



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Alumno: Jorge Romero Bravo

Tutores: Ana María Hernández Martínez

Curso académico: 2022-2023



Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Índice

Introducción	1
La herramienta CRISPR-Cas9	1
Implicaciones bioéticas	3
Líneas de trabajo de la bioética para CRISPR-Cas9.....	7
Antecedentes.....	9
Padres de la tecnología CRISPR	11
Objetivos.....	13
Objetivo principal	13
Objetivos secundarios.....	13
Metodología.....	14
Base de datos empleada	14
Búsqueda de las aportaciones de los autores claves.....	14
Búsqueda de las perspectivas bioéticas de la tecnología CRISPR	17
Resultados.....	20
Indicadores bibliométricos de los investigadores y de las revistas	20
Resultados de la búsqueda de autores claves	21
Resultados de la búsqueda de las perspectivas bioéticas de la tecnología CRISPR	29
Discusión	35
Aportaciones de los investigadores clave a la tecnología CRISPR	35
Aportaciones de Francisco Juan Martínez Mojica	35
Aportaciones de Jennifer Anne Doudna	36
Aportaciones de Emmanuelle Charpentier	40
Aportaciones de Feng Zhang	42
Aportaciones conjuntas Mojica-Charpentier y Doudna-Charpentier.....	46
Discusión bioética	48
Tecnología CRISPR-Cas en células somáticas.....	48
Tecnología CRISPR-Cas en línea germinal	52
Tecnología CRISPR-Cas combinado con la tecnología “gene drive”	58
Conclusiones	59
Revisión de autores claves	59
Revisión bioética.....	59
Líneas futuras.....	60
Bibliografía y Webgrafía.....	61

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Índice de figuras

Figura 1: Cas9 programado por una estructura doble ARNcr:ARNtracr- “En los sistemas CRISPR/Cas de tipo II, Cas9 se guía por una estructura de dos ARN formada al activar ARNtracr y dirige a ARNcr para escindir el ADN doble cadena específico del sitio”. (Fuente: Jinek et al., 2012).....	2
Figura 2: Cas9 programado por un ARN simple quimérico - “Un ARN quimérico generado al fusionar el extremo 3 'de ARNcr con el extremo 5' de ARNtracr”. (Fuente: Jinek et al., 2012)	2
Figura 3: Diagrama resumen de la guía práctica de ayuda en la toma de decisiones éticas con respecto a las intervenciones sobre el cuerpo humano. (Fuente: Marín Conde y Gómez-Tatay, 2021).....	19

Índice de tablas

Tabla 1: Indicadores bibliométricos de los autores seleccionados. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	20
Tabla 2: Principales indicadores bibliométricos de las revistas en las que se han publicado los artículos seleccionados. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	20
Tabla 3: Resultados de la búsqueda para el autor “Francisco Juan Martínez Mojica”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	22
Tabla 4: Resultados de la búsqueda para el autor “Jennifer Anne Doudna”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	24
Tabla 5: Resultados de la búsqueda para el autor “Emmanuelle Charpentier”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	26
Tabla 6: Resultados de la búsqueda para el autor “Feng Zhang”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	28
Tabla 7: Resultados de la búsqueda con ecuaciones parciales de las perspectivas bioéticas. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023).....	30
Tabla 8: Resultados de la búsqueda con ecuaciones finales de las perspectivas bioéticas. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	31
Tabla 9: Resultados de la búsqueda para la ecuación “CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023).....	31

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Tabla 10: Resultados de la búsqueda para la ecuación “CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	32
Tabla 11: Resultados de la búsqueda para la ecuación “CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)	33
Tabla 12: Resultados de la selección manual de artículos del Observatorio de Bioética. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Observatorio de Bioética – Instituto Ciencias de la Vida)	34

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Glosario de abreviaturas

AAV	Adeno-associated viruses
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARNcr/RNAcr	ARN CRISPR
ARNg/gRNA	Guide RNA
ARNtracr/tracr/RN	ARN CRISPR trans
Cas	CRISPR associated protein
Cas12	CRISPR associated protein 12
Cas9	CRISPR associated protein 9
Cpf1	CRISPR from <i>Prevotella</i> and <i>Francisella</i> 1
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPRi	Interferencia CRISPR
DEG	Driving Endonuclease Genes
DETECTR	DNA endonuclease targeted CRISPR trans-reporter
ds	Doble strand
DSB	Doble strand breaks
FECYT	Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología
GeCKO	Genome-Scale CRISPR Knock-Out
HDR	Homology Directed Repair
HEG	Homing Endonuclease Genes
JCI	Journal Citation Indicator)
JIF	Journal Impact Factor)
mRNA/ARNm	Messenger RNA
NBIC	Nanotecnología-Biotecnología-Infotecnología-Cognotecnología
nHej	Non-homologous DNA end joining

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

NIH	National Human Genome Research Institute´
PAM	Protospacer adjacent motif
RNA-seq	RNA sequencing
RNP	Ribonucleoproteína
sg	Single guide
SpCas9	Cas9 de Streptococcus pyogenes
sRNA	small RNA
SRSR	Short Regularly Spaced Repeats
VIH/HIV	Human immunodeficiency virus
WoK	Web of Knowledge
WoS	Web of Science

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Resumen

La última revolución de este siglo ha sido la “herramienta” genética CRISPR-Cas9. Frente a una tecnología tan prometedora y sus potenciales aplicaciones en los seres humanos, se ha convertido en obligatoria una revisión bioética que facilite su correcta administración. A partir del trabajo de los padres de esta herramienta, se han presentado los avances que han llevado a esta tecnología a ser una de las principales herramientas de edición genética, a la par que se ha realizado una revisión de las consideraciones bioéticas de aplicar esta tecnología en seres humanos. Se han tratado tres líneas fundamentales: aplicación en línea somática, en línea germinal y genética dirigida (gene drive).

Se diseñaron ecuaciones de búsqueda para la selección de artículos de los autores clave y sobre los conceptos bioéticos objetivo de la revisión. A partir de estas ecuaciones, se han obtenido 38 artículos para la revisión de los padres de la herramienta y 22 artículos para la revisión bioética.

La revisión de los artículos de los autores claves aportó una visión de los trabajos de estos investigadores en la consecución de esta tecnología, recogiendo los inicios de esta técnica, el desarrollo y establecimiento de los protocolos de edición y su aplicación en seres humanos y la implantación de las últimas novedades y mejoras, particularmente para la edición de células humanas. La revisión bioética alertó de los límites que esta tecnología ha podido traspasar, la necesidad de perfeccionamiento y los futuros logros que se han proyectado; donde se abordó la posibilidad del mejoramiento humano y del diseño de seres humanos como grandes dilemas bioéticos que ha introducido la herramienta CRISPR-Cas en el panorama científico y social actual.

Palabras clave

CRISPR-Cas9 - Edición genética - Mojica - Doudna - Charpentier - Zhang - Bioética - Mejoramiento humano

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Abstract

The last revolution of this century has been the genetic “tool” CRISPR-Cas9. Faced with such a promising technology and its potential applications in humans, a bioethical review has become mandatory to facilitate its correct administration. Based on the work of the parents of this tool, the advances that have led this technology to be one of the main genetic editing tools have been presented, along with a review of the bioethical considerations of applying this technology in humans. Three fundamental lines have been treated: application in somatic line, in germ line and gene drive.

Search equations were designed for the selection of articles by the key authors and on the objective bioethical concepts of the review. From these equations, 38 articles have been obtained for the review of the parents of the tool and 22 articles for the bioethics review.

The review of the articles of the key authors provided a vision of the work of these researchers in the achievement of this technology, collecting the beginnings of this technique, the development and establishment of the editing protocols and its application in human beings and the implantation of the latest developments and improvements, particularly for editing human cells. The bioethical review warned of the limits that this technology has been able to cross, the need for improvement and the future achievements that have been projected; where the possibility of human enhancement and the design of human beings were addressed as great bioethical dilemmas that the CRISPR-Cas tool has introduced in the current scientific and social scene.

Key words

CRISPR-Cas9 - Gene editing - Mojica - Doudna - Charpentier - Zhang - Bioethics - Human enhancement

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

INTRODUCCIÓN

El avance científico en el campo de la edición genética en las últimas décadas ha alcanzado cotas que se creían impensables. La carrera por desentrañar y dilucidar las nuevas cuestiones y límites de estas tecnologías lleva a la comunidad científica al continuo seguimiento, cuestionamiento y debate de esta serie de logros, que en cierta medida se pueden catalogar como “progresos”. Sin duda alguna, la revolución de este siglo es la “herramienta” conocida como CRISPR y su sistema de aplicación, en general, la tecnología CRISPR-Cas. Frente a una tecnología tan prometedora y sus potenciales aplicaciones en los seres humanos, se convierte en obligatoria una revisión bioética que facilite su correcta administración.

La herramienta CRISPR-Cas9

La palabra CRISPR, surge del acrónimo compuesto por las mismas letras y que simplifica el término, “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, traducido como “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”. El estudio de esta tecnología ha cautivado a numerosos científicos a lo largo de las últimas décadas y se puede hablar de nombres propios, que han sido claves en el desarrollo de esta.

Para contextualizar esta tecnología, se puede acudir a la descripción que aporta el trabajo fundamental y valedor del Premio Nóbel de Química 2020; presentado por las doctoras Jennifer Anne Doudna y Emmanuelle Charpentier; “Los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR)/asociadas a CRISPR (Cas) proporcionan a las bacterias y arqueas inmunidad adaptativa contra virus y plásmidos mediante el uso de ARN CRISPR (ARNcr) para guiar el silenciamiento de los ácidos nucleicos invasores” (Jinek *et al.*, 2012). “El ARNcr maduro que está apareado en bases con el ARNcr activador en trans (ARNtracr) forma una estructura de dos ARN que dirige a la proteína Cas9 asociada a CRISPR para introducir escisiones de doble cadena (doble strand) en el ADN diana. En los sitios complementarios a la secuencia guía de ARNcr, el dominio de la nucleasa Cas9 HNH escinde la cadena complementaria, mientras que el dominio similar a Cas9 RuvC escinde la cadena no complementaria” (Jinek *et al.*, 2012). En las siguientes figuras, *Figura 1* y *Figura 2*, se observa como “Cas9 se puede programar utilizando una sola molécula de ARN diseñada que combina características de ARNtracr y ARNcr”.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex

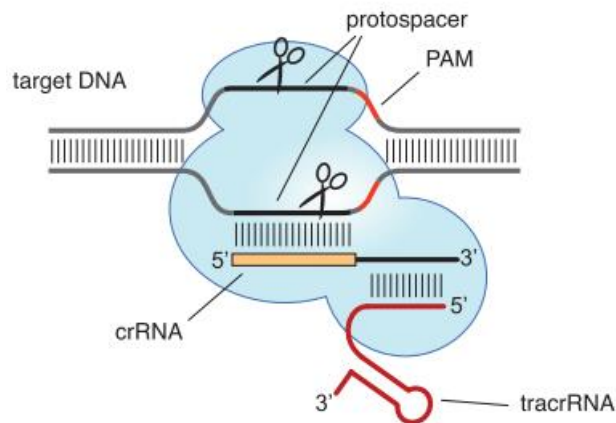


Figura 1: Cas9 programado por una estructura doble ARNcr:ARNtracr- “En los sistemas CRISPR/Cas de tipo II, Cas9 se guía por una estructura de dos ARN formada al activar ARNtracr y dirige a ARNcr para escindir el ADN doble cadena específico del sitio”. (Fuente: Jinek et al., 2012)

Cas9 programmed by single chimeric RNA

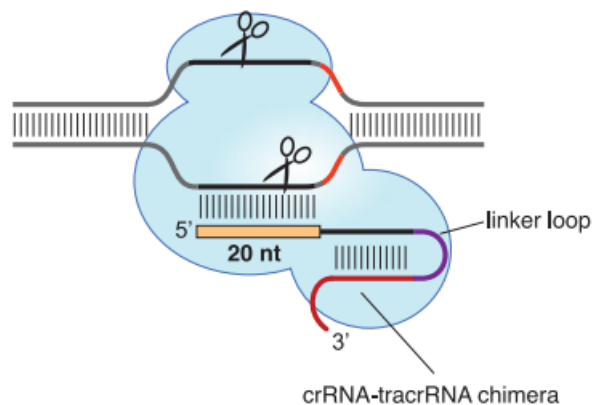


Figura 2: Cas9 programado por un ARN simple quimérico - “Un ARN quimérico generado al fusionar el extremo 3 'de ARNcr con el extremo 5' de ARNtracr”. (Fuente: Jinek et al., 2012)

Con ello, se puede entender esta, la herramienta CRISPR-Cas9, como un sistema bicomponente, CRISPR y Cas9, por medio del cual se puede lograr la edición del genoma de un organismo. Para ello, en primer lugar, se requieren unos factores preproceso, consistentes en la secuencia de ADN de interés preidentificada y una secuencia de ARN guía complementaria a esta secuencia de interés. Se añade a la preparación con la muestra de interés, la secuencia de ARN guía y la enzima Cas9. La secuencia guía se unirá a la sección correspondiente del ADN, en donde, la enzima Cas9 cortará el ADN en un lugar determinado previamente; el corte se consigue a partir del diseño de una secuencia protoespaciadora, que será reconocida por la proteína y que se denomina secuencia PAM. Tras el evento de corte, se activará el

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

mecanismo de reparación del ADN; punto en el que se puede incorporar una secuencia de ADN modificada para reemplazar la sección cortada o respetar el proceso natural de reparación.

En tanto que una tecnología con el potencial que presenta CRISPR-Cas9 pueda aplicarse y se aplica en seres humanos, concretamente en células de origen humano, se han de valorar los límites, las consecuencias o los inconvenientes bioéticos que puedan producirse por y para la aplicación de esta.

Implicaciones bioéticas

La bioética es “la ciencia que regula la conducta humana, el comportamiento humano en el campo de la vida y la salud a la luz de valores y principios morales fundados en la dignidad de la persona humana” (Pardo Sáenz, 2004). Por tanto, la Bioética se basa en una concepción del hombre lo más acertada posible. Puesto que la ética trata de determinar aquellas acciones que son buenas o malas desde el punto de vista moral; la ética sólo será posible cuando se considera al hombre como un ser trascendente. Es decir, sin menospreciar a la razón, es más, apoyándose en ella, se considera al hombre como un animal racional; o en palabras de Boecio: sustancia individual de naturaleza racional (Originalmente publicado en latín; *Persona est naturae rationalis individua substantia* (Boethius, 520)).

La bioética “constituye una fuente de principios y normas de comportamiento que iluminan la conciencia y orientan a hacer elecciones siempre respetuosas de la vida y de su dignidad. ...la bioética da respuestas éticas acerca de lo que se puede hacer y no se puede hacer en el campo de la vida humana (Pardo Sáenz, 2004). Se entiende el fin de esta ciencia, como la “solución” a las posibilidades del ser humano, en tanto, que actúa para guiar al ser humano correctamente en la ejecución por y/o para un fin. Con ello hay que fijar el eje en la cuestión fundamental, el ser humano, “el criterio ético fundamental que regula esta ciencia es el respeto al ser humano, a sus derechos inalienables, a su bien verdadero e integral: la dignidad humana” (Pardo Sáenz, 2004).

La identidad humana tiene como soporte inmediato el concepto de dignidad que, en este caso, se especifica en la dignidad humana. La identidad provee al ser humano de esa diferencia respecto a un objeto cualquiera y con ello, la responsabilidad de que así sea, es decir, mantenerse como sujeto digno. Ya que “la criatura racional es un sujeto personal con una dignidad propia. ...por el hecho de ser un sujeto personal, tiene una dignidad” y por ello “no puede ser considerado como una cosa, un objeto, un medio para obtener un fin, sino como un fin en sí mismo” (Pardo Sáenz, 2004).

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Si se entiende a este ser humano como un ser racional digno, es decir, que se destaca sobre el resto de los seres, se ha de entender a este como un ser que, sin desproveer de valor al resto, tiene un valor añadido, incluso, en términos cuantitativos, tiene un valor superior al resto de seres. En este punto, se puede dilucidar una confluencia entre el planteamiento racional del ser humano y la Revelación, que entendiendo al ser humano como creado a imagen y semejanza de Dios, es provisto de su dignidad, y es elevado a una categoría superior respecto del resto de seres.

Entonces, un ser humano con su identidad y dignidad inherente está llamado al gobierno responsable del resto de seres. En la antropología cristiana, se puede entender al ser humano como administrador de la Creación, con ello, es explícita la responsabilidad depositaria del ser humano, concepto central de la encíclica *Laudato si*, elaborada por el Papa Francisco I. Esta encíclica llama al cuidado de la “Casa común”. El Papa Francisco expone, “el desafío urgente de proteger nuestra casa común incluye la preocupación de unir a toda la familia humana en la búsqueda de un desarrollo sostenible e integral... El Creador no nos abandona, nunca hizo marcha atrás en su proyecto de amor, no se arrepiente de habernos creado” (Francisco, *Laudato si*, 2015); donde se atisba la responsabilidad depositada en el ser humano para la correcta administración. Con ello y con el obsequio y el deber de cuidar al resto de seres, es primordial “la aceptación del propio cuerpo como don de Dios para acoger y aceptar el mundo entero como regalo del Padre y casa común, mientras una lógica de dominio sobre el propio cuerpo se transforma en una lógica a veces sutil de dominio sobre la creación”, (Francisco, *Laudato si*, 2015); significando, a su vez un deber de administrar no de dominar/someter como un tirano somete a un pueblo.

Inmediatamente a las palabras anteriores, Francisco alerta sobre el respeto a la Creación, concretamente dirigido al respeto al ser humano, en este caso con su deber de respetar su propio cuerpo. El ser humano ha de “aprender a recibir el propio cuerpo, a cuidarlo y a respetar sus significados, es esencial para una verdadera ecología humana” (Francisco, *Laudato si*, 2015). Es a su vez, en palabras de Benedicto XVI, la ecología del hombre en la que “también el hombre posee una naturaleza que él debe respetar y que no puede manipular a su antojo” (Benedicto XVI, Discurso al Deutscher Bundestag, 668, 2011). Con ello, se aborda la posibilidad que la ingeniería genética abre con los procesos de modificación genética como es la herramienta CRISPR-Cas9, en tanto que pueda comprometer la identidad humana y al propio ser humano. Si es el ser humano administrador del resto de seres y está llamado al cuidado y respeto de su propio cuerpo, ¿Puede hacer compatible esto con la posibilidad de alterar su propio cuerpo mediante la modificación genética?

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Atendiendo a los principios para regir la bioética, se han de diferenciar varios, fundamentales, que deben guiar el comportamiento ético y que, con esta necesidad, defiendan y protejan la dignidad del ser humano.

El ser humano debe atender al principio de que “la vida humana es inviolable, tiene un valor seguro: la vida humana no es la vida de un conjunto de órganos, sino la vida de una persona, que vale no por lo que tiene, sino por lo que es y está llamada a ser” (Pardo Sáenz, 2004), en el que se hace presente el destino transcendental del ser humano y la propia importancia del ser, por el hecho de serlo.

También es importante el principio del “nexo verdad-vida (naturaleza)-libertad: la razón establece aquello que para el hombre es bueno y aquello que para el hombre es malo. ...La ley natural conlleva una exigencia ética en tanto que dirige el comportamiento para que sea conforme a la naturaleza, para que sea un comportamiento racional, humano. Podríamos decir que es como el manual de funcionamiento de una máquina: si no se sigue, si se ignora o desprecia, se estropea la máquina. Por eso, la norma moral hay que considerarla ...como el actuar de acuerdo con lo que son las cosas en su objetividad, en su verdad, como el mejor camino para desarrollarse como personas. ...De la misma manera que la noche no puede ir en contra del día, si no hay día no hay noche, la libertad no puede ir en contra de la naturaleza. La libertad debe ser guiada por la razón” (Pardo Sáenz, 2004); el ser humano desde su libertad y dirigido a la verdad, ha de actuar sin contravenir la naturaleza y con ello, juzgar si son correctos aquellos comportamientos que tangencialmente a esta, pueden atravesar la línea natural, que, como la máquina anteriormente citada, pueda comprometer el buen funcionamiento de la máquina, rompiéndola de forma temporal o permanentemente.

A colación de esta cuestión, se introduce el siguiente principio “la ciencia, la técnica y el progreso están al servicio del hombre: La ciencia, la medicina, la investigación... son necesarias, imprescindibles para el desarrollo del ser humano. El progreso y la culminación están ligados al dominio de la creación. Mas, no cualquier forma de dominio es bueno, humano” (Pardo Sáenz, 2004). Para incidir en la cuestión del dominio sobre la Creación, el catecismo de la Iglesia católica afirma, que “tanto la investigación científica de base como la investigación aplicada constituyen una expresión significativa del dominio del hombre sobre la creación. La ciencia y la técnica son recursos preciosos cuando son puestos al servicio del hombre y promueven su desarrollo integral en beneficio de todos; sin embargo, por sí solas no pueden indicar el sentido de la existencia y del progreso humano. La ciencia y la técnica están ordenadas al hombre que les ha dado origen y crecimiento; tienen por

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

tanto en la persona y en sus valores morales el sentido de su finalidad y la conciencia de sus límites” (Iglesia Católica, Catecismo de la Iglesia Católica, 2293). Continuando con el principio de, la ciencia al servicio del hombre, Pardo Sáenz mantiene que “la ciencia, la técnica y el progreso están al servicio del hombre. Toman de la persona y de sus valores morales la orientación de su finalidad y el conocimiento de sus límites. Su finalidad es la defensa, protección y desarrollo de la vida humana, no su manipulación y/o eliminación. Por tanto, toda intervención que amenace la integridad o la dignidad de la persona no es humana, no es ciencia en sentido estricto, no es progreso, no es avance... La bioética suministra a la ciencia y a la técnica los criterios racionales y las normas necesarias para la protección del bien integral de la persona. La bioética puede y debe defender al hombre de sí mismo” (Pardo Sáenz, 2004).

Los siguientes principios merece ser presentados juntos por la cuestión central que entrañan, en tanto, que la posibilidad y la finalidad, son factores determinantes de la libertad y teleología humana, mas, se han de autolimitar. Con ello, estos principios son “no todo lo que es técnicamente posible puede considerarse moralmente admisible” y “el fin no justifica los medios”. Para Pardo Sáenz, “en el terreno de la vida humana hay infinidad de posibilidades técnicas de actuación, mas, no todas son lícitas. La licitud la determina el respeto por la dignidad de la persona humana” (Pardo Sáenz, 2004). Sobre la finalidad, el catecismo de la Iglesia Católica ilustra este punto, afirmando que “las investigaciones o experimentos en el ser humano no pueden legitimar actos que en sí mismos contrarios a la dignidad de las personas y a la ley moral. El eventual consentimiento de los sujetos no justifica tales actos. La experimentación en el ser humano no es moralmente legítima si hace correr riesgos desproporcionados o evitables a la vida o a la integridad física o psíquica del sujeto” (Iglesia Católica, Catecismo de la Iglesia Católica, 2295).

Para finalizar con los principios de la bioética, se trata la regla de oro de la bioética, “tratar a los demás como a uno le gustaría que lo trataran”. “La bioética está llamada a defender siempre la verdad de la relación de una persona con otra persona; una persona que pide ser ayudada a realizarse en sus potenciales personales” (Pardo Sáenz, 2004). Este principio, se puede entender fácilmente recurriendo a San Mateo, Evangelista; “Así que todas las cosas que queráis que los hombres hagan con vosotros, así también haced vosotros con ellos.” (Santa Biblia, 1995, Mt 7:12).

A partir de unos principios sólidos que permitan abordar debidamente la cuestión presentada acerca de las tecnologías de edición genética, concretamente en los sistemas CRISPR-Cas9, se puede realizar una revisión bioética adecuada.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

El desarrollo del sistema CRISPR/Cas 9 ha reavivado el debate sobre las aplicaciones de edición de genes en muchas áreas, incluidas la investigación biológica, la salud humana y la agricultura y la producción de alimentos, entre otras (Greene y Master, 2018). Con esto, no solo es importante el trabajo en diferentes áreas sociales, si no, que hay que atender a la realidad más inmediata que afecta a la naturaleza humana, que es el propio ser humano. La aplicación de esta tecnología encuentra el primer punto de choque con la bioética en tanto a la aplicación directa con el cuerpo humano.

Líneas de trabajo de la bioética para CRISPR-Cas9

Se introducen las líneas directas de trabajo en el ser humano, el trabajo en la línea germinal y el trabajo en la línea somática. Antes de tratarlas, se han de definir estos conceptos; según el National Human Genome Research Institute (NIH), se entiende por células somáticas, a aquellas “células del organismo, diferentes de los óvulos y los espermatozoides. En los seres humanos, las células somáticas son diploides, lo que significa que contienen dos conjuntos de cromosomas, uno heredado de cada progenitor. Las mutaciones en el ADN en las células somáticas pueden afectar a una persona, pero no pueden ser transmitidas a su descendencia”. Mientras que el NIH, define a la línea germinal, a aquellas “células sexuales (óvulos y espermatozoides) que los organismos de reproducción sexual usan para transmitir su genoma de una generación a otra (de los progenitores a la descendencia). Los óvulos y los espermatozoides se llaman células germinales, a diferencia de otras células del cuerpo, que se llaman células somáticas”.

Por lo tanto, se evidencia que la principal diferencia entre estas líneas de trabajo de la edición genética es la característica de la heredabilidad, característica que está ligada íntimamente con las células de la línea germinal. Esta cuestión, supone inconvenientes bioéticos añadidos a valorar a la hora de tratar este tipo celular.

A su vez, se introduce un tercer concepto como línea de trabajo que es el “gene drive”. Para encontrar una descripción acertada de este concepto, se recurre a la que el equipo del zoólogo H. C. J. Godfray propone; en el contexto de “un gen particular, en un cromosoma particular y en ausencia de selección, tiene una probabilidad de 50:50 de estar presente en un gameto individual. El gene drive ocurre cuando un gen es capaz de subvertir de alguna manera la segregación mendeliana para que esté sobrerrepresentada en los gametos. ...El gene drive funciona a través de la competencia entre los alelos a nivel del gen en lugar del individuo” (Godfray, *et al*, 2017). De tal manera que en un contexto de gene drive, la propagación de un gen es superior, entendiéndose por superior, en el contexto de una población, a la rapidez con

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

la que ese gen penetra en dicho conjunto. El equipo de Godfray, concretamente centra su objetivo en “los “gene drives” de endonucleasas (Driving Endonuclease Genes - DEG), que incluyen HEG (Homing Endonuclease Genes), sistemas CRISPR-Cas9 modificados y otras construcciones existentes” (Godfray, *et al*, 2017). Estos “gene drives” se pueden valorar en la técnica a revisar, CRISPR-Cas9, y por su naturaleza y principio de acción merecen una revisión bioética. Como indican, “en un heterocigoto, la proteína codificada por un DEG provoca una rotura de doble cadena en el cromosoma homólogo opuesto a donde se inserta su gen y cuando la rotura se repara utilizando el homólogo como plantilla, el heterocigoto DEG se convierte en un homocigoto. Algunos DEG se producen de forma natural, mientras que se pueden diseñar varias clases de endonucleasas para que se propaguen de esta manera, y los sistemas basados en CRISPR-Cas9 son particularmente flexibles” (Godfray, *et al*, 2017); es decir, que en un contexto de transmisión de la información genética a los individuos de la descendencia, este sistema de endonucleasas, compatible con la tecnología CRISPR-Cas9, es capaz de realizar cortes en la secuencia y repararse utilizando la plantilla impuesta (la del gene drive), de tal manera que el proceso de recombinación que ocurre, seguirá las directrices del gene drive, suponiendo la propagación única de este tipo de secuencias. Con ello, la aplicación en CRISPR-Cas9 supondría que, contando con un gen objetivo, este puede imponerse a otros competidores, logrando la mencionada capacidad superior de propagación que brinda esta tecnología de gene drive.

El estudio de estas cuestiones lleva asociado diferentes fines a los que se puede orientar y los correspondientes problemas, dificultades y riesgos que entraña, no solo para el ser humano, sino que también para cualquier realidad al que esté unido este.

ANTECEDENTES

Sobre los inicios, hay que remontarse a los albores del siglo XXI, principalmente se destaca la labor del Profesor Francisco Juan Martínez Mojica y de su grupo de trabajo, pionero en el trabajo con microorganismos en los que primeramente se observaron estos mecanismos. El profesor Mojica junto a su equipo, describe en diferentes artículos, (Mojica *et al.*, 1993; Mojica *et al.*, 1995), secuencias repetidas en arqueas; “la presencia de largos tramos de repeticiones en tándem en el genoma de Archaeas halófilas... Aunque el papel biológico preciso no puede determinarse por completo, todos los datos concuerdan con que las repeticiones en tándem están involucradas en la partición de replicón en las halobacterias” (Mojica *et al.*, 1995). No obstante, no se logran determinar el rol de estas dentro del organismo. Posteriormente, en el año 2000, mediante un estudio más amplio en otros grupos, bacterias, arqueas y mitocondrias, el equipo de Mojica acuña el acrónimo “SRSR”, “Short Regularly Spaced Repeats”, para referirse a las repeticiones encontradas. Según estos investigadores, las SRSR “son elementos cortos repetidos que generalmente ocurren en grupos, pero su principal peculiaridad es el diseño: siempre están espaciados regularmente por secuencias intermedias únicas de longitud constante. En aras de la claridad, y derivado de las características mencionadas, nos referiremos a los miembros de esta familia de repeticiones como Repeticiones Cortas Regularmente Espaciadas” (Mojica *et al.*, 2000).

Iniciado el camino de desentrañar la naturaleza de las secuencias, aparecerá la primera referencia con el nombre de CRISPR, en el año 2002, “para apreciar su estructura característica, nos referiremos a esta familia como las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR)” (Jansen *et al.*, 2002). Junto a la aparición del término, y en el mismo artículo, también se presentan los sistemas/componentes asociados a CRISPR; “se identificaron cuatro genes asociados a CRISPR (cas) en procariontes que contenían CRISPR que estaban ausentes en procariontes negativos a CRISPR. Los genes cas se ubicaron invariablemente junto a un locus CRISPR, lo que indica que los genes cas y los loci CRISPR tienen una relación funcional” (Jansen *et al.*, 2002).

El siguiente capítulo en la historia del CRISPR, continúa ligado al profesor Mojica, que junto a su equipo publican en 2005 nuevos avances sobre el CRISPR, teorizando la relación de la maquinaria CRISPR con los sistemas o reacciones, inmunes de los organismos procariontes; “sorprendentemente, estos elementos extracromosómicos no logran infectar la cepa portadora del espaciador específica, lo que implica una relación

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

entre CRISPR y la inmunidad contra el ADN objetivo. Los bacteriófagos y los plásmidos conjugativos están involucrados en el control, la evolución y la patogenicidad de la población procariótica. Todos estos rasgos biológicos podrían estar influenciados por la presencia de espaciadores específicos.” (Mojica *et al.*, 2005).

No sería hasta 2 años después, cuando se demostraría que mediante el empleo de sistemas CRISPR, se podían alterar fenotipos bacterianos que afectan a la resistencia de bacterias, confirmando la relación entre el sistema CRISPR y los sistemas inmunes de estos organismos, incluyendo la capacidad que presenta el sistema de modificación de la resistencia de la bacteria frente a infecciones virales. “Encontramos que, después del desafío viral, las bacterias integraron nuevos espaciadores derivados de secuencias genómicas de fagos. La eliminación o adición de espaciadores particulares modificó el fenotipo de resistencia a fagos de la célula. Por lo tanto, CRISPR, junto con los genes Cas asociados, proporcionó resistencia contra los fagos, y la especificidad de la resistencia está determinada por la similitud de la secuencia del fago espaciador.” (Barrangou *et al.*, 2007)

Con el inicio de la década de 2010, las publicaciones sobre CRISPR se incrementan considerablemente, siendo el año 2012 el punto de inflexión en la historia de la técnica, de la mano de investigadores de la talla de Jennifer Anne Doudna o Emmanuelle Charpentier, ganadoras en el año 2020 del Premio Nobel de Química (2020). En el año 2011, por ejemplo, se reporta el descubrimiento de ARNcr tipo trans, necesarios para la ejecución de la herramienta CRISPR; “la secuenciación diferencial de ARN del patógeno humano *Streptococcus pyogenes* descubrió tracrRNA, un pequeño ARN codificado en trans con complementariedad de 24 nucleótidos con las regiones repetidas de las transcripciones precursoras de crRNA. Mostramos que tracrRNA dirige la maduración de crRNAs por las actividades de la RNasa III endógena ampliamente conservada” (Deltcheva *et al.*, 2011); junto a descubrimientos como el anterior, se posibilita la aparición de la herramienta como tal. Doudna y Charpentier, publican en 2012 en la revista Science “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity” donde describen un sistema CRISPR, que se fundamenta en el complejo Cas9; que destaca por “el potencial para explotar el sistema para la edición del genoma programable por ARN” (Jinek *et al.*, 2012). Junto a los trabajos de las investigadoras anteriormente nombradas, sobresalen los aportes del grupo de investigación comandado por Feng Zhang, que al mismo tiempo que Doudna y Charpentier, elabora una serie de publicaciones que marcan la acción de la herramienta CRISPR-Cas9. Zhang, publica numerosos artículos en 2013, simultáneamente a Doudna y Charpentier, con avances

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

y mejoras de la técnica y de su rango de aplicación; “Diseñamos dos sistemas CRISPR/Cas tipo II diferentes y demostramos que las nucleasas Cas9 pueden ser dirigidas por ARN cortos para inducir una escisión precisa en loci genómicos endógenos en células humanas y de ratón. Cas9 también se puede convertir en una enzima de corte para facilitar la reparación dirigida por homología con una actividad mutagénica mínima” (Cong, *et al.*, 2013).

Por último, CRISPR-Cas9, introduce numerosas utilidades; “se pueden codificar múltiples secuencias de guía en una sola matriz CRISPR para permitir la edición simultánea de varios sitios dentro del genoma de los mamíferos, lo que demuestra la facilidad de programación y la amplia aplicabilidad de la tecnología de nucleasas guiadas por ARN” (Cong, *et al.*, 2013), “aquí describimos un conjunto de herramientas para la edición del genoma mediada por CRISPR-Cas9 a través de la unión de extremos no homólogos (nHeJ) o la reparación dirigida por homología (HDRr) en células de mamíferos, así como la generación de líneas celulares modificadas para estudios funcionales posteriores” (Ran, *et al.*, 2013b). En estos artículos, se introduce la experimentación en líneas animales y el diseño de eventos de corte preciso y simultáneos, con las reparaciones del ADN asociadas; o avances como el uso de la herramienta CRISPR-Cas9 como seleccionador genético, por ejemplo, de células no mutadas; “El enfoque se basa en la escisión dirigida por doble ARN:Cas9 en el sitio genómico objetivo para matar células no mutadas y evita la necesidad de marcadores seleccionables o sistemas de contraselección” (Jiang, *et al.*, 2013).

Padres de la tecnología CRISPR

Los autores mencionados, principalmente Francisco Juan Martínez Mojica, Jennifer Anne Doudna, Emmanuelle Charpentier y Feng Zhang, han sido por sus méritos, logros y aportaciones, ejes principales en la elaboración de esta revisión. Estos autores están considerados como los padres de la herramienta CRISPR-Cas. Citando, por ejemplo, al Doctor W. B. Derry, “el "Discovering in context" de Francisco Mojica brinda un relato histórico del descubrimiento de CRISPR y los primeros trabajos que llevaron a sus aplicaciones en la edición del genoma” (Derry, 2021). El Doctor Derry también destaca como “el Premio Nobel de Química 2020 fue otorgado a las pioneras de CRISPR-Cas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, quienes desarrollaron el sistema CRISPR-Cas para editar con precisión el ADN genómico” (Derry, 2021). Junto a la labor de estos tres investigadores se añaden los méritos de Zhang para ser considerado también padre de la técnica, este, fue pionero en el uso de CRISPR en células humanas (Cong, *et al.*, 2013) y contra Doudna y Charpentier, participó de una

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

batalla legal de patentes de utilización del sistema CRISPR. A partir de la revisión histórica publicada por la Universidad de Manchester, se puede seguir fácilmente el recorrido de esta batalla legal; que comienza cuando “una de las primeras solicitudes de patentes fue presentada conjuntamente por la Universidad de California en Berkeley, en representación de Doudna y Charpentier a título individual de acuerdo con las normas de la Universidad de Umeå (Suecia); esta solicitud de patente se presentó en mayo de 2012, mientras que en diciembre de 2012 Zhang y el Instituto Broad también presentaron una solicitud de patente simultáneamente con la aceptación del artículo de Zhang sobre la edición de células humanas para su publicación en Science” (Gostimskaya, 2022). El artículo en cuestión se refiere a “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems” (Cong, *et al.*, 2013). La narración de la disputa de patentes, continua cuando “inicialmente, fue la solicitud de Zhang la que resultó exitosa y resultó en una patente en abril de 2014, mientras que la solicitud de Doudna aún estaba pendiente en ese momento. El equipo de Doudna no estuvo de acuerdo con la decisión, después de lo cual siguió una larga disputa entre las dos partes, incluidas apelaciones y audiencias judiciales que finalmente llevaron a una situación ambigua en la licencia de CRISPR-Cas9. Debido al hecho de que para 2019 ambas partes competidoras tenían patentes en esta área, algunas de las empresas de biotecnología que utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 en células humanas recibieron una licencia del equipo de Doudna, mientras que otras, de Zhang. Sin embargo, la Junta de Apelaciones de la Oficina de Patentes y Marcas de EE. UU. en febrero de 2022 volvió a confirmar la prioridad de Zhang y el Instituto Broad en la posición del titular de la patente para el uso de CRISPR-Cas9 en células humanas. Doudna y Charpentier, sin embargo, ganaron una disputa similar en Europa” (Gostimskaya, 2022)

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Analizar las implicaciones bioéticas de la técnica en la aplicación de esta, en células humanas.

Objetivos secundarios

Analizar la producción científica por medio de autores clave, estableciendo un recorrido de fácil seguimiento desde los orígenes hasta la actualidad y en atención a la importancia de sus obras.

Analizar las principales líneas de trabajo de esta tecnología y sus inconvenientes bioéticos

Realizar una revisión general de los estudios o menciones a las implicaciones bioéticas de la aplicación en células humanas.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

METODOLOGÍA

Con el objeto de elaborar un recorrido sencillo acerca de la tecnología CRISPR-Cas9, se ha optado por seleccionar varios autores considerados como claves, ya que por sus méritos y aportaciones se consideran los padres de la tecnología CRISPR.

Base de datos empleada

Para la selección de los artículos se ha utilizado “Web of Science (WoS)”; un servicio en línea que permite el acceso a un conjunto de bases de datos científicas. Es un servicio integrado en WoK (Web of Knowledge) y propiedad de Clarivate Analytics, que permite acceder a un extenso conjunto de publicaciones de artículos científicos, libros y otros tipos de materiales académicos. En la WoS, se presentan más de 36 millones de registros de más de 230 disciplinas desde científicas hasta sociales, artísticas o de humanidades. Se incluyen también, más de 10.000 revistas y más de 100.000 actas de conferencias y congresos. En España, existe una institución pública, la FECYT (Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología), dependiente del Ministerio de Ciencia e Innovación que administra este servicio. Como se recoge en Recursos científicos (2023); “La Fundación Española para la Ciencia y Tecnología, F.S.P. (FECYT) es una fundación pública dependiente del Ministerio de Ciencia e Innovación. FECYT trabaja para reforzar el vínculo entre ciencia y sociedad mediante acciones que promuevan la ciencia, la cultura y la educación científicas, dando respuesta a las necesidades y retos del Sistema Español de Ciencia, Tecnología e Innovación. En este contexto, FECYT gestiona las licencias de las dos principales bases de datos mundiales de referencias bibliográficas y citas de publicaciones periódicas Web of Science, propiedad de Clarivate Analytics, y Scopus, propiedad de Elsevier”.

Búsqueda de las aportaciones de los autores claves

Para catalogar a los autores como claves, se recurre a las aportaciones y al impacto de estos, en la tecnología del estudio y a la consideración de estos, como los padres de la tecnología en estudio. Estos autores son fácilmente localizables en las búsquedas, principalmente por factores como el índice h, el número de publicaciones o el número de citas o de referencias. En el estudio de la herramienta CRISPR-Cas9, indudablemente surgen numerosos nombres propios y equipos de trabajo que se han dedicado y dedican enteramente a la investigación y perfeccionamiento de esta herramienta, mas, solo unos pocos han sido seleccionados como autores claves.

Otro factor, quizás de menos interés, es el factor mediático; muy ligado al reconocimiento público de los investigadores. Sobre esto, los autores también tienen

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

relación principalmente, por el impacto que fuera del mundo científico también tienen, mas, el impacto que se menciona fuera del ámbito científico, en general, el impacto social, se refiere únicamente a sus aportaciones a esta tecnología, que trascienden como se menciona, a la propia comunidad científica.

Con ello, se seleccionaron los autores “Francisco Juan Martínez Mojica”, “Jennifer Anne Doudna”, “Emmanuelle Charpentier” y “Feng Zhang” que por sus aportaciones y como anteriormente se ha mostrado se catalogan como autores de gran relevancia y son considerados como los padres de esta tecnología.

Si se realiza un estudio cronológico de esta tecnología, el resultado general arroja, que, las primeras descripciones datan de principios del siglo XXI. Por esta razón, el periodo de tiempo se acota entre el principio de la década del 2000 hasta la actualidad, junio de 2023. Debido al conocimiento previo de la materia, cabe mencionar que las primeras referencias tal como hoy en día se conoce la herramienta, no aparecen hasta la década del 2010, mas, estos estudios precedentes fundamentan la totalidad del sistema de edición genética y por ello, se han considerado de interés.

Para el diseño de una ecuación de búsqueda útil, se parte de una noción básica de la tecnología, especificándose conforme se ejecutan las búsquedas. Se utilizan criterios fundamentales referidos a los autores conforme las ecuaciones de búsqueda más básicas se ejecutan. El idioma seleccionado para la búsqueda es el inglés debido a la mayor producción asociada. Se utilizan en el buscador seleccionado diferentes ecuaciones con los correspondientes operadores booleanos. Se han utilizado dos ecuaciones parciales antes de elaborar las finales, estas, son las siguientes:

- CRISPR
- CRISPR-Cas9

A partir de las ecuaciones de búsqueda parcial se han elaborado ecuaciones de búsqueda finales, que aglutinen y especifiquen los conceptos de interés para una búsqueda certera y mejor orientada. Se han utilizado las siguientes ecuaciones finales:

- CRISPR (All fields) + Mojica FJM (Author)
- CRISPR (All fields) + Doudna J (Author)
- CRISPR (All fields) + Charpentier E (Author)
- CRISPR (All fields) + Zhang Feng (Author)

Los criterios de inclusión utilizados en la búsqueda de artículos fueron los siguientes:

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Cualquier artículo de la Web of Science.
- Artículos que trataran la tecnología CRISPR.
- Artículos realizados por los autores clave.
- Artículos en inglés.
- Artículos a partir del año 2000 (a excepción de la búsqueda para “FJJ Mojica”).
- 8 + 2... artículos con mayor número de citas según el autor - 8 artículos para el autor con el índice h más bajo, añadiendo 2 más por autor (8 - 10 - 12 - 14)

Los criterios de exclusión utilizados en la búsqueda de artículos fueron los siguientes:

- Autores diferentes a “Francisco Juan Martínez Mojica”, “Jennifer Anne Doudna”, “Emmanuelle Charpentier” y “Feng Zhang”
- Artículos realizados por los autores clave no referidos al objeto de la revisión.
- Artículos en idiomas diferentes al inglés.
- Artículos anteriores al año 2000 (a excepción de la búsqueda de “FJJ Mojica”).

Para la selección de artículos de revisión, el criterio fundamental es el impacto que el artículo en la comunidad científica, valorado por el número de citas y de referencias; referido a los autores clave. Por ello, se seleccionan aquellos artículos que con un mayor número de citas se consideran más influyentes. Con ello, los resultados que se han obtenido de esta selección se ordenaron correctamente para poder observar el impacto de la producción de cada autor; y en cómputos generales la producción respecto del tema de revisión. La presentación de estos resultados se ha realizado siguiendo un criterio de orden cronológico, del artículo más antiguo al más reciente.

Se han elaborado tablas y gráficas para recoger la producción de los autores seleccionados, a la par que también se aportan los indicadores sobre estos autores, número de citas e índice h. Para complementar y respaldar las fuentes de información, también se añadieron para las revistas en las que se han publicado los artículos seleccionados, sus indicadores propios; JIF (Journal Impact Factor) y JCI (Journal Citation Indicator). Los resultados de esta búsqueda por autores se presentan ordenados en las tablas de forma descendente, desde el artículo más citado hasta el artículo con menos citaciones y las revistas consultadas, por mayor valor JIF.

El índice H o índice de Hirsch “se define como el valor máximo de h tal que el autor/revista dado ha publicado al menos h artículos que han sido citados cada uno al menos h veces” (Hirsch, 2005).

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Según Clarivate (2023), el JIF o factor de impacto de la revista “escala las citas recibidas a contenido reciente por una medida del tamaño de la producción académica de la revista”.

Según Clarivate (2023), el JCI o indicador de citas de una revista “representa el impacto promedio de cita normalizado por categoría para artículos publicados en el período anterior de tres años”.

Búsqueda de las perspectivas bioéticas de la tecnología CRISPR

Con el objetivo de obtener un surtido variado de bibliografía de las perspectivas bioéticas, se emplean en el buscador seleccionado diferentes ecuaciones con los correspondientes operadores booleanos. Se han utilizado numerosas ecuaciones parciales antes de elaborar una ecuación final, estas, son las siguientes:

- CRISPR AND Bioethics
- CRISPR AND Genetic modification AND Bioethics
- CRISPR AND Human cells AND Bioethics
- CRISPR AND Genetic modification AND Embryo AND Bioethics
- CRISPR AND Somatic cells AND Bioethics
- CRISPR AND Germ line AND Bioethics
- CRISPR AND Gene drive AND Bioethics
- CRISPR AND Human enhancement

A partir de las ecuaciones de búsqueda parcial se han elaborado ecuaciones de búsqueda finales, que aglutinen y especifiquen los conceptos de interés para una búsqueda certera y mejor orientada. Se han utilizado las siguientes ecuaciones finales:

- (All fields) - CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea
- (All fields) - CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells
- (All fields) - CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea

A su vez y aprovechando los medios que pone a disposición la Universidad Católica de Valencia, y valiéndose del reconocido prestigio que posee el Observatorio de Bioética - Instituto Ciencias de la Vida; centro asociado a la mencionada institución, se ha realizado una búsqueda bibliográfica manual entre la producción científica de este centro. Esta búsqueda pone especial interés en aspectos bioéticos relacionados

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

directa o indirectamente con la tecnología CRISPR-Cas9, siempre que estos aspectos puedan aplicarse en la revisión bibliográfica planteada.

Si se realiza un estudio cronológico de las aportaciones bioéticas relativas a esta herramienta, se observa que debido a la concentración de publicaciones y perfeccionamiento de la técnica acontecida a partir del año 2010; el periodo de publicación de este tipo de artículos se acota desde la década de 2010 en adelante, por lo que se propuso un periodo de estudio desde el año 2013 hasta junio de 2023, aproximadamente una década. Se han seleccionado artículos que sin tratar directamente de la técnica CRISPR, tratan aspectos importantes sobre la modificación genética humana y se pueden aplicar para la revisión bioética. Además, el idioma seleccionado para la búsqueda fue el inglés debido a la mayor producción asociada al idioma; no obstante, tras la búsqueda manual llevada a cabo entre la bibliografía que ofrece el Observatorio de Bioética, se han seleccionado artículos en castellano.

Para la correcta selección de los artículos, durante la búsqueda bibliográfica se han utilizado criterios de inclusión y de exclusión. Estas herramientas facilitan este proceso, pues sirven para especificar los resultados que se obtienen siempre que se apliquen con sentido y de manera correcta; estableciendo a su vez, los límites de la revisión del tema de interés.

Los criterios de inclusión utilizados en la búsqueda de artículos que trataran los aspectos bioéticos de esta tecnología fueron los siguientes:

- Cualquier artículo de la Web of Science.
- Artículos que trataran la tecnología CRISPR en humanos.
- Artículos que trataran los aspectos bioéticos de la tecnología CRISPR.
- Artículos que utilizaran la tecnología CRISPR para modificar el código genético.
- Artículos en inglés (a excepción de los artículos del Observatorio de Bioética).
- Artículos a partir del año 2013.
- 6 artículos con mayor número de citas (Si la búsqueda dió como resultado un número menor o igual a 6, se han seleccionado todos los artículos)

Los criterios de exclusión utilizados en la búsqueda de artículos que trataran los aspectos bioéticos de esta tecnología fueron los siguientes:

- Estudios sobre CRISPR en Animales, Plantas, Bacterias y Arqueas.
- Artículos en idiomas diferentes al inglés (a excepción de los artículos del Observatorio de Bioética).

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Artículos anteriores al año 2013.

La fundamentación del estudio bioético propuesta se ha basado en las líneas introducidas con anterioridad. Las líneas de trabajo para CRISPR-Cas9, se han dividido en “células somáticas”, “línea germinal” y “gene drive”, a lo que se añaden consideraciones generales que puedan referirse a varias o a la totalidad de las líneas de trabajo. A su vez, se trabajan cuestiones relacionadas con las mismas y con la propia tecnología, mas, no implícitamente incluidas en las 3 líneas mostradas.

Los principios tratados previamente en la introducción de la parte bioética, fueron los siguientes; “la vida humana es inviolable, tiene un valor seguro”, “nexo verdad-vida (naturaleza)-libertad”, “la ciencia, la técnica y el progreso están al servicio del hombre”, “no todo lo que es técnicamente posible puede considerarse moralmente admisible”, “el fin no justifica los medios” y “tratar a los demás como a uno le gustaría que lo tratarasen” que siguen la línea de trabajo propuesta por Pardo Sáenz. Junto a estos principios, el Observatorio de Bioética, en su publicación; “Guía de valoración ética de intervenciones sobre el cuerpo humano ante la llegada de las tecnologías NBIC con fines de mejoramiento” (Marín Conde, y Gómez Tatay, 2021), utiliza una clasificación, *Figura 3*, que puede seguirse para valorar bioéticamente un procedimiento y que se ha utilizado en esta revisión bibliográfica. La clasificación se refiere a las intervenciones sobre el cuerpo humano; en ella se plantean otros principios rectores compatibles con los anteriores y que complementan la revisión bioética.

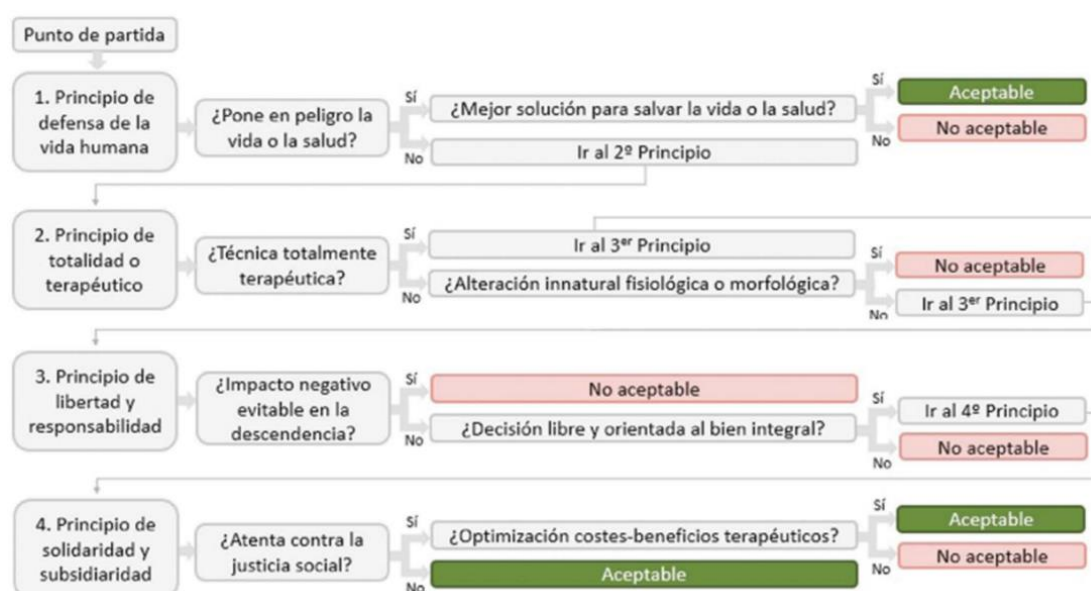


Figura 3: Diagrama resumen de la guía práctica de ayuda en la toma de decisiones éticas con respecto a las intervenciones sobre el cuerpo humano. (Fuente: Marín Conde y Gómez-Tatay, 2021)

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

RESULTADOS

Indicadores bibliométricos de los investigadores y de las revistas

Los indicadores bibliométricos de los autores seleccionados, ordenados descendientemente por mayor índice h, se presentan en la *Tabla 1*:

Tabla 1: Indicadores bibliométricos de los autores seleccionados. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Autor	Índice h	Citaciones totales	Publicaciones totales
Jennifer Anne Doudna	113	62,463	381
Feng Zhang	89	76,991	167
Emmanuelle Charpentier	36	23,283	81
Francisco Juan Martínez Mojica	23	8,097	38

Los indicadores bibliométricos de las revistas en las que se han publicado los artículos seleccionados, ordenadas descendientemente por mayor JIF (Journal Impact Factor), se presentan en la *Tabla 2*:

Tabla 2: Principales indicadores bibliométricos de las revistas en las que se han publicado los artículos seleccionados. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Revista	Categoría JIF	Categoría JCI	JIF 2022	JCI 2022	Ranking JIF	Ranking JCI	Cuartil JIF	Cuartil JCI
Nature reviews microbiology	Microbiology	Microbiology	88,1	6,72	1/135	1/156	Q1	Q1
Nature	Multidisciplinary sciences	Multidisciplinary sciences	64,8	11,32	1/73	1/133	Q1	Q1
Cell	Biochemistry and molecular biology	Biochemistry and molecular biology	64,5	9,55	2/285	2/315	Q1	Q1
	Cell biology	Cell biology			3/191	3/203	Q1	Q1
Science	Multidisciplinary sciences	Multidisciplinary sciences	56,9	9,57	2/73	2/133	Q1	Q1
Nature methods	Biochemical research methods	Biochemical research methods	48	9,1	1/77	1/83	Q1	Q1
Nature biotechnology	Biotechnology and applied microbiology	Biotechnology and applied microbiology	46,9	9,65	2/156	2/167	Q1	Q1
Nucleic acid research	Biochemistry and molecular biology	Biochemistry and molecular biology	14,9	3,35	10/285	6/315	Q1	Q1
Nature protocols	Biochemical research methods	Biochemical research methods	14,8	3,39	2/77	2/83	Q1	Q1
Annual Report of Biophysics	Biophysics	Biophysics	12,4	1,81	3/70	3/74	Q1	Q1
eLife	Biology	Biology	7,7	2,07	7/92	3/111	Q1	Q1
Journal of	Biochemistry and	Biochemistry and	3,9	0,57	126/285	194/315	Q2	Q3

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

molecular evolution	molecular biology	molecular biology			14/52	41/55	Q2	Q3
	Evolutionary biology	Evolutionary biology			51/171	119/189	Q2	Q3
	Genetics and heredity	Genetics and heredity						
Molecular microbiology	Biochemistry and molecular biology	Biochemistry and molecular biology	3,6	0,66	146/285	161/315	Q3	Q3
	Microbiology	Microbiology			65/135	76/156	Q2	Q2
Microbiology	Microbiology	Microbiology	2,8	0,51	91/135	105/156	Q3	Q3

Resultados de la búsqueda de autores claves

A partir de las ecuaciones de búsqueda planteadas, se han obtenido los siguientes resultados:

Para la búsqueda parcial “CRISPR”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 43,468 resultados.

Para la búsqueda parcial “CRISPR-Cas9”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 26,348 resultados.

Incluyendo en las búsquedas los autores catalogados previamente como claves:

Para la búsqueda “CRISPR” + “Author: Mojica FJM”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 24 resultados.

Se seleccionaron los siguientes artículos para el autor “Francisco Juan Martínez Mojica” a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados cronológicamente y con el número de citas y la revista de publicación.

- “Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements” (Mojica *et al.*, 2005) publicado en la revista Journal of molecular evolution y con 1254 citas.
- “Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system” (Mojica *et al.*, 2009) publicado en la revista Microbiology y con 975 citas.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- “Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems” (Makarova *et al.*, 2011) publicado en la revista Nature Reviews Microbiology y con 1585 citas.
- “An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems” (Makarova *et al.*, 2015) publicado en la revista Nature Reviews Microbiology y con 1446 citas.
- “Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, a burst of class 2 and derived variants” (Makarova *et al.*, 2020) publicado en la revista Nature Reviews Microbiology y con 802 citas.

Extraordinariamente también se incluyen 3 artículos que, no habiéndose obtenido mediante la ecuación de búsqueda anterior, se deben seleccionar de la producción de este autor, ya que son predecesores de esta tecnología, y en el momento de su publicación, la tecnología no había sido descubierta y nombrada como hoy en día se conoce. Utilizando, únicamente, la ecuación de búsqueda “Author: Mojica FJM”, se obtienen 38 resultados; se seleccionan los siguientes artículos:

- “Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites” (Mojica *et al.*, 1993) publicado en la revista Molecular microbiology y con 169 citas.
- “Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferox mediterranei* and *Haloferox volcanii* and could be involved in replicon partitioning” (Mojica *et al.*, 1995) publicado en la revista Molecular microbiology y con 186 citas.
- “Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria” (Mojica *et al.*, 2000) publicado en la revista Molecular microbiology y con 454 citas.

Finalmente, y para el autor “Francisco Juan Martínez Mojica”, se presentan sintetizados en una tabla, *Tabla 3*, los artículos seleccionados para la revisión, junto a la revista de publicación y el número de citas para cada artículo.

Tabla 3: Resultados de la búsqueda para el autor “Francisco Juan Martínez Mojica”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Revista	Citaciones
“Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems” (Makarova <i>et al.</i> , 2011)	Nature Reviews Microbiology	1585
“An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems”	Nature Reviews	1446

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

(Makarova <i>et al.</i> , 2015)	Microbiology	
“Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements” (Mojica <i>et al.</i> , 2005)	Journal of molecular evolution	1254
“Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system” (Mojica <i>et al.</i> , 2009)	Microbiology	975
“Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, a burst of class 2 and derived variants” (Makarova <i>et al.</i> , 2020)	Nature Reviews Microbiology	802
“Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria” (Mojica <i>et al.</i> , 2000)	Molecular microbiology	454
“Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea <i>Haloferox mediterranei</i> and <i>Haloferox volcanii</i> and could be involved in replicon partitioning” (Mojica <i>et al.</i> , 1995)	Molecular microbiology	186
“Transcription at different salinities of <i>Haloferox mediterranei</i> sequences adjacent to partially modified PstI sites” (Mojica <i>et al.</i> , 1993)	Molecular microbiology	169
Artículos totales		8

Para la búsqueda “CRISPR” + “Author: Doudna J”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 176 resultados.

Se seleccionaron los siguientes artículos para el autor “Jennifer Anne Doudna” a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados cronológicamente y con el número de citas y la revista de publicación.

- “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity” (Jinek *et al.*, 2012) publicado en la revista Science y con 9068 citas.
- “RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea” (Wiedenheft, *et al.*, 2012) publicado en la revista Nature y con 1252 citas.
- “CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes” (Gilbert, *et al.*, 2013) publicado en la revista Cell y con 2225 citas.
- “High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity” (Pattanayak, *et al.*, 2013) publicado en la revista Nature biotechnology y con 1027 citas.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- “Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression” (Qi, *et al.*, 2013) publicado en la revista Cell y con 2909 citas.
- “RNA-programmed genome editing in human cells” (Jinek, *et al.*, 2013) publicado en la revista eLife y con 1450 citas.
- “DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9” (Sternberg, *et al.*, 2014) publicado en la revista Nature y con 1138 citas.
- “Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery” (Lin, *et al.*, 2014) publicado en la revista eLife y con 751 citas.
- “Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation” (Jinek, *et al.*, 2014) publicado en la revista Science y con 707 citas.
- “The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9” (Doudna y Charpentier, 2014) publicado en la revista Science y con 3622 citas.
- “Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering” (Wright, *et al.*, 2016) publicado en la revista Cell y con 679 citas.
- “CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms” (Jiang y Doudna, 2017) publicado en la revista Annual Report of Biophysics y con 839 citas.
- “CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering” (Knott y Doudna, 2018) publicado en la revista Science y con 715 citas.
- “CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity” (Chen, *et al.*, 2018) publicado en la revista Science y con 1495 citas.

Finalmente, y en lo relativo al autor “Jennifer Anne Doudna”, se presentan sintetizados en una tabla, *Tabla 4*, los artículos seleccionados para la revisión, junto a la revista de publicación y el número de citas para cada artículo.

Tabla 4: Resultados de la búsqueda para el autor “Jennifer Anne Doudna”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Revista	Citaciones
“A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity” (Jinek <i>et al.</i> , 2012)	Science	9068
“The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9” (Doudna y Charpentier, 2014)	Science	3622
“Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression” (Qi, <i>et al.</i> , 2013)	Cell	2909

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

"CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes" (Gilbert, <i>et al.</i> , 2013)	Cell	2225
"CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity" (Chen, <i>et al.</i> , 2018)	Science	1495
"RNA-programmed genome editing in human cells" (Jinek, <i>et al.</i> , 2013)	eLife	1450
"RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea" (Wiedenheft, <i>et al.</i> , 2012)	Nature	1252
"DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9" (Sternberg, <i>et al.</i> , 2014)	Nature	1138
"High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity" (Pattanayak, <i>et al.</i> , 2013)	Nature biotechnology	1027
"CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms" (Jiang y Doudna, 2017)	Annual Report of Biophysics	839
"Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery" (Lin, <i>et al.</i> , 2014)	eLife	751
"CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering" (Knott y Doudna, 2018)	Science	715
"Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation" (Jinek, <i>et al.</i> , 2014)	Science	707
"Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering" (Wright, <i>et al.</i> , 2016)	Cell	679
Artículos totales		14

Para la búsqueda "CRISPR" + "Author: Charpentier E"; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 41 resultados.

Se seleccionaron los siguientes artículos para el autor "Emmanuelle Charpentier" a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados cronológicamente y con el número de citas y la revista de publicación.

- "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" (Makarova *et al.*, 2011) publicado en la revista Nature Reviews Microbiology y con 1585 citas.
- "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III" (Deltcheva, *et al.*, 2011) publicado en la revista Nature y con 1558 citas.
- "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity" (Jinek *et al.*, 2012) publicado en la revista Science y con 9068 citas.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- “Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems” (Chylinski, *et al.*, 2014) publicado en la revista *Nucleic acid research* y con 288 citas.
- “Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation” (Jinek, *et al.*, 2014) publicado en la revista *Science* y con 707 citas.
- “The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9” (Doudna y Charpentier, 2014) publicado en la revista *Science* y con 3622 citas.
- “An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems” (Makarova *et al.*, 2015) publicado en la revista *Nature Reviews Microbiology* y con 1446 citas.
- “The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA” (Fonfara, *et al.*, 2016) publicado en la revista *Nature* y con 523 citas.
- “The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward” (Hille, *et al.*, 2018) publicado en la revista *Cell* y con 460 citas.
- “Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, a burst of class 2 and derived variants” (Makarova *et al.*, 2020) publicado en la revista *Nature Reviews Microbiology* y con 802 citas.

Finalmente, y en lo relativo al autor “Emmanuelle Charpentier”, se presentan sintetizados en una tabla, *Tabla 5*, los artículos seleccionados para la revisión, junto a la revista de publicación y el número de citas para cada artículo.

Tabla 5: Resultados de la búsqueda para el autor “Emmanuelle Charpentier”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Revista	Citaciones
“A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity” (Jinek <i>et al.</i> , 2012)	Science	9068
“The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9” (Doudna y Charpentier, 2014)	Science	3622
“Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems” (Makarova <i>et al.</i> , 2011)	Nature Reviews Microbiology	1585
“CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III” (Deltcheva, <i>et al.</i> , 2011)	Nature	1558
“An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems” (Makarova <i>et al.</i> , 2015)	Nature Reviews Microbiology	1446
“Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, a burst of class 2 and derived variants” (Makarova <i>et al.</i> , 2020)	Nature Reviews Microbiology	802
“Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated	Science	707

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Conformational Activation” (Jinek, <i>et al.</i> , 2014)		
“The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA” (Fonfara, <i>et al.</i> , 2016)	Nature	523
“The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward” (Hille, <i>et al.</i> , 2018)	Cell	460
“Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems” (Chylinski, <i>et al.</i> , 2014)	Nucleic acid research	288
Artículos totales		
		10

Para la búsqueda “CRISPR” + “Author: Zhang Feng”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 191 resultados.

Se seleccionaron los siguientes artículos para el autor “Feng Zhang” a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados cronológicamente y con el número de citas y la revista de publicación.

- “DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases” (Hsu, *et al.*, 2013), publicado en la revista Nature biotechnology y con 2948 citas.
- “Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity” (Ran, *et al.*, 2013a), publicado en la revista Cell y con 2263 citas.
- “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system” (Ran, *et al.*, 2013b), publicado en la revista Nature protocols y con 6511 citas.
- “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems” (Cong, *et al.*, 2013), publicado en la revista Science y con 9683 citas.
- “One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering” (Wang, *et al.*, 2013), publicado en la revista Cell y con 2459 citas.
- “RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems” (Jiang, *et al.*, 2013), publicado en la revista Nature biotechnology y con 1567 citas.
- “Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering” (Hsu, *et al.*, 2014), publicado en la revista Cell y con 3497 citas.
- “Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells” (Shalem, *et al.*, 2014), publicado en la revista Science y con 3125 citas.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- “Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening” (Sanjana, *et al.*, 2014), publicado en la revista Nature methods y con 2779 citas.
- “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System” (Zetsche, *et al.*, 2015), publicado en la revista Cell y con 2487 citas.
- “Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex” (Konermann, *et al.*, 2015), publicado en la revista Science y con 1640 citas.
- “In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9” (Ran, *et al.*, 2015), publicado en la revista Nature y con 1733 citas.

Finalmente, y en lo relativo al autor “Feng Zhang”, se presentan sintetizados en una tabla, *Tabla 6*, los artículos de este autor seleccionados para la revisión, junto a la revista de publicación y el número de citas para cada artículo.

Tabla 6: Resultados de la búsqueda para el autor “Feng Zhang”. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Revista	Citaciones
“Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems” (Cong, <i>et al.</i> , 2013)	Science	9683
“Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system” (Ran, <i>et al.</i> , 2013b)	Nature protocols	6511
“Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering” (Hsu, <i>et al.</i> , 2014)	Cell	3497
“Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells” (Shalem, <i>et al.</i> , 2014)	Science	3125
“DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases” (Hsu, <i>et al.</i> , 2013)	Nature biotechnology	2948
“Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening” (Sanjana, <i>et al.</i> , 2014)	Nature methods	2779
“Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System” (Zetsche, <i>et al.</i> , 2015)	Cell	2487
“One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering” (Wang, <i>et al.</i> , 2013)	Cell	2459
“Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity” (Ran, <i>et al.</i> , 2013a)	Cell	2263
“In vivo genome editing using <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9” (Ran, <i>et al.</i> , 2015)	Nature	1733
“Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex” (Konermann, <i>et al.</i> , 2015)	Science	1640
“RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems” (Jiang, <i>et al.</i> , 2013)	Nature biotechnology	1567

Artículos totales	12
-------------------	----

Sintetizando, el número final de artículos utilizados para este apartado fue 38.

Resultados de la búsqueda de las perspectivas bioéticas de la tecnología CRISPR

A partir de las ecuaciones parciales de búsqueda planteadas, se han obtenido los siguientes resultados:

Para la búsqueda “CRISPR AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 145 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Genetic modification AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 25 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Human cells AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 20 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Genetic modification AND Embryo AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 7 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Somatic cells AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 7 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Germ line AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 14 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Gene drive AND Bioethics”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 18 resultados.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para la búsqueda “CRISPR AND Human enhancement”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 236 resultados.

Para facilitar la visualización de los resultados de las búsquedas con ecuaciones parciales, se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 7* y ordenados descendientemente según el número de resultados.

Tabla 7: Resultados de la búsqueda con ecuaciones parciales de las perspectivas bioéticas. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Ecuación parcial	Resultados
“CRISPR AND Human enhancement”	236
“CRISPR AND Bioethics”	145
“CRISPR AND Genetic modification AND Bioethics”	25
“CRISPR AND Human cells AND Bioethics”	20
“CRISPR AND Gene drive AND Bioethics”	18
“CRISPR AND Germ line AND Bioethics”	14
“CRISPR AND Somatic cells AND Bioethics”	7
“CRISPR AND Genetic modification AND Embryo AND Bioethics”	7

A partir de las ecuaciones finales de búsqueda planteadas, se han obtenido los siguientes resultados:

Para la búsqueda “CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 6 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 4 resultados.

Para la búsqueda “CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea”; se obtuvieron los siguientes resultados:

- 20 resultados.

Para facilitar la visualización de los resultados de las búsquedas con ecuaciones finales, se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 8* y ordenados descendientemente según el número de resultados.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Tabla 8: Resultados de la búsqueda con ecuaciones finales de las perspectivas bioéticas. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Ecuación final	Resultados
"CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea"	20
"CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea"	6
"CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells"	4

Se seleccionaron los siguientes artículos para la búsqueda "CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea" a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados descendientemente a partir del número mayor de citas.

- El artículo "Germline genome editing versus preimplantation genetic diagnosis: Is there a case in favour of germline interventions?" (Ranisch, 2020) presenta 30 citas.
- El artículo "Reproductive CRISPR does not cure disease" (Rulli, 2019) presenta 18 citas.
- El artículo "Ethical issues in human germline gene editing: a perspective from China" (Zhang y Lie, 2018) presenta 9 citas.
- El artículo "Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes?" (Harper y Schatten, 2019) presenta 6 citas.
- El artículo "CRISPR-Cas9 and He Jiankui's Case: an Islamic Bioethics Review using Maqasid al-Shari'a and Qawaid Fighiyyah" (Alsomali y Hussein, 2021) presenta 2 citas.
- El artículo "Altered evolution: are reproductive endocrinology and infertility specialists ready for the genetically engineered future?" (Pavlovic, *et al.*, 2020) no presenta citas.

Finalmente, y para facilitar la visualización de los resultados de la búsqueda con la ecuación final, "CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea", se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 9* y ordenados descendientemente según el número de citas.

Tabla 9: Resultados de la búsqueda para la ecuación "CRISPR AND Bioethics AND Genetic modification AND Embryo NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea". (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Citaciones
"Germline genome editing versus preimplantation genetic diagnosis: Is there a case in favour	30

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

of germline interventions?" (Ranisch, 2020)	
"Reproductive CRISPR does not cure disease" (Rulli, 2019)	18
"Ethical issues in human germline gene editing: a perspective from China" (Zhang y Lie, 2018)	9
"Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes?" (Harper y Schatten, 2019)	6
"CRISPR-Cas9 and He Jiankui's Case: an Islamic Bioethics Review using Maqasid al-Shari'a and Qawaid Fighiyah" (Alsomali y Hussein, 2021)	2
"Altered evolution: are reproductive endocrinology and infertility specialists ready for the genetically engineered future?" (Pavlovic, <i>et al.</i> , 2020)	-
Artículos totales	
	6

Se seleccionaron los siguientes artículos para la búsqueda "CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells" a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados descendientemente según el número mayor de citas.

- El artículo "Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology" (Ayanoğlu, *et al.*, 2020) presenta 16 citas.
- El artículo "Emerging ethical perspectives in the clustered regularly interspaced short palindromic repeats genome-editing debate" (Camporesi y Cavaliere, 2016) presenta 16 citas.
- El artículo "CRISPR-Cas and Its Wide-Ranging Applications: From Human Genome Editing to Environmental Implications, Technical Limitations, Hazards and Bioethical Issues" (Piergentili, *et al.*, 2021) presenta 7 citas.
- El artículo "The Future of CRISPR Applications in the Lab, the Clinic and Society" (Hough y Ajetunmobi, 2017) presenta 4 citas.

Finalmente, y para facilitar la visualización de los resultados de la búsqueda con la ecuación final, "CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells", se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 10* y ordenados descendientemente según el número de citas.

Tabla 10: Resultados de la búsqueda para la ecuación "CRISPR AND Bioethics AND Gene drive AND Human cells". (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Citaciones
"Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology" (Ayanoğlu, <i>et al.</i> , 2020)	16
"Emerging ethical perspectives in the clustered regularly interspaced short palindromic repeats genome-editing debate" (Camporesi y Cavaliere, 2016)	16
"CRISPR-Cas and Its Wide-Ranging Applications: From Human Genome Editing to Environmental Implications, Technical Limitations, Hazards and Bioethical Issues" (Piergentili, <i>et al.</i> , 2021)	7

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

"The Future of CRISPR Applications in the Lab, the Clinic and Society" (Hough y Ajetunmobi, 2017)	4
Artículos totales	4

Se seleccionaron los siguientes artículos para la búsqueda "CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea" a partir de la búsqueda en WoS. Se presentan ordenados descendientemente a partir del número mayor de citas.

- El artículo "Yesterday's Child: How Gene Editing for Enhancement Will Produce Obsolescence-and Why It Matters" (Sparrow, 2019) presenta 34 citas.
- El artículo "Disease Resistance and the Definition of Genetic Enhancement" (So, *et al.*, 2017) presenta 15 citas.
- El artículo "Designing humans: A human rights approach" (Liao, 2019) presenta 11 citas.
- El artículo "Beginning of life ethics at the dawn of a new era of genome editing: are bioethical precepts and fast-evolving biotechnologies irreconcilable?" (Marinelli y Del Rio, 2020) presenta 6 citas.
- El artículo "The Wisdom of Germline Editing: An Ethical Analysis of the Use of CRISPR-Cas9 to Edit Human Embryos" (Gumer, 2019) presenta 6 citas.
- El artículo "Future space missions and human enhancement: Medical and ethical challenges" (Szocik, *et al.*, 2021) presenta 5 citas.

Finalmente, y para facilitar la visualización de los resultados de la búsqueda con la ecuación final, "CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea", se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 11* y ordenados según el número de citas.

Tabla 11: Resultados de la búsqueda para la ecuación "CRISPR AND Bioethics AND Human enhancement NOT Animals NOT Plants NOT Bacteria NOT Archaea". (Fuente: Elaboración propia a partir de datos de WoS, a junio de 2023)

Título del artículo	Citaciones
"Yesterday's Child: How Gene Editing for Enhancement Will Produce Obsolescence-and Why It Matters" (Sparrow, 2019)	34
"Disease Resistance and the Definition of Genetic Enhancement" (So, <i>et al.</i> , 2017)	15
"Designing humans: A human rights approach" (Liao, 2019)	11
"Beginning of life ethics at the dawn of a new era of genome editing: are bioethical precepts and fast-evolving biotechnologies irreconcilable?" (Marinelli y Del Rio, 2020)	6

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

"The Wisdom of Germline Editing: An Ethical Analysis of the Use of CRISPR-Cas9 to Edit Human Embryos" (Gumer, 2019)	6
"Future space missions and human enhancement: Medical and ethical challenges" (Szocik, <i>et al.</i> , 2021)	5
Artículos totales	
	6

Al igual que para la búsqueda en la Web of Science, se realizó una selección de artículos entre la bibliografía que ofrece el Observatorio de Bioética. Para ello se ha elegido manualmente aquellos artículos que se pueden considerar de interés para la discusión bioética. Se han obtenido los siguientes resultados:

- El artículo "Guía de valoración ética de intervenciones sobre el cuerpo humano ante la llegada de las tecnologías NBIC con fines de mejoramiento" (Marín Conde y Gómez-Tatay, 2021).
- El artículo "From *Australopithecus* to cyborgs. Are we facing the end of human evolution?" (Aznar y Burguete, 2020).
- El artículo "CRISPR-Cas9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética" (Aznar y Gómez-Tatay, 2019).
- El artículo "Mitochondrial modification techniques and ethical issues" (Gómez-Tatay, *et al.* 2017).
- El artículo "Estatuto biológico del embrión humano" (Aznar y Pastor, 2017).
- El artículo "Designer babies. A question of ethics" (Aznar, 2009).

Finalmente, y para facilitar la visualización de la selección de los artículos del Observatorio de Bioética - Instituto Ciencias de la Vida, se presentan, estos, sintetizados en una tabla, *Tabla 12* y ordenados cronológicamente.

Tabla 12: Resultados de la selección manual de artículos del Observatorio de Bioética. (Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Observatorio de Bioética – Instituto Ciencias de la Vida)

Título del artículo	
"Guía de valoración ética de intervenciones sobre el cuerpo humano ante la llegada de las tecnologías NBIC con fines de mejoramiento" (Marín Conde y Gómez-Tatay, 2021)	
"From <i>Australopithecus</i> to cyborgs. Are we facing the end of human evolution?" (Aznar y Burguete, 2020)	
"CRISPR-Cas9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética" (Aznar y Gómez-Tatay, 2019)	
"Mitochondrial modification techniques and ethical issues" (Gómez-Tatay, <i>et al.</i> 2017)	
"Estatuto biológico del embrión humano" (Aznar y Pastor, 2017)	
"Designer babies. A question of ethics" (Aznar, 2009)	
Artículos totales	6

Sintetizando, el número final de artículos utilizados para este apartado fue 22.

DISCUSIÓN

Aportaciones de los investigadores clave a la tecnología CRISPR

Se presentan cronológicamente las aportaciones de los investigadores clave. Igualmente es de interés mencionar antes de presentar las aportaciones individuales de cada autor, que varios de estos investigadores son coautores de algunos artículos seleccionados, por ello, se presentan al final en un apartado propio las aportaciones contenidas en los mencionados artículos.

Aportaciones de Francisco Juan Martínez Mojica

A partir de los artículos seleccionados para el autor “Francisco Juan Martínez Mojica”, se pueden destacar las siguientes aportaciones para cada artículo:

Para el artículo “Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites” (Mojica et al., 1993):

- Describe por primera vez la aparición de secuencias repetidas en arqueas; secuencias que con posterioridad se descubrirían como parte del sistema de defensa CRISPR. El autor expone que “se ha encontrado un tramo inusualmente largo de repeticiones en tándem de 30-34 pb, espaciadas por secuencias únicas de 35 a 39 pb, en el lado opuesto de la secuencia de reconocimiento de PstI y cada secuencia repetida también incluye repeticiones cortas invertidas. Estas repeticiones en tándem se extienden al menos 900 pb y podrían conducir a la configuración de estructuras secundarias peculiares.”

Para el artículo “Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferox mediterranei* and *Haloferox volcanii* and could be involved in replicon partitioning” (Mojica et al., 1995):

- Describe la presencia de secuencias repetidas en tándem; precursoras de la tecnología CRISPR. El autor informa de “la presencia de largos tramos de repeticiones en tándem en el genoma de Archaeas halófilas... Aunque el papel biológico preciso no puede determinarse por completo, todos los datos concuerdan con que las repeticiones en tándem están involucradas en la partición de replicón en las halobacterias”

Para el artículo “Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria” (Mojica et al., 2000):

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- El autor y sus colaboradores acuñan el acrónimo “SRSR”, “Short Regularly Spaced Repeats”, para referirse a las repeticiones encontradas. Según estos investigadores, las SRSR “son elementos cortos repetidos que generalmente ocurren en grupos, pero su principal peculiaridad es el diseño: siempre están espaciados regularmente por secuencias intermedias únicas de longitud constante. En aras de la claridad, y derivado de las características mencionadas, nos referiremos a los miembros de esta familia de repeticiones como Repeticiones Cortas Regularmente Espaciadas”

Para el artículo “Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements” (Mojica et al., 2005):

- Se teoriza por primera vez que las secuencias CRISPR podían formar parte de algún sistema inmune propio de organismos procarióticos. El autor concluye que “los espaciadores CRISPR se derivan de secuencias preexistentes, ya sea cromosómicas o dentro de elementos genéticos transmisibles, como bacteriófagos y plásmidos conjugativos. Sorprendentemente, estos elementos extracromosómicos no logran infectar la cepa portadora del espaciador específica, lo que implica una relación entre CRISPR y la inmunidad contra el ADN objetivo”.

Para el artículo “Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system” (Mojica et al., 2009).

- Demuestra como las secuencias PAM son específicas para cada sistema CRISPR-Cas y como estas determinan el objetivo de la interferencia. El investigador encontró que “la conservación de motivos adyacentes proto-espaciadores (PAM) es un tema común para los sistemas CRISPR más diversos. La secuencia PAM depende de la variante CRISPR-CAS, lo que implica que hay una elección de los espaciadores específica del tipo CRISPR (dirigida por el motivo), que posteriormente determina el objetivo de la interferencia. Los PAM también dirigen la orientación de los espaciadores.”

Aportaciones de Jennifer Anne Doudna

A partir de los artículos seleccionados para el autor “Jennifer Anne Doudna”, se pueden destacar las siguientes aportaciones para cada artículo:

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para el artículo “RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea” (Wiedenheft, *et al.*, 2012):

- El autor realiza una comparación entre los sistemas de silenciamiento en eucariotas y el sistema de defensa CRISPR para bacterias y arqueas. El artículo describe con los conocimientos que se tenían hasta ese momento el sistema CRISPR de arqueas y de bacterias, incidiendo en los sRNAs (small RNAs) como agentes del silenciamiento. El objetivo de este artículo es “comprender cómo se utilizan los ARN pequeños para encontrar y destruir ácidos nucleicos extraños” y como esto facilitaría el conocimiento de los sistemas de silenciamiento genético controlado por ARN.

Para el artículo “CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes” (Gilbert, *et al.*, 2013):

- El autor presenta el potencial de CRISPRi (Interferencia CRISPR) como herramienta general para la regulación precisa de la expresión génica en eucariotas. Describe como “a fusión de dCas9 a dominios efectores permite una represión/activación transcripcional estable y eficiente en células humanas y de levadura, con el sitio de entrega determinado únicamente por un ARN guía corto (single guide) coexpresado; como “el acoplamiento de dCas9 a un dominio represor transcripcional puede silenciar sólidamente la expresión de múltiples genes endógenos” y como “el análisis de RNA-seq indica que la represión transcripcional mediada por interferencia CRISPR (CRISPRi) es altamente específica”

Para el artículo “High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity” (Pattanayak, *et al.*, 2013):

- Este artículo confirma la especificidad de la nucleasa Cas9, aunque alerta de la posibilidad de cortes off-target cuando se sobrecarga la concentración del complejo guía de esta nucleasa. Los investigadores comprueban que respecto de “los modelos anteriores, los resultados muestran que la especificidad del ARN guía-Cas9 se extiende más allá de una secuencia semilla de 7 a 12 pares de bases. Nuestros resultados también sugieren una compensación entre la actividad y la especificidad *in vitro* y en las células, ya que un ARN guía más corto y menos activo es más específico que uno más largo y activo. Altas

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

concentraciones de complejos guía-ARN-Cas9 pueden escindir sitios off-target que contienen mutaciones cerca o dentro del PAM que no se escinden cuando las concentraciones de enzimas son limitantes”.

Para el artículo “Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression” (Qi, *et al.*, 2013):

- Los investigadores muestran como a partir de interferencia CRISPR (CRISPRi), se puede reprimir reversible y de eficientemente la expresión de genes específicos en *Escherichia coli*; genes diana y la potencial aplicación de esta tecnología en mamíferos. Los resultados publicados respaldan como “este sistema, que llamamos interferencia CRISPR (CRISPRi), puede reprimir de manera eficiente la expresión de genes específicos en *Escherichia coli*, sin efectos detectables fuera del objetivo. CRISPRi se puede utilizar para reprimir varios genes diana simultáneamente y sus efectos son reversibles. También mostramos evidencia de que el sistema puede adaptarse para la represión génica en células de mamíferos”.

Para el artículo “RNA-programmed genome editing in human cells” (Jinek, *et al.*, 2013):

- Los investigadores demuestran como a partir de la nucleasa Cas9 y por la unión a una hebra de ARN complementaria; se puede inducir en células humanas cortes del ADN bicatenario en sitios complementarios a la secuencia guía de ARN. Debido a que “Cas9 se ensambla con ARN guía híbridos en células humanas, puede inducir la formación de roturas de ADN de doble cadena (DSB) en un sitio complementario a la secuencia de ARN guía en el ADN genómico. Esta actividad de escisión requiere tanto Cas9 como la unión complementaria del ARN guía.

Para el artículo “DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9” (Sternberg, *et al.*, 2014):

- En este artículo se ha determinado como Cas9 utiliza el reconocimiento de la secuencia PAM para identificar rápidamente sitios potenciales de destino para regular la escisión de ADN bicatenario. Se ha mostrado como “la unión y escisión del ADN por Cas9-RNA requieren el reconocimiento de un motivo adyacente de protoespaciador de

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

trinucleótido corto (PAM)” y como “los ensayos de competencia proporcionan la evidencia de que la separación de la cadena de ADN y la formación de heterodúplex de ARN-ADN se inician en el PAM y avanzan direccionalmente hacia el extremo distal de la secuencia objetivo ya que las interacciones de PAM desencadenan la actividad catalítica de Cas9”.

Para el artículo “Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery” (Lin, *et al.*, 2014):

- En este artículo se demuestra como a partir de los cortes realizados por la endonucleasa Cas9, se puede inducir una HDR de alta eficiencia en células humanas y con una mortalidad celular baja. El experimento prueba como “se puede introducir nueva información genética específica del sitio y con alta eficiencia mediante la reparación dirigida por homología (HDR) de roturas de ADN de doble cadena específicas del sitio inducidas por Cas9 mediante la entrega programada de complejos de ribonucleoproteína de ARN (RNP) guía de Cas9”.

Para el artículo “Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering” (Wright, *et al.*, 2016):

- Este artículo es una revisión donde se tratan “los avances recientes en la comprensión de los diversos mecanismos por los cuales las proteínas Cas responden a los ácidos nucleicos extraños y cómo estos sistemas se han aprovechado para la manipulación precisa del genoma en una amplia gama de organismos”.

Para el artículo “CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms” (Jiang y Doudna, 2017):

- Este artículo es una revisión que tiene como objetivo proporcionar una comprensión mecánica y estructural profunda de corte, de ADN, ARN dependiente mediante Cas9. A partir de estos conocimientos se proporciona “un marco para la ingeniería destinada a alterar la función catalítica, guiar la especificidad del ARN, los requisitos de PAM y reducir la actividad fuera del objetivo para el desarrollo de terapias basadas en Cas9 contra enfermedades genéticas”.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para el artículo “CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering” (Knott y Doudna, 2018)

- Este artículo establece distinciones entre la tecnología CRISPR-Cas y otras tecnologías con capacidad de edición génica y valora la evolución de las aplicaciones de esta tecnología. Los autores describen “los mecanismos básicos que distinguen al conjunto de herramientas CRISPR-Cas de otras tecnologías de edición de genes programables, destacando los sistemas diversos y evolucionados naturalmente ahora funcionalizados como biotecnologías. También, se discute el panorama en rápida evolución de las aplicaciones CRISPR-Cas, desde la edición de genes hasta la regulación transcripcional y el diagnóstico”.

Para el artículo “CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity” (Chen, *et al.*, 2018):

- Describe la herramienta basada en CRISPR-Cas DETECTR (reportero trans CRISPR dirigido por endonucleasa de ADN), como un método de detección rápida específica de virus, en este caso para el virus del papiloma humano. Los investigadores muestran “que la unión de ADN guiada por ARN desencadena una actividad de escisión indiscriminada de ADN monocatenario por Cas12a que degrada completamente las moléculas de ADN monocatenario. Al combinar la activación de Cas12a desoxirribonucleasa monocatenaria con la amplificación isotérmica, creamos un método denominado reportero trans CRISPR dirigido por endonucleasa de ADN (DETECTR), que logra una sensibilidad atómica para la detección de ADN. DETECTR permite la detección rápida y específica del virus del papiloma humano en pacientes, proporcionando así una plataforma sencilla para el diagnóstico molecular.”

Aportaciones de Emmanuelle Charpentier

A partir de los artículos seleccionados para el autor “Emmanuelle Charpentier”, se pueden destacar las siguientes aportaciones para cada artículo:

Para el artículo “CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III” (Deltcheva, *et al.*, 2011):

- Este estudio revela una nueva vía de maduración del sRNA guide y el primer ejemplo de un factor huésped (RNasa III) necesario para la

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

inmunidad mediada por ARN bacteriano. Los investigadores muestran que “tracrRNA dirige la maduración de crRNAs por las actividades de la RNasa III endógena ampliamente conservada y la proteína Csn1 asociada a CRISPR; todos estos componentes son esenciales para proteger a *S. pyogenes* contra el ADN derivado de profagos”.

Para el artículo “Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems” (Chylinski, *et al.*, 2014):

- Este artículo aporta un censo actualizado para ese momento (2014) de sistemas CRISPR-Cas; abordando el estudio de sistemas CRISPR tipo II, un tipo ausente en arqueas y poco extendido en bacterias. También identificaron homólogos de Cas9. “Los sistemas de tipo II son los más raros, faltan en las arqueas y están representados en el 5% de los genomas bacterianos, con una sobrerrepresentación entre patógenos y comensales”. Los autores lograron caracterizar “homólogos distantes de Cas9 entre proteínas codificadas por diversos transposones, lo que sugiere que CRISPR-Cas tipo II evolucionó a través de la recombinación de genes de nucleasas móviles con loci tipo I”.

Para el artículo “The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA” (Fonfara, *et al.*, 2016):

- Este estudio presenta una nueva familia de endorribonucleasas y endonucleasas duales, demostrando que el tipo V-A constituye sistema CRISPR-Cas más sencillo descrito hasta esa fecha (2016). Los investigadores demuestran como el “tipo V-A Cpf1 de *Francisella novicida* es una nucleasa dual específica para la biogénesis de crRNA y la interferencia del ADN objetivo”. Describen el mecanismo de acción de esta endonucleasa, afirmando que “Cpf1 escinde pre-ARNcr up-stream de una estructura de horquilla formada dentro de las repeticiones CRISPR y, por lo tanto, genera ARNcr intermedios que se procesan aún más, lo que lleva a ARNcr maduros. Después del reconocimiento de un motivo adyacente del protoespaciador 5'-YTN-3' en la hebra de ADN que no es el objetivo y el posterior sondeo de una secuencia semilla de ocho nucleótidos, Cpf1, guiado por el crRNA espaciador de repetición maduro único, introduce cortes de doble cadena en el ADN objetivo para generar una protuberancia 5'”.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para el artículo “The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward” (Hille, *et al.*, 2018):

- Este artículo es una revisión de diferentes “sistemas CRISPR-Cas y de los mecanismos de las etapas de la inmunidad CRISPR-Cas: adaptación, biogénesis de crRNA e interferencia. También se discuten la ecología y regulación de CRISPR-Cas en el contexto de la infección por fagos y los roles de estos sistemas más allá de la inmunidad”.

Aportaciones de Feng Zhang

A partir de los artículos seleccionados para el autor “Feng Zhang”, se pueden destacar las siguientes aportaciones para cada artículo:

Para el artículo “DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases” (Hsu, *et al.*, 2013):

- Este estudio caracteriza la especificidad de orientación de Sp Cas9 en células humanas; como informador de sitios objetivo y para evitar efectos off-target. Los investigadores encontraron que “SpCas9 tolera los desajustes entre el ARN guía y el ADN objetivo en diferentes posiciones de una manera dependiente de la secuencia, sensible al número, la posición y la distribución de los desajustes. También que la escisión mediada por SpCas9 no se ve afectada por la metilación del ADN y que la dosis de SpCas9 y sgRNA se puede titular para minimizar la modificación fuera del objetivo”.

Para el artículo “Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity” (Ran, *et al.*, 2013a):

- Los investigadores presentan un sistema para reducir la actividad off-target de 50 a 1500 veces, sin sacrificar el corte en el objetivo. Este “enfoque combina un mutante de nickasa Cas9 con ARN guía emparejados para introducir roturas de doble cadena específicas. Debido a que los cortes individuales en el genoma se reparan con alta fidelidad, se requieren eventos de corte simultáneos a través de ARN guía adecuadamente compensados para roturas de doble cadena; lo que amplía el número de bases reconocidas específicamente para la escisión del objetivo.”

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para el artículo “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system” (Ran, *et al.*, 2013b):

- Este artículo describe “un conjunto de herramientas para la edición del genoma mediada por Cas9 a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR) en células de mamíferos”.

Para el artículo “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems” (Cong, *et al.*, 2013):

- En este artículo los investigadores demostraron como las nucleasas Cas9 pueden ser dirigidas por ARN para inducir cortes precisos en células humanas y de otros mamíferos. Afirmaron que "Cas9 también se puede convertir en una enzima de corte para facilitar la reparación dirigida por homología (HDR) con una actividad mutagénica mínima". Además, se descubrió la capacidad de CRISPR para “codificar múltiples secuencias guía en una sola matriz CRISPR y permitir la edición simultánea de varios sitios dentro del genoma de los mamíferos”.

Para el artículo “One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering” (Wang, *et al.*, 2013):

- Los autores presentan una técnica de edición de genes mediada por CRISPR/Cas que permite la interrupción simultánea de genes de ratón con alta eficiencia y en un solo paso. A partir de “la coinyección de ARNm de Cas9 y ARN simple guide (sgRNA) dirigidos a una pareja de genes en cigotos, generó ratones con mutaciones bialélicas en ambos genes con una eficiencia del 80%. Finalmente, mostramos que la coinyección de mRNA/sgRNA de Cas9 con oligos mutantes generó mutaciones puntuales precisas simultáneamente en dos genes diana”.

Para el artículo “RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems” (Jiang, *et al.*, 2013):

- El artículo presenta un protocolo de trabajo con CRISPR-Cas9, en el que mediante ARN dual se pueden introducir mutaciones precisas en los genomas de *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*. El protocolo “se basa en la escisión dirigida por doble ARN:Cas9 en el sitio genómico objetivo para matar células no mutadas y evitar la necesidad

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

de marcadores seleccionables o sistemas de contraselección. Se reprogramó la especificidad del doble ARN:Cas9 cambiando la secuencia de ARN CRISPR corto (ARNcr) para realizar cambios de un solo nucleótido y de varios nucleótidos en las plantillas de edición. El uso simultáneo de dos crRNA permitió la mutagénesis múltiple”.

Para el artículo “Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering” (Hsu, *et al.*, 2014):

- Este artículo es una revisión, en la que se describe “el desarrollo y las aplicaciones de Cas9 para una variedad de aplicaciones de investigación o traducción”. La revisión recoge como “Cas9 se puede utilizar para facilitar una amplia variedad de aplicaciones específicas de ingeniería genómica. Cas9 ha permitido una modificación del genoma eficiente y dirigida en muchas especies que han sido intratables utilizando técnicas tradicionales de manipulación genética. La facilidad de redirigir Cas9 simplemente diseñando una secuencia de ARN corta también permite experimentos imparciales de perturbación del genoma a gran escala para probar la función del gen o dilucidar las variantes genéticas causales. Además, también se puede convertir en un dispositivo homing genérico guiado por ARN (dCas9) al inactivar los dominios catalíticos”.

Para el artículo “Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells” (Shalem, *et al.*, 2014):

- Este artículo demuestra como a partir de un sistema de entrega lentiviral de una biblioteca de "Knock-Out de CRISPR-Cas9 a escala de genoma" (GeCKO), dirigida a genes con secuencias guía únicas se permite la detección de selección negativa y positiva en células humanas. Para ello, utilizaron “la biblioteca GeCKO para identificar genes esenciales para la viabilidad celular en cáncer y células madre pluripotentes. A continuación, en un modelo de melanoma, se analizaron los genes cuya pérdida está implicada en la resistencia al vemurafenib, un inhibidor terapéutico de la RAF (un tipo de quinasa)”.

Para el artículo “Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening” (Sanjana, *et al.*, 2014):

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- En este artículo los investigadores, proponen mejorar el sistema planteado anteriormente, el sistema GeCKO, logrando un aumento de aproximadamente diez veces en el título viral funcional. “Buscamos mejorar tanto el empaquetamiento lentiviral como la elección de secuencias guía en nuestra biblioteca original. Se propone un nuevo vector capaz de producir virus de mayor título, haciendo varias modificaciones; la eliminación de una de las señales de localización nuclear, la optimización del codón humano de la señal de localización nuclear restante y de las secuencias del enlazador bicistrónico P2A”.

Para el artículo “Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System” (Zetsche, *et al.*, 2015):

- En este artículo, los investigadores caracterizan y presentan a Cpf1; una endonucleasa que a diferencia de Cas9 no requiere un trans activador de ARN. Los investigadores presentan a Cpf1 como “una endonucleasa guiada por ARN que carece de tracrRNA y que utiliza un motivo adyacente al protoespaciador rico en T. Además, Cpf1 escinde el ADN a través de una ruptura de doble cadena de ADN escalonada”. Proponiendo un nuevo tipo de nucleasa con potencial mejorador de la herramienta CRISPR-Cas.

Para el artículo “Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex” (Konermann, *et al.*, 2015):

- En este artículo, los investigadores describen un método de ingeniería guiada por el complejo CRISPR-Cas9 con el que mediar eficientemente en la activación transcripcional en loci genómicos endógenos. Los autores emplearon “complejos de activación Cas9 diseñados para investigar las reglas de orientación del ARN single guide (sgRNA) para la activación transcripcional efectiva, con la que demostrar la activación multiplexada y simultanea de diez genes”.

Para el artículo “In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9” (Ran, *et al.*, 2015):

- Este artículo propone la utilización de nucleasas Cas9 de *Staphylococcus aureus*, como alternativa a las nucleasas generalmente empleadas de *Streptococcus pneumoniae*; debido a su tamaño inferior y

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

unos niveles de eficiencia y especificidad similares. Los autores caracterizaron "seis ortólogos Cas9 más pequeños y mostraron que Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) puede editar el genoma con eficiencias similares a las de SpCas9, mientras que es más de 1 kilobase más corto. Se empaquetó SaCas9 y su casete de expresión de ARN guía único en un solo vector AAV y se dirigió al gen regulador del colesterol Pcsk9 en hígado de ratón".

Aportaciones conjuntas Mojica-Charpentier y Doudna-Charpentier

Tras la selección de artículos y como cabe esperar, se encontró que, para algunas publicaciones, varios autores clave eran coautores del mismo artículo, por lo que para no repetir información se ha considerado presentar esta información en un solo apartado. Esta característica afecta principalmente a Emmanuelle Charpentier, que comparte varios artículos con Jennifer Anne Doudna y varios con Francisco Juan Martínez Mojica. Se pueden destacar las siguientes aportaciones para cada artículo:

Para el artículo de Francisco Juan Martínez Mojica y Emmanuelle Charpentier "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems" (Makarova *et al.*, 2011):

- Este artículo proporcionaba un análisis actualizado para ese momento (2011) de las relaciones evolutivas entre los sistemas CRISPR-Cas y las proteínas Cas. Esta revisión propone "una clasificación 'politética' que integra las filogenias de los genes cas más comunes, la secuencia y organización de CRISPR y la arquitectura de los loci CRISPR-Cas".

Para el artículo de Francisco Juan Martínez Mojica y Emmanuelle Charpentier "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems" (Makarova *et al.*, 2015):

- En este artículo, los investigadores proponen una nueva clasificación para abarcar ahora 2 clases, 5 tipos y 16 subtipos. Igualmente, los autores han teorizado que "la relativa estabilidad de la clasificación sugiere que las variantes más frecuentes de los sistemas CRISPR-Cas ya se conocen. Sin embargo, la existencia de variantes raras, actualmente inclasificables, implica que quedan tipos y subtipos adicionales por caracterizar".

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Para el artículo de Francisco Juan Martínez Mojica y Emmanuelle Charpentier “Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, a burst of class 2 and derived variants” (Makarova *et al.*, 2020):

- Este artículo, actualiza la clasificación anteriormente presentada, (Makarova *et al.*, 2015), en ella los investigadores proponen 2 clases, 6 tipos y 33 subtipos. Esta clasificación introduce novedades como “el descubrimiento de numerosas variantes derivadas de CRISPR-Cas, asociadas con elementos genéticos móviles que carecen de las nucleasas necesarias para la interferencia y el descubrimiento de numerosas familias de genes auxiliares vinculados a CRISPR, a menudo implicados en la transducción de señales”.

Para el artículo de Jennifer Anne Doudna y Emmanuelle Charpentier “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity” (Jinek *et al.*, 2012):

- Este artículo, marcó un punto de inflexión para esta tecnología. Las investigadoras Doudna y Charpentier fueron galardonadas por la Real Academia sueca de Ciencias (2020), por las contribuciones que aportaron, con el premio Nóbel de Química. Por primera vez, describen un sistema CRISPR fundamentado en Cas9; que destaca por su potencial “para la edición del genoma y programable por ARN”. En palabras de los investigadores, “nuestro estudio revela una familia de endonucleasas que utilizan ARN duales para la escisión de ADN de un sitio específico”. Supone “una metodología alternativa basada en Cas9 programado por ARN que podría ofrecer un potencial considerable para aplicaciones de selección de genes y edición de genomas”.

Para el artículo de Jennifer Anne Doudna y Emmanuelle Charpentier “Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation” (Jinek, *et al.*, 2014):

- Este artículo reveló el núcleo estructural de las proteínas de la familia Cas9. El núcleo de las estructuras de Cas9 “definen hendiduras de unión de ácidos nucleicos, y muestran que los dos lóbulos estructurales que albergan estas hendiduras experimentan una reorientación inducida por el ARN guía para formar un canal central donde se unen los

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

sustratos de ADN”. Además, los investigadores descubrieron que “la carga del ARN guía es un paso clave en la activación del dominio Cas”.

Para el artículo de Jennifer Anne Doudna y Emmanuelle Charpentier “The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9” (Doudna y Charpentier, 2014):

- Este artículo revisa la historia de la biología CRISPR “desde su descubrimiento inicial hasta la elucidación del mecanismo de la enzima CRISPR-Cas9, utilizado para modificar, regular o marcar loci genómicos en una amplia variedad de células y organismos de los tres dominios vivos”. Estos resultados suponen “una nueva era en la que la manipulación genómica ya no es un cuello de botella para los experimentos, lo que allana el camino hacia descubrimientos fundamentales en biología, con aplicaciones en todas las ramas de la biotecnología, así como diferentes estrategias para la terapéutica humana”.

Discusión bioética

A propósito de la tecnología CRISPR-Cas, se vuelve pertinente el correcto control y la administración de esta herramienta de inmenso potencial disruptivo. El empleo de la tecnología CRISPR-Cas en el campo de la edición genética plantea numerosos inconvenientes bioéticos, más si cabe cuando esta edición se dirige a los seres humanos, a cultivos de células de origen humano o incluso, directamente en individuos humanos. Por ello y como toda tecnología que converge con el hombre, ha de ser guiada para su correcto desarrollo y respeto de los principios que rigen a este. La revisión trata cuestiones puramente éticas, que podrán considerarse dentro o fuera del marco legal, mas, no modifica esto la evaluación. Debido a que en numerosos países existen legislaciones permisivas, no solo con la investigación sino con la aplicación directa en humanos y a diferentes niveles, esta cuestión, no se tratará; igualmente, incluso se han notificado numerosas transgresiones de esta legislación y no por ello esto ha supuesto una modificación del tratamiento ético.

Tecnología CRISPR-Cas en células somáticas

Tratando la primera posible línea de trabajo que presenta la tecnología CRISPR-Cas, hay que referirse a la edición en línea somática o edición de células somáticas. La edición de células humanas a diferencia de la edición de células sexuales o edición en la línea germinal no supone la modificación de características de naturaleza heredable,

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

es decir, aquellos cambios que se apliquen en un paciente se mantendrán íntegramente en esa paciente, sin comprometer la herencia genética de este. Por ello y cuantitativamente hablando, es un problema que afectaría, en principio, únicamente al propio individuo. No obstante, desde la antropología cristiana y desde las propias ciencias biomédicas, esta cuantificación no es correcta y por ello, se aprecian otros factores en la ecuación que escapan a la consideración de esta como una realidad individual, de tal manera, que se convierte en una dimensión que no solo afecta a esa persona, sino al conjunto de la humanidad.

Siguiendo el esquema planteado en la *Figura 3*, la revisión sobre una posible edición en células somáticas puede responder a diferentes realidades. Estas realidades plantean diferentes cuestiones éticas que surgen mientras se tratan los casos. Abordando el punto 1 que propone esta clasificación “Principio de defensa de la vida humana”; se presenta un caso en el que la vida y salud del individuo está en peligro. Se trata la edición de células somáticas de fetos en el útero materno, y “como puede justificarse médicamente cuando una enfermedad tiene un inicio temprano y efectos irreversibles. Además, la plasticidad de las células fetales puede proporcionar importantes beneficios científicos cuando la edición del genoma se realiza en el útero. Sin embargo, dicho uso plantearía la cuestión ética de no poder obtener el consentimiento del feto” (Coller, 2019). La edición genética en fetos plantea el inconveniente directo del consentimiento informado, no obstante, no es específico de esta práctica, ya que cualquier otro proceso de edición que se vaya a realizar en humanos debe conllevar el conocimiento previo del paciente, un consentimiento informado y transparente de lo que supone el proceso. Este consentimiento además de incluirse en el trato médico-paciente, también supone una relación contractual que legalmente y en la medida que se mantiene la confidencialidad y el anonimato del paciente, por la naturaleza del procedimiento, se ha de comunicar a la sociedad; es decir, el resto de las personas merece conocer la naturaleza de estas tecnologías con claridad y transparencia, conocer los riesgos y las valoraciones éticas; procedimiento que no siempre se ha respetado (Caso “He Jiankiu”) (Harper y Schatten, 2019; Alsomali y Hussein, 2021). Regresando a la cuestión del consentimiento en la situación del feto, con la defensa primordial de la vida y como única posibilidad para proteger la vida del no nacido, prima antes esta defensa de la vida que el consentimiento de este y por ello se ha de permitir esa edición. Esta cuestión es irresoluble, pero puede ser parcialmente atajada por vía del consentimiento de los progenitores, siendo la solución aceptada esta. Aunque la edición somática se dirige únicamente a este tipo de células, la posibilidad de obtener resultados off-target es

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

una realidad, fruto generalmente, de la necesidad de perfeccionar las técnicas de edición somática y de las dificultades en ciertas situaciones, como la edición somática fetal comentada. “La edición de las células de un feto en el útero puede aumentar los riesgos de una edición involuntaria de la línea germinal, especialmente si la edición ocurre antes de que las células germinales sean secuestradas de las células somáticas” (Coller, 2019). Por ello, se precisa del perfeccionamiento de la técnica y de una correcta ejecución, que no comprometa la integridad del linaje del individuo y ni la seguridad de este, ya que entre los “resultados off-target” no solo se encuentra la edición de la línea germinal sino posibles modificaciones somáticas que pueden resultar peligrosas e incluso letales para el individuo.

Con ello y avanzando al segundo y tercer principio de esta clasificación respectivamente, *Figura 3*, “Principio de totalidad terapéutico” y “Principio de libertad y responsabilidad” se pueden tratar diferentes aplicaciones. “Si los riesgos pueden minimizarse, CRISPR podría conducir a la eliminación de una serie de enfermedades, antes del nacimiento, a la luz de nuestro conocimiento y comprensión cada vez mayores de los vínculos genéticos con diversas enfermedades. Por lo tanto, la edición de genes somáticos podría convertirse en un cambio de juego, no solo en el tratamiento de una amplia gama de trastornos hereditarios graves, particularmente mendelianos, sino también en la erradicación genética de enfermedades infecciosas y cáncer” (Marinelli y Del Rio, 2020). Tratando esta consideración y por vía de las terapias génicas somáticas y especialmente mediante la herramienta CRISPR-Cas, se abre la posibilidad de tratar numerosas enfermedades como “la hemofilia B, la fibrosis quística, el VIH, la distrofia muscular de Duchenne, la enfermedad de Huntington o diferentes enfermedades neurodegenerativas” (National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2017). Ejemplificando algunas de las propuestas anteriores, estas, “implican la alteración del gen, siempre que la administración de la nucleasa no provoque la pérdida de las células tratadas debido a la toxicidad o al rechazo inmunitario. Entre estas aplicaciones se encuentran la interrupción de mutaciones dominantes y repeticiones de triplete expandidas en algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, y la reconstitución de una distrofina funcional en la distrofia muscular de Duchenne mediante la eliminación o la omisión forzada del exón que porta la mutación causante de la enfermedad” (National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2017). Valorando estas potenciales aplicaciones y observando un fin únicamente terapéutico y en tanto que no entrañe un riesgo añadido, la posibilidad de aplicar estas terapias basadas en esta herramienta se verían con buenos ojos, siempre y cuando se

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

respeten estos principios y tras el adecuado perfeccionamiento de la técnica y los ensayos pertinentes. La tecnología CRISPR-Cas ha de estar al servicio del hombre en este caso cuando es evitable este daño y cuando es potencialmente curable.

No obstante, cabe recordar que recurriendo al principio de solidaridad; la tecnología CRISPR-Cas, como medio tiene que estar abierta a toda la humanidad. Existe un riesgo muy alto de que se establezcan regímenes de acceso a esta tecnología y se limite indiscriminadamente su acceso. Es un deber social, aunque especialmente quedan empleados aquellos que legalmente se encargan de regular estas cuestiones; "los legisladores de diferentes países deben encontrar puntos en común y cooperar, para evitar tendencias como el 'turismo sanitario'" (Napoletano, *et al.*, 2021). Con ello y aprovechando la ventaja económica que introduce el tratamiento con CRISPR-Cas9, es importante que se garantice el acceso universal a esta herramienta. Este concepto, por ejemplo, en China, supone un potencial problema; "la falta de atención a la equidad en la distribución de beneficios, debido a la baja accesibilidad y asequibilidad de las tecnologías de edición de genes para el público, puede aumentar la brecha entre diferentes grupos y aumentar los efectos de las diferencias genéticas entre individuos" (Zhang y Lie, 2018); y con ello suponer una reticencia a la implantación de esta tecnología. Pues, "para que la tecnología realmente beneficie a la sociedad, tendría que estar fácilmente disponible para todas las personas sin importar su estado demográfico o socioeconómico. Sin esta estipulación, corremos el riesgo de crear una desigualdad cada vez mayor en el mejor de los casos y dos especies de seres humanos, uno probablemente percibido como mejor que el otro, en el peor de los casos" (Pavlovic, *et al.*, 2020).

Para concluir con la revisión sobre células somáticas, hay que destacar que, dentro del propósito de esta tecnología; es importante que los cambios se mantengan durante el tratamiento, que, siendo modificaciones permanentes del genoma individual, este periodo de tratamiento presenta una duración "infinita" supeditada al tiempo de vida del individuo. La opción de la terapia somática terapéutica introduce para muchos pacientes la cuestión de que "vale la pena vivir y es posible el bienestar del individuo" (Liao, 2018). La tecnología CRISPR-Cas ha demostrado ser efectiva como se ha mencionado con anterioridad, mas, se han descubierto en varios estudios que "la inducción por CRISPR de un sistema de reparación del ADN mediado por p53, revierte las modificaciones realizadas" (Aznar y Gómez-Tatay, 2019). Con ello, mantener la llamada al perfeccionamiento de la técnica para evitar los propios sistemas biológicos de reparación y de eliminación de esta tecnología; trabajar con la certeza y evitando la experimentación innecesaria en un paciente por falta de investigación previa.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

Tecnología CRISPR-Cas en línea germinal

Tratando la segunda posible línea de trabajo que presenta la tecnología CRISPR-Cas, hay que referirse a la edición en línea germinal o edición de células sexuales. La tecnología CRISPR-Cas9, introduce un nuevo abanico de posibilidades en el campo de la edición genética, especialmente en lo relativo a la edición de gametos e incluso de embriones. La tecnología CRISPR abre la puerta a conceptos propios del género de la Ciencia-Ficción; conceptos como el “human enhancement” o el diseño de bebés. Estos extremos de la tecnología CRISPR, de ser llevados a cabo, se darían en las células germinales; debido a que con el diseño de una semilla (gameto o embrión) se puede construir un árbol (individuo formado) que cumple perfectamente una serie de especificaciones. La modificación de estos tipos celulares supone eliminar, teóricamente, el azar del proceso de desarrollo de un ser humano, y evidentemente no solo por los riesgos que entraña, sino por las consideraciones que se han de tener en cuenta, requiere de un férreo estudio bioético.

En principio, se pueden usar diferentes estrategias para modificar el genoma de la línea germinal. “En primer lugar, se pueden inyectar sistemas de edición en el cigoto humano, lo que da lugar a embriones modificados genéticamente. En segundo lugar, la edición de genes puede emplearse en células germinales humanas (espermatozoides u óvulos) o sus progenitores. En tercer lugar, las modificaciones genéticas se pueden aplicar a las células madre pluripotentes, que luego podrían convertirse en gametos y usarse para la fertilización” (Ranisch, 2020).

Como se ha tratado anteriormente, introducir la posibilidad de editar una célula germinal supone potencialmente editar un linaje completo. La edición de células sexuales como espermatozoides u óvulos humanos supone que, si esas células se fusionan con la complementaria, aquella información contenida en ese embrión se incorporará a la herencia genética de ese linaje por lo que toda la descendencia se verá afectada de la edición, aunque se sucedan las generaciones. Este concepto, sin entrar todavía en consideraciones bioéticas se puede convertir en un arma de doble filo, pues el cambio, si escapara al control podría producir efectos indefinidos y, en cualquier caso, efectos permanentes en los individuos de esa línea genética. Si se incorpora además el concepto de “gene drive” aplicado a CRISPR en la línea germinal, los efectos serían aún más devastadores, debido a que las modificaciones CRISPR se verían sobreexpresadas dentro de la descendencia esperada.

Actualmente, “el riesgo de la edición de genes de la línea germinal humana sigue siendo alto” (Zhang y Lie, 2018). Con ello, las posibles aplicaciones han de ser

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

suficientes como para “dados los riesgos asociados con la edición terapéutica de la línea germinal” (Gumer, 2019) poder seguir adelante. Por ejemplificar, “en 2015, un grupo de investigadores chinos dirigido por Junjiu Huang aplicó CRISPR-Cas9 para eliminar una mutación que causa la β -talasemia, que es una enfermedad sanguínea mortal, del gen de la β -globulina humana en la línea germinal de embriones humanos. En esta investigación se utilizaron seis embriones anormales no aptos para la fecundación in vitro. La mutación se pudo corregir en solo uno de los embriones. Aunque la mutación pudo corregirse en otros dos embriones, se produjeron efectos no deseados en otros genes. En los otros tres embriones no se pudo corregir la mutación” (Ayanoğlu, *et al.*, 2020). La conclusión es que la falta de perfeccionamiento de la técnica supone en la actualidad un problema de aplicación, que sin entrar en consideraciones bioéticas imposibilita hasta la fecha ciertas intervenciones, por ello, es conveniente la investigación en líneas cercanas a la modificación de células en la línea germinal, como es el ejemplo de la “mitoCas9, cuya localización está restringida a la matriz mitocondrial y reduciría el riesgo de mutaciones fuera del objetivo (off-target) en los embriones y los futuros hijos” (Gómez-Tatay, *et al.* 2017).

Abordando directamente las consideraciones de carácter rigurosamente bioético y recurriendo una vez más a la *Figura 3*, tratando el tercer principio “Principio de libertad y responsabilidad”, y a colación del principio de “nexo verdad-vida (naturaleza)-libertad”; la intervención por vía de esta herramienta en la herencia de un linaje plantea una problemática, que no solo va unida a la mencionada falta de eficiencia actual y aparición de modificaciones postratamiento y difícilmente rastreables; si no que en el mejor de los casos en el que solo introdujera beneficios en la línea germinal, no se respetan numerosos principios morales. Como se ha comentado con anterioridad, uno de ellos se refiere al “consentimiento informado por parte del individuo que acepta participar en el estudio de investigación como principio fundamental de la experimentación humana. El individuo debe aceptar los riesgos potenciales para tener la oportunidad de disfrutar de los beneficios potenciales” (Coller, 2019). Este principio no puede cumplirse plenamente en tanto a que el primer eslabón podrá dar su consentimiento mientras que el resto de los eslabones depositan involuntariamente su consentimiento en este primero. El consentimiento informado es un ejemplo claro de choque de esta tecnología con el principio de solidaridad, libertad y de subsidiaridad, pues los futuros individuos pertenecientes al linaje serán esclavos de la decisión de este primer eslabón, incapacitados para desarrollarse de forma totalmente libre, sino que establecen una dependencia, que, aunque todo ser humano depende íntimamente de su propio cuerpo, esta dependencia es impuesta y por un ser humano previo. Junto

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

a este concepto, detractores del uso de esta técnica comentan que “los usos reproductivos de CRISPR crean personas sanas cuya existencia no es inevitable en primer lugar” (Rulli, 2019), es decir, el primer principio “Principio de defensa de la vida humana” y en la cuestión de si es la “mejor forma para salvar la vida o la salud” se falta a todo rigor bioético, se hace un mal uso de la herramienta; lo que como se ha podido demostrar, entraña grandes riesgos.

Cabe introducir la cuestión, que, desde la mano del hombre se llega a interponer un desafío a la “Creación de Dios”; “la tradición judeocristiana occidental dominante reconoce la legitimidad y la importancia de las intervenciones médicas para proteger la salud humana basándose en la creencia de que los humanos están hechos a imagen de Dios y, por lo tanto, los humanos tienen la obligación de proteger la creación de Dios” (Coller, 2019). Mas, alterar la naturaleza del hombre con la edición en la línea germinal humana “para mejorar el rendimiento humano o incluso reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad al realizar cambios novedosos en la secuencia de ADN” (Coller, 2019), es una cuestión que rompe con los principios bioéticos, es meramente un acto de soberbia y endiosamiento, que de ningún modo se debe permitir.

Otra de las preocupaciones añadidas a la ejecución de esta técnica, es una cuestión que va estrechamente asociada a la línea germinal, y es el uso de embriones en investigación. La edición mediante CRISPR-Cas de embriones supone para los procesos de investigación y en estadios finales, con una técnica que estuviese perfeccionada, el empleo de embriones, generalmente de un número “útil” de embriones, suficiente como para garantizar el correcto desarrollo de la investigación. En esto, entra el concepto de desechar aquellos embriones no viables para el estudio o aquellos embriones que, aun siendo viables, hayan sufrido problemas relacionados con su manipulación. Si se considera al embrión preimplantado como un potencial ser humano, cabe destacar que la experimentación con estos, y la destrucción de la totalidad o de una gran parte de los mismos es una práctica reprochable y evitable; esta consideración se puede regir, por ejemplo, por características como “El ser poseedor de identidad genética propia; el diálogo genético que se puede establecer entre el embrión y la madre o el control genético de la diferenciación celular del propio embrión” (Aznar y Pastor, 2017). La experimentación, como se ha comentado, se dificulta por estos requerimientos éticos, no obstante, existe una posibilidad éticamente menos reprochable y es el empleo de embriones no viables, como son los embriones 3PN; originados de procesos anteriores y no extraídos de propio para la investigación. El uso de la herramienta CRISPR-Cas en embriones humanos 3PN se ha llevado a cabo exitosamente (Kang, *et al.*, 2016); sin embargo, lo que en un principio suponía

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

trabajar “sobre embriones no viables sobrantes de tratamientos de fecundación *in vitro* y que garantizaba que no podrían utilizarse para promover un embarazo, pronto pasó a utilizarse embriones viables y, como dato llamativo, en uno de los trabajos estos eran producidos mediante clonación, expresamente para su uso en investigación, lo que tiene implicaciones éticas adicionales, por el hecho de producir seres humanos con el objetivo de investigar con ellos” (Aznar y Gómez-Tatay, 2019).

Paralelamente al empleo de embriones no viables, la herramienta CRISPR-Cas, ofrece la posibilidad de transformar embriones no viables en embriones viables. Técnicamente, permitiría la reparación del embrión y la transformación en viable. “Aparte de la amplia aplicabilidad de la modificación de la línea germinal, varias fuentes han propuesto que esta técnica tiene ventajas morales sobre la selección de embriones” (Ranisch, 2020). En el caso de la selección *in vitro*, solo los embriones con un genotipo adecuado se transfieren al útero después de las pruebas genéticas, mientras que los embriones con anomalías genéticas o embriones sobrantes normalmente se descartan. Por ello, “esta herramienta podría, al menos en teoría, “reparar” los embriones afectados, lo que la convierte en una herramienta única para las intervenciones en embriones de preimplantación. Esto podría estar justificado si es probable que esta investigación de edición del genoma reduzca la pérdida global de embriones a largo plazo.” (Ranisch, 2020). No obstante, manteniendo que estos procedimientos generasen cambios a nivel germinal, es decir, cambios en el embrión heredables en su descendencia, la práctica compromete la serie de principios enumerados con anterioridad y devuelve el debate a este punto anterior.

Finalmente, y como cuestión final a tratar de la edición por CRISPR-Cas, se trata la posibilidad de “diseño de seres humanos” y con ello la perspectiva del “Enhancement” o mejoramiento genético. La edición genética y especialmente la modificación con la herramienta CRISPR-Cas permite el diseño teórico de embriones y con ello de seres humanos. Aunque no se han alcanzado actualmente la capacidad de diseñar un ser humano desde cero actualmente es una realidad la posibilidad de diseñar ciertas características. Antes de la aparición de las terapias génicas basadas en CRISPR, el concepto de “Bebés de diseño”, se utilizaba en otro contexto, se refería a la producción de embriones libres de enfermedades y que, por reproducción asistida, eran “diseñados” para actuar como donantes de material con el que poder salvar a sus hermanos, mayores, enfermos y necesitados del tejido que el hermano podrá brindarle. Por ejemplo, “un diagnóstico genético previo a la implantación para evitar trastornos genéticos graves basado en la selección de embriones según el riesgo de Alzheimer” (So, *et al.*, 2017). El sistema era el siguiente, “a partir de los gametos de

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

los progenitores se genera un número indeterminado de embriones, normalmente no menos de ocho. Mediante el cribado genético preimplantacional se selecciona un embrión que no tenga la enfermedad de sus hermanos y que además sea histopatológicamente compatible con ellos. Este embrión es transferido a su madre, para lograr el respectivo embarazo” (Aznar, 2009). Esta práctica, atentaba no solo por el hecho de desechar embriones, sino también por la utilización en cierta medida de este hijo diseñado; por considerarlo como un medio para salvar al otro hijo y no como un fin en sí mismo. Actualmente, el término se ha actualizado y se refiere a la opción de seleccionar características y en la medida de lo posible, introducir nuevas. Hace unos años, en 2018, “la comunidad científica quedó atónita al escuchar que el Dr. He Jiankui en China anunció el nacimiento de gemelas que habrían sido editadas usando CRISPR. He Jiankui declaró que editó el ADN de siete embriones que se utilizan para el tratamiento de fertilidad y tuvo como resultado el nacimiento de un par de gemelas. Afirmó que usó CRISPR para eliminar el gen CCR5 de los embriones (receptor de quimiocinas con motivo C-C 5), cuyas mutaciones están vinculadas a la resistencia a la infección por VIH” (Harper y Schatten, 2019). Este caso, además de por lo más evidente, llamó la atención pues el riesgo de transmisión del VIH para estas parejas habría sido insignificante, y existen otras formas ampliamente estudiadas de prevenir la transmisión del VIH a los hijos de parejas seropositivas e incluso más eficaces. “El consenso general fue que los experimentos de He Jiankui violaron muchos principios morales y como tal, sus experimentos, también violaron todos los principios éticos internacionales conocidos” (Alsomali y Hussein, 2021).

Sobre la producción de estos “bebés” y sin caer en la catalogación de un hijo como un mero objeto; algunos “críticos reflexivos de la edición hereditaria del genoma humano han señalado que, si uno tiene la capacidad de modificar los genes de sus hijos, es decir, de producir bebés de “diseño”, existe el riesgo de que la relación entre padres e hijos sufra cambios radicales, con padres expresando sus valores, prioridades y aspiraciones en la composición genética de sus hijos. Por lo tanto, los niños no serán aceptados como regalos preciosos, independientemente de su composición genética, sino que se convertirán en extensiones de la habilidad inteligente de sus padres para diseñarlos y en “una mercancía que se puede pedir a voluntad”. Esta mercantilización puede tener implicaciones profundas, incluida la culpa de los padres si el diseño no sale bien, especialmente cuando los niños puedan cuestionar las elecciones de sus padres” (Ranisch, 2020). Junto a esto surgen otras incógnitas y riesgos, por ejemplo; “debemos suponer que la tecnología de edición de genes mejorará rápidamente. Sin embargo, el rápido progreso en el desarrollo y la aplicación de cualquier tecnología

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

tiene un precio: la obsolescencia. Si las mejoras genéticas que podemos proporcionar a los niños mejoran cada año, entonces las mejoras otorgadas a los niños nacidos en un año determinado quedarán rápidamente obsoletas. Tarde o temprano, cada niño modificado se encontrará a sí mismo como el “niño de ayer” (Sparrow, 2019). Si existe la deriva social, podría crearse una presión social que incline a la sociedad a un mejoramiento forzado, pues el que se queda atrás en la sociedad y no se adapta, en muchas ocasiones, no sobrevive tanto física como profesional como socialmente. Se vislumbra el riesgo de que “ciertas fuerzas sociales, económicas y políticas influyan en los que se consideran “no aptos” en un esfuerzo por presionarlos para que cambien su genética para ajustarse mejor a ciertas normas o expectativas externas, y existe el riesgo de que aquellos que se resistan a la presión para conformarse experimenten (más) opresión” (Aznar y Gómez-Tatay, 2019).

El potencial es tal, que las posibilidades como se ha mencionado escapan del control humano. “Si bien estas nuevas tecnologías son capaces de restaurar ciertas funciones propias del ser humano, también serían eventualmente capaces de dotarlo de mejoras que superasen con creces las habilidades posibles en nuestra especie” (Marín Conde y Gómez-Tatay, 2021). El ser humano en cierto modo tiene la capacidad teórica de igualarse a la naturaleza y “modificar artificialmente el proceso evolutivo biológico” (Aznar y Burguete, 2020). Por primera vez, el ser humano posee “la capacidad de editar no solo el ADN de cualquier ser humano vivo, sino también el ADN de las generaciones futuras; en esencia, dirigir la evolución de nuestra propia especie” (Aznar y Burguete, 2020). Esta cuestión acerca al ser humano a lo que los filósofos catalogan como transhumanismo, que no es más que superar los límites naturales de la humanidad mediante el mejoramiento tecnológico. Esta doctrina, contraria al ser humano por negar su propia naturaleza, cada vez va cobrando más importancia, por ejemplo, en la industria aeroespacial “la modificación genética de los seres humanos que viven en el espacio abrirá el campo para múltiples aplicaciones beneficiosas” (Szocik, *et al.*, 2021) o en la industria armamentística, “el uso de tecnología de modificación humana con fines militares es un procedimiento actualmente en práctica. Esto puede suponer la provisión de una ventaja militar única para un estado sobre otros, algo que es lamentablemente inevitable ya que los estados son los principales tomadores de decisiones, reguladores y financiadores en la industria biomédica” (Szocik, *et al.*, 2021). “La optimización del desempeño humano ha sido durante mucho tiempo una prioridad de la investigación militar para cerrar la brecha entre el avance de la guerra y las limitaciones de los actores humanos, esto se junta actualmente con la mejora biomédica que debe considerar las cuestiones éticas de dicha investigación”

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

(Greene y Master, 2018). Como se hacía referencia en la presentación de los principios bioéticos, “no todo lo que es técnicamente posible puede considerarse moralmente admisible” y “el fin no justifica los medios”.

Tecnología CRISPR-Cas combinado con la tecnología “gene drive”

Como conclusión de la revisión bioética, se aborda el concepto de “gene drive” y el potencial de la sinergia entre la genética dirigida y la tecnología CRISPR. Las capacidades que desbloquea la tecnología “gene drive” suponen un cambio de paradigma para la genética tradicional. Cuando esta, gene drive, se combina con CRISPR-Cas, se permite que aquellos alelos modificados por la edición genética CRISPR en el momento en el que se transmitan, se impongan a sus competidores sin editar. “CRISPR puede utilizarse para gene drive, de manera que un gen editado se extienda rápidamente a través de una población” (Aznar y Gómez-Tatay, 2019). “Cuando un organismo que lleva un DEG manipulado se aparea con un organismo Wild Type, el gene drive lo heredan preferentemente todos los descendientes. Esto puede permitir que el impulso se propague hasta que esté presente en todos los miembros de la población” (Camporesi y Cavaliere, 2016).

“El uso reciente de CRISPR para modificar genéticamente embriones humanos demuestra una posibilidad real de desarrollar un sistema de gene drive en humanos, en la que los genes que modulan los rasgos se transmiten a la descendencia y pudiendo perpetuarse a través de la especie. Por ejemplo, la tecnología tal como existe actualmente puede usarse para afectar positivamente la línea germinal humana al disminuir o eliminar la cantidad de mutaciones asociadas con genes involucrados en condiciones monogénicas altamente hereditarias, como la acondroplasia o la anemia falciforme. Con el desarrollo continuo, los métodos se perfeccionarían y se utilizarían para enfermedades más complejas” (Nestor y Wilson, 2020). La tecnología CRISPR junto al “Gene drive” de la línea germinal, supone un peligro potencial para el ser humano, en tanto, que los daños que pueden acarrear los errores no solo serán heredables, sino que tenderán a extenderse rápidamente por las poblaciones. Puede ser preocupante “que el ARN guía mute con el tiempo, de tal manera que se dirija a una parte diferente del genoma, por lo que la nueva mutación podría entonces correr a través de la población, con efectos impredecibles” (Aznar y Gómez-Tatay, 2019). Por la naturaleza de esta tecnología, los expertos son cautos con el uso y sobre todo con la evaluación, ya que pueden ser utilizadas “para bien y para mal, por ejemplo, preocupa que pudiera usarse para atacar el microbioma humano o grandes fuentes de alimentación” (Aznar y Gómez-Tatay, 2019).

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

CONCLUSIONES

Revisión de autores claves

A partir del trabajo de los padres del CRISPR-Cas9, esta tecnología se ha convertido en una de las herramientas más poderosas que la biotecnología ofrece a la sociedad. Desde los comienzos de la investigación a finales del siglo XX por el equipo de Mojica, con sus trabajos de descripción de las secuencias repetidas en genomas de arqueas y bacterias, la tecnología CRISPR fue rápidamente perfeccionándose hasta llegar a la publicación de los trabajos de Doudna y Charpentier, ganadoras del Nóbel y diseñadoras de los protocolos de edición con CRISPR-Cas9. Junto a ellas fue destacable también la labor de Zhang en el perfeccionamiento de la técnica y en la aplicación de esta en seres humanos. Por ello, desde las primeras aportaciones que sentaron las bases, los aportes que alumbraron la técnica y las investigaciones que perfeccionan y estudian nuevas aplicaciones y metodologías de esta herramienta; estos autores no solo han sido históricamente los padres, sino que han seguido y siguen aportando para el desarrollo y perfeccionamiento de esta.

Revisión bioética

La revisión bioética sobre CRISPR-Cas9 ha evidenciado el largo camino a recorrer todavía de esta tecnología, no solo en lo relativo al perfeccionamiento técnico sino a las consideraciones bioéticas. CRISPR entraña un gran potencial, un poder transformante con dos caras, una para mejorar la vida humana y curar enfermedades anteriormente incurables y otra con un potencial destructivo para el ser humano. Con ello su correcta administración dependerá de una correcta labor bioética, que vele por los intereses humanos, la protección de la vida y siempre con un objetivo terapéutico.

Las líneas de trabajo para la herramienta CRISPR pueden suponer el traspaso de límites bioéticos intolerables. La terapia génica somática supone una buena noticia para la medicina humana, siempre que se perfeccione y no aparezcan efectos colaterales. La terapia génica en línea germinal y el “gene drive” son opciones incompatibles con la bioética, por los aspectos negativos que suponen; por desechar embriones, por alterar permanente un linaje o por faltar a los principios humanos básicos. Esta labor de juicio y control sobre esta tecnología es necesaria, no solo para guiar una investigación menos lesiva para el ser humano sino para vigilar los límites bioéticos, que no siempre se respetan. El “human enhancement” o el “diseño de bebés” son escenarios cada vez más cercanos; que rompen con los principios morales y plantean problemas como la restricción de libertades o la obsolescencia humana.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

LÍNEAS FUTURAS

La tecnología CRISPR-Cas9 plantea numerosos retos; tanto los propiamente tecnológicos y asociados al perfeccionamiento como los retos éticos ante las posibilidades que esta tecnología ofrece. La tecnología CRISPR-Cas, explora nuevas alternativas, como el uso de nuevas nucleasas como Cas12/CPF1 (Zetsche, *et al.*, 2015; Chen, *et al.*, 2018) para mejorar su funcionamiento y aplicación, reducir costes o aumentar su precisión.

Las perspectivas de futuro de esta tecnología van a tratar más frecuentemente las cuestiones de mejoramiento genético, que irán poco a poco acercándose conforme mejore esta tecnología. Los retos de las revisiones bioéticas se van a complicar conforme los avances teóricos se demuestren y especialmente, cuando esta tecnología y su aplicación en seres humanos esté al alcance de toda la humanidad. La necesidad de controlar que los padres no alteren genéticamente a sus hijos cuando esta posibilidad esté a su alcance será un duro reto para la bioética; con ello y con transparencia, la sociedad debe de ser informada de las ventajas de esta tecnología, así como de los inconvenientes que se pueden generar y especialmente concienciar de las limitaciones que se deben imponer. No todo lo que es técnicamente posible puede considerarse moralmente admisible, aun habiéndose perfeccionado esta tecnología; la defensa de la vida humana pasa por tratar a los demás como a uno le gustaría que lo trataran, y con ello ante unas perspectivas tan dispares alrededor de esta tecnología, aplicar una ética puramente humana que guíe, proteja y dignifique al ser humano.

BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

- Alsomali, N., & Hussein, G. (2021). CRISPR-Cas9 and He Jiankui's case: an Islamic bioethics review using Maqasid al-Shari'a and Qawaid Fighiyyah. *Asian Bioethics Review*, 13(2), 149-165.
- Ayanoğlu, F. B., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. (2020). Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turkish Journal of Biology*, 44(2), 110-120.
- Aznar, J. (2009). Designer babies. A question of ethics. *Medicina e morale*, 58(6).
- Aznar, J., & Burguete, E. (2020). From *Australopithecus* to cyborgs. Are we facing the end of human evolution?. *Acta Bioethica*, 26(2), 165-177.
- Aznar, J., & Gómez-Tatay, L. (2019). CRISPR-CAS9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética. *Cuadernos de Bioética*, 30(99), 171-185.
- Aznar, J., & Pastor, L. M. (2017). El estatuto biológico del embrión humano. *La vida humana incipiente*, 200, 21-29.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819), 1709-1712.
- Benedicto XVI, Discurso al Deutscher Bundestag, Berlín (22 septiembre 2011): AAS 103 (2011), 668.
- Boethius, S. (520). Liber de persona et duabus naturis, Contra Eutychen et Nestorium. *Patrología latina* 64, c. 1343.
- Camporesi, S., & Cavaliere, G. (2016). Emerging ethical perspectives in the clustered regularly interspaced short palindromic repeats genome-editing debate. *Personalized medicine*, 13(6), 575-586.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436-439.
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(10), 6091-6105.
- Clarivate. (2023). Clarivate Unveils Journal Citation Reports 2023 - a Trusted Resource to Support Research Integrity and Promote Accurate Journal Evaluation. *Clarivate*. <https://clarivate.com/news/clarivate-unveils-journal->

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

citation-reports-2023-a-trusted-resource-to-support-research-integrity-and-promote-accurate-journal-evaluation/ Consultado: 28 - junio - 2023.

- Coller, B. S. (2019). Ethics of human genome editing. *Annual Review of Medicine*, 70, 289-305.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
- Derry, W. B. (2021). CRISPR: development of a technology and its applications. *The FEBS Journal*, 288(2), 358-359.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Fonfara, I., Richter, H., Bratovič, M., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 517-521.
- Francisco, Carta Encíclica *LAUDATO SI'* del Santo Padre Francisco sobre el cuidado de la Casa común (24 mayo 2015).
- Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. (2023). Recursos científicos. *Ministerio de Ciencia e Innovación*. <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/> Consultado: 25 - junio - 2023.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., ... & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442-451.
- Godfray, H. C. J., North, A., & Burt, A. (2017). How driving endonuclease genes can be used to combat pests and disease vectors. *BMC biology*, 15, 1-12.
- Gómez-Tatay, L., Hernández-Andreu, J. M., & Aznar, J. (2017). Mitochondrial modification techniques and ethical issues. *Journal of clinical medicine*, 6(3), 25.
- Gostimskaya, I. (2022). CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Moscow)*, 87(8), 777-788.
- Greene, M., & Master, Z. (2018). Ethical issues of using CRISPR technologies for research on military enhancement. *Journal of bioethical inquiry*, 15(3), 327-335.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Gumer, J. M. (2019). The wisdom of germline editing: An ethical analysis of the use of CRISPR-Cas9 to edit human embryos. *The New Bioethics*, 25(2), 137-152.
- Harper, J. C., & Schatten, G. (2019). Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes?. *European journal of medical genetics*, 62(8), 103682.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259.
- Hirsch, J. E. (2005). An index to quantify an individual's scientific research output. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 102(46), 16569-16572.
- Hough, S. H., & Ajetunmobi, A. (2017). The future of CRISPR applications in the lab, the clinic and society. *Precision Medicine, CRISPR, and Genome Engineering: Moving from Association to Biology and Therapeutics*, 157-178.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- Iglesia Católica, Catecismo de la Iglesia Católica, 2293
- Iglesia Católica, Catecismo de la Iglesia Católica, 2295
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505-529.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233-239.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2, e00471.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ... & Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, *343*(6176), 1247997.
- Kang, X., He, W., Huang, Y., Yu, Q., Chen, Y., Gao, X., ... & Fan, Y. (2016). Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *33*, 581-588.
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, *361*(6405), 866-869.
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., ... & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, *517*(7536), 583-588.
- Liao, S. M. (2019). Designing humans: A human rights approach. *Bioethics*, *33*(1), 98-104.
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*, *3*, e04766.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 467-477.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... & Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(11), 722-736.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J., ... & 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.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, *339*(6121), 823-826.
- Marín Conde, E., & Gómez-Tatay, L. (2021). Guía de valoración ética de intervenciones sobre el cuerpo humano ante la llegada de las tecnologías NBIC con fines de mejoramiento. *Cuaderno de Bioética*, *32*(105), 195-211.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Marinelli, S., & Del Rio, A. (2020). Beginning of life ethics at the dawn of a new era of genome editing: are bioethical precepts and fast-evolving biotechnologies irreconcilable. *La Clínica Terapéutica*, 171(5).
- Mojica, F. J. M., Ferrer, C., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular microbiology*, 17(1), 85-93.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C. S., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60, 174-182.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740.
- 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.
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), 613-621.
- Napoletano, S., Piersanti, V., & Rallo, G. (2021). CRISPR-Cas9: a groundbreaking new technique which ushers in new prospects and just as many doubts. *La Clínica Terapéutica*, 172(1), 52-54.
- National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. (2017). Human genome editing: science, ethics, and governance. *National Academies Press*.
- National Human Genome Research Institute (NIH). (2023). Células somáticas. Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Celulas-somaticas> Consultado: 21 - junio - 2023.
- National Human Genome Research Institute (NIH). (2023). Línea germinal. Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Linea-germinal> Consultado: 21 - junio - 2023.
- Nestor, M. W., & Wilson, R. L. (2020). Beyond Mendelian genetics: Anticipatory biomedical ethics and policy implications for the use of CRISPR together with gene drive in humans. *Journal of bioethical inquiry*, 17, 133-144.
- Pardo Sáenz, J. M. (2004). Bioética práctica al alcance de todos. *Ediciones Rialp, Madrid*.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., & Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*, 31(9), 839-843.
- Pavlovic, Z. J., Sax, M. R., Kim, A. S., & DeCherney, A. H. (2020). Altered evolution: are reproductive endocrinology and infertility specialists ready for the genetically engineered future?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 2949-2954.
- Piergentili, R., Del Rio, A., Signore, F., Umani Ronchi, F., Marinelli, E., & Zaami, S. (2021). CRISPR-Cas and its wide-ranging applications: From human genome editing to environmental implications, technical limitations, hazards and bioethical issues. *Cells*, 10(5), 969.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., ... & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520(7546), 186-191.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... & Zhang, F. (2013a). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013b). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Ranisch, R. (2020). Germline genome editing versus preimplantation genetic diagnosis: Is there a case in favour of germline interventions?. *Bioethics*, 34(1), 60-69.
- Royal Swedish Academy of Sciences. (2020). *The Nobel Prize in Chemistry 2020*. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/> Consultado: 11 - mayo - 2023.
- Rulli, T. (2019). Reproductive CRISPR does not cure disease. *Bioethics*, 33(9), 1072-1082.
- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods*, 11(8), 783-784.
- Santa Biblia. (1995). *Reina-Valera*.

Revisión bibliográfica del sistema CRISPR-Cas9: Principales investigadores e implicaciones bioéticas en seres humanos.

- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., ... & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, *343*(6166), 84-87.
- So, D., Kleiderman, E., Touré, S. B., & Joly, Y. (2017). Disease resistance and the definition of genetic enhancement. *Frontiers in Genetics*, *8*, 40.
- Sparrow, R. (2019). Yesterday's child: How gene editing for enhancement will produce obsolescence—and why it matters. *The American Journal of Bioethics*, *19*(7), 6-15.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62-67.
- Szocik, K., Shelhamer, M., Braddock, M., Cucinotta, F. A., Impey, C., Worden, P., ... & Munévar, G. (2021). Future space missions and human enhancement: Medical and ethical challenges. *Futures*, *133*, 102819.
- Veit, W., Anomaly, J., Agar, N., Singer, P., Fleischman, D. S., & Minerva, F. (2021). Can 'eugenics' be defended?. *Monash Bioethics Review*, *39*(1), 60-67.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, *153*(4), 910-918.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, *482*(7385), 331-338.
- 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.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., ... & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(3), 759-771.
- Zhang, D., & Lie, R. K. (2018). Ethical issues in human germline gene editing: a perspective from China. *Monash Bioethics Review*, *36*, 23-35.