sean portadoras de un gen cuya expresión no permita llevar una vida digna al ser que está por nacer (Santos y Vargas, 2002). Pero existen ciertas instancias que resultan más problemáticas éticamente hablando. El hecho que una persona elija la dotación genética de otro ser es una forma incorrecta de dominio sobre el destino del nuevo ser. Elegir las características físicas sería determinar su potencial y al mismo tiempo significaría una gran carga emocional para la persona saber qué enfermedades, entre otras características, tendrá a futuro.

Un claro ejemplo de que los lineamientos para el uso de esta herramienta aún no están claros, y los que ya existen actualmente no fueron respetados es el caso del científico He Jiankui, quien indicó en una cumbre durante el año 2018 haber editado genéticamente embriones humanos con la técnica CRISPR-Cas9. Su idea era inactivar el gen CCR5 que codifica para el co-receptor del virus VIH, la proteína necesaria para que el virus se introduzca en los linfocitos CD4 y los infecte (Santillán-Doherty et al. 2020). La edición se llevó a cabo por medio de una fertilización *in vitro* en que nacieron gemelas.

Esto violó tanto el Consenso internacional de la Cumbre de Edición Genética Humana, como las propias guías éticas que existen en China y en su propia universidad respecto a la investigación con embriones y su posterior transferencia intrauterina (Palacios, 2019). Todo esto lo realizó sin reportar estudios previos de edición con CRISPR utilizando

animales. Adicionalmente, el reporte respecto a mutaciones “*off-target*”, usuales utilizando esta técnica, no fue realizado y el consentimiento afirmado no es aceptable por no ser claro y un tanto engañoso, ya que ocultó información sobre los riesgos y la incertidumbre de los posible beneficios. A causa de todas estas irregularidades, las gemelas se deben considerar un experimento en sí mismas y el supuesto beneficio de esta manipulación genética solo puede ser confirmando mediante exposición a la infección con VIH, lo que es éticamente inaceptable (Santillán-Doherty et al. 2020). Igualmente, la justificación médica es inválida debido a que el bloqueo o ausencia no otorga inmunidad, simplemente hace al huésped no susceptible a la infección, por lo tanto, la idea de los padres de hacer inmune a sus hijas no se cumple y se debe considerar que actualmente existen otras técnicas establecidas y efectivas para generar hijos sin la infección.

Sin embargo, no corresponde generalizar un caso como el anterior respecto a toda la investigación científica. Simplemente es un caso que demuestra lo importante de reconocer aspecto bioéticos en investigaciones de este tipo y delimitar su uso según ciertos reglamentos, incluido los legales, ya que CRISPR-Cas9 corresponde a una herramienta muy prometedora con un alto potencial para eliminar, controlar o mitigar diversas enfermedades genéticas.

CONCLUSIONES

Hace tan solo 70 años aproximadamente se conoce el modelo de la estructura de doble hélice del DNA de Watson y Crick. En ese momento se veía lejano o incluso imposible todo el avance que se ha logrado en estas últimas décadas en el área de la genética. Sin embargo, la revolución génica que trajo consigo hace 20 años el Proyecto Genoma Humano, junto con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, hace posible que en la actualidad podamos utilizar el sistema CRISPR para modificar el genoma de una gran variedad de tipos celulares y organismos.

Los primeros estudios, llevados a cabo en distintas partes del mundo simplemente por curiosidad de los investigadores al observar una secuencia repetida, indicaban que CRISPR y las proteínas Cas están presente en el genoma de procariotas, constituyendo un eficiente sistema inmunitario. Posteriormente, el hecho de identificar Cas9 como un sistema enzimático estable capaz de simplificar la metodología, permite sacarle provecho a todo el potencial de esta herramienta (Ishino et al. 2018). De esta forma, CRISPR-Cas9 se puede considerar uno de los descubrimientos más importante de comienzos del siglo XXI y da la esperanza de curar enfermedades genéticas raras o encontrar terapias a enfermedades tan devastadoras como el cáncer, entre otras. También puede ayudar a contrarrestar la resistencia a antibióticos, que es un problema que ha aumentado durante los últimos años, o disminuir la propia virulencia de virus y bacterias. Por otro lado, puede traer grandes beneficios para la agricultura al permitir mejorar el contenido nutricional de los alimentos y utilizar una menor cantidad de pesticidas, lo que ayudaría a combatir el hambre mundial y la escasez de alimentos. El potencial tanto para adquirir conocimientos como para desarrollar tratamientos médicos parece casi infinito (Brokowski y Adli, 2019).

En definitiva, el propósito de CRISPR es ser un beneficio para la humanidad debido a que es un sistema eficiente, económico y fácil de usar, no obstante, su principal limitación es que no está exenta de riesgos potenciales. En particular, puede producir efectos fuera de la secuencia blanco de la célula huésped, especialmente en el caso de las células humanas adultas, debido a que el reconocimiento de la secuencia diana por parte del sgRNA podría no ser totalmente específico. Asimismo, puede ocurrir translocación

cromosómica de la secuencia blanco (Nidhi et al. 2021). La elección de secuencias específicas del genoma y la optimización de sgRNA y Cas9 puede reducir las mutaciones, lo que permite evitar alteraciones no deseadas tanto en el ecosistema como en los seres humanos. Otros científicos han optado por utilizar plásmidos, virus o ribonucleoproteínas para entregar CRISPR al huésped, sin embargo, este un proceso que conlleva otras limitaciones (Nidhi et al. 2021).

A pesar de sus limitaciones, el mal uso de esta herramienta genera preocupación en la sociedad y dentro de la comunidad científica, especialmente la idea de modificar la línea germinal humana. En la actualidad, la edición de células somáticas se encuentra regulada y es utilizada alrededor del mundo, sin embargo, modificar la línea germinal puede dar lugar a cambios genéticos heredables si la célula es utilizada para iniciar un embarazo (Doudna, 2020). Si bien la edición de la línea germinal cuenta con un uso generalizado en animales hace años, en seres humanos por consenso internacional solo se realizan experimentos con embriones *in vitro*, tanto viables como no, pero sin la posterior implantación en el útero. Al momento de redactar esta monografía no existen datos empíricos que sugieran que la experimentación con CRISPR significa un riesgo mayor. El ideal sería comparar su uso y riesgos con otras tecnologías potencialmente peligrosas en contextos cotidianos y médicos, como por ejemplo someterse a quimioterapia o evaluar estadísticas respecto a un individuo sano sin exposición a agentes mutagénicos (Brokowski y Adli, 2019).

La discusión de uso para modificar la línea germinal humana desafía la actual comprensión de los mecanismos de reparación del DNA, y debe considerar las posibles consecuencias tanto a corto como a largo plazo bajo los reglamentos y guías bioéticas impuestos hasta la fecha en cada laboratorio, país e internacionalmente. A pesar de ser una herramienta con múltiples usos y de forma efectiva, su uso inicialmente implica principios legales y bioéticos para proteger la dignidad humana, resguardar la integridad del paciente y el contenido de la información genética para evitar el mal uso de ésta (González-Ávila et al. 2021). Mientras tanto, los investigadores deben que considerar una posible solución a los riesgos a corto plazo e idealmente a largo plazo, al llevar a cabo

un experimento. En concreto, se deben analizar cuidadosamente todas estas aplicaciones de CRISPR-Cas9 para que sea manejada con cuidado, ya que es una técnica con la cual se pueden lograr grandes avances para la humanidad.

REFERENCIAS

- Bergel, S.D. (2002). Los derechos humanos: entre la bioética y la genética. *Acta Bioethica*, 8(2), 315-331. <https://doi.org/10.4067/S1726-569X2002000200011>
- Brokowski, C., & Adli, M. (2019). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*, 431(1), 88–101. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.044>
- Charpentier, E., & Marraffini, L. A. (2014). Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Current Opinion in Microbiology*, 19, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.07.001>
- Chávez, V. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *Revista Especializada en Ciencias Químico - Biológicas*, 21(2), 116-123. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5>
- Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 578(7794), 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
- Doudna J.A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096-1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Gómez-Tatay L. & Aznar, J. (2019). CRISPR-CAS9. El mayor avance en técnicas de edición genética que requiere una reflexión ética. *Cuadernos de Bioética*; 30(99): 171-185. <http://aebioetica.org/revistas/2019/30/99/171.pdf>
- González-Ávila, L. U., Vega-López, J. M., Pelcastre-Rodríguez, L. I., Cabrero-Martínez, O. A., Hernández-Cortez, C., & Castro-Escarpulli, G. (2021). The Challenge of CRISPR-Cas Toward Bioethics. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657981>

- Greely, H. T. (2019). Human Germline Genome Editing: An Assessment. *The CRISPR Journal*, 2(5), 253–265. <https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0038>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., 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*, 232, 116636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- 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*, 200(7), e00580 1-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- Lander, E. (2016). The heroes of CRISPR. *Cell*, 164, 18-28. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2815%2901705-5>
- Ley N° 20.120. Diario Oficial de la República de Chile. 22 de septiembre de 2006. <http://bcn.cl/1uv3k>
- Lüthy A. (2020). Premio Nobel de Química 2020 a la edición génica con tecnología CRISPR/Cas. *Revista de Medicina*, 80, 738–740. <http://www.medicinabuenaosaires.com/PMID/33254128.pdf>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyts, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W. & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas

- systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Molina, R. (2011). ¿Qué es la biótica y para qué sirve? Un intento de pedagogía callejera. *Revista Colombiana de Bioética*, 6(2), 110-117. <https://www.redalyc.org/pdf/1892/189222558007.pdf>
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR-Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3327. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
- Osorio, S. (2005). Van Rensselaer Potter: Una visión revolucionaria para la bioética. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 8, 1-24. <https://www.redalyc.org/pdf/1270/127020937003.pdf>
- Palacios Yabar, M. L. (2019). CRISPR/Cas9: Edición Genética vs. Bioética: Un análisis bioético de la técnica de edición de genes llamada CRISPR/Cas9. *Apuntes de Bioética*, 2(1), 5-18. <https://doi.org/10.35383/apuntes.v2i1.238>
- Santillán-Doherty, P., Grether-González, P., Medina-Arellano, M. J., Chan, S., Tapiabargüengoitia, R., Brena-Sesma, I., Fuente, R. C., Linares-Salgado, J., Mendoza-Cárdenas, H., Muñoz-Fernández, L., & Schiavon, R. (2020). Considerations of genetic engineering: regarding the birth of twins subjected to gene edition. *Gaceta Médica de México*, 156(1), 53–59. <https://doi.org/10.24875/GMM.19005182>

Santos y Vargas, L. (2002). Valuación bioética del proyecto "Genoma Humano". *Acta Bioethica*, 8(11), 111-123. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2002000100011>

Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 39(21), 9275-9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>

The Royal Swedish Academy of Sciences. (2020). The Nobel Prize in Chemistry. Disponible en <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/press-chemistryprize2020.pdf>

Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1-2), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>