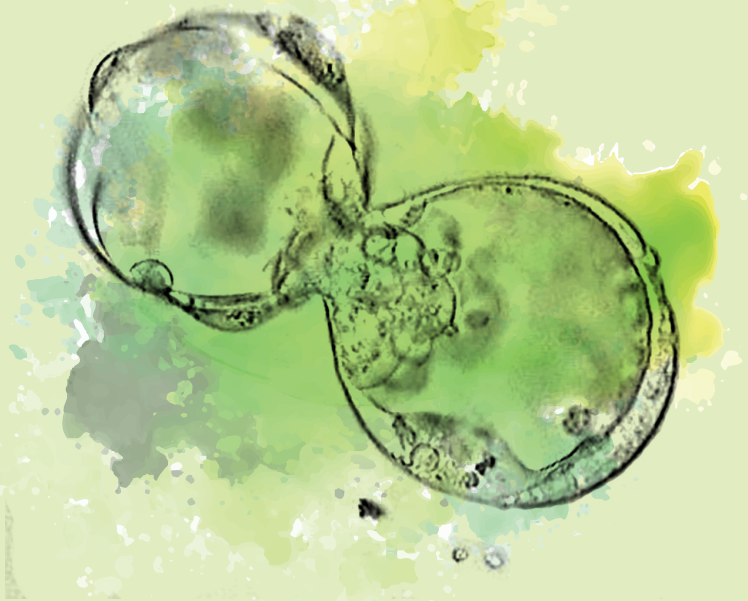


Embriología clínica

Presente y futuro



Iván Anduaga Marchetti, Alicia Pené
y Gustavo Martínez (comps.)

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Presente y futuro

Iván Anduaga Marchetti, Alicia Pené
y Gustavo Martínez



Universidad
Nacional
de Córdoba

Autoridades UNC

Rector

Mgter. Jhon Boretto

Vicerrector

Mgter. Mariela Marchisio

Secretario General

Ing. Daniel Lago

Prosecretaria General

Dra. Ing. Agr. Paola Andrea Campitelli

Director de Editorial de la UNC

Dr. Marcelo Bernal

Embriología clínica : presente y futuro / Iván Anduaga Marchetti ... [et al.]; compilación de Iván Anduaga Marchetti; Alicia Pené; Gustavo Martínez. - 1a ed. - Córdoba: Editorial de la UNC, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencias Naturales. Salud)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-987-707-234-1

1. Embriología. 2. Medicina Clínica. 3. Salud Reproductiva. I. Anduaga Marchetti, Iván, comp. II. Pené, Alicia, comp. III. Martínez, Gustavo, comp. CDD 611.013

Diseño de colección y portada: **Lorena Díaz**

Diagramación: **Marco J. Lio**

Edición: **Emilia Casiva**

Coordinación editorial: **Lorena Díaz**

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723
Universidad Nacional de Córdoba, 2022

ÍNDICE

Prólogo	7
El Laboratorio de Embriología Clínica: cuatro décadas de historia <i>Kay Elder</i>	9
El ovocito <i>Jorgelina Buschiazzo y Glenda Ríos</i>	35
El espermatozoide. Principales contribuciones al embrión e implicancias en su desarrollo <i>Lucrecia Piñeiro, Vanina Fontana, Maite Cambiasso, Camila Galotto, Lucila Gotfryd, Juan Carlos Calvo</i>	71
Desarrollo y selección embrionaria <i>María Andrea Dematteis y Mariana Hernández</i>	102
Inmunorregulación de la implantación embrionaria: fisiología y refelexiones clínicas <i>Laura Fernández, Elizabeth Soczewski, Lucila Gallino, Esteban Grasso, Soledad Gori, Fátima Merech, Ana Schafir, Marcela Irigoyen, Claudia Pérez Leirós y Rosanna Ramhorst</i>	134
El endometrio: la mucosa responsable del éxito reproductivo <i>María Agustina Azpiroz, Gabriela Gutiérrez, María Soledad Mayol</i>	172
Criopreservación: presente y futuro <i>Gustavo Martínez, Alberto Valcárcel, Estefanía Martínez, Rocío S. Iaizzo</i>	191

Factores que afectan al éxito de la vitrificación embrionaria como estrategia complementaria a los procedimientos de FIV/ICSI <i>Iván Anduaga Marchetti, Maximiliano Beltramo, Valeria Martínez, Marcela Cullere</i>	225
Banco de gametas: nuevos estándares <i>Florencia Nodar, Gabriel Fizsbajn, Andrea M. Quinteiro Retamar, Felicitas Azpiroz</i>	253
Diagnóstico para alteraciones genéticas en embriones (PGT-M) <i>Andressa Grazziotin Mondadori</i>	277
Avances y límites naturales en el laboratorio de PGT-A <i>Claudio Bisioli, Mariana Gómez Peña, Mercedes Papayannis, Evelyn De Martino; Georgina Meneghini, Laura Kopcow</i>	307
Diagnóstico no invasivo de aneuploidías embrionarias <i>Azarina Ferro Barbero, Luis Navarro Sánchez, Carmen M. García Pascual, Inmaculada Campos Galindo, Lorena Rodríguez Vivó, Carmen Rubio</i>	331
Asesoramiento genético preconcepcional en reproducción: tamizaje y diagnóstico <i>Silvina Sisterna, María Cecilia Paez, María Laura Igarzabál, Florencia Petracchi</i>	353
Metaboloma como herramienta de selección embrionaria <i>Marcela Cullere, Marisa Martinelli, Ezequiel de la Rosa, Elmer Fernandez, Iván Anduaga Marchetti</i>	391
Futuras técnicas en medicina reproductiva <i>Alicia I. Pené, Paula Silvestre, Mayra Gómez Vitolo, Ignacio Moreno</i>	424
Clonación y transferencia nuclear aplicada a la reproducción <i>Andrés Gambini y Olinda Briski</i>	452
Terapias de reemplazo mitocondrial <i>Ariel Ahumada</i>	491

Aplicaciones de la edición genética en reproducción humana: dónde estamos y hacia dónde vamos <i>Sebastián Demyda-Peyrás</i>	515
Microfluídica en reproducción asistida: pasado, presente y futuro <i>Igor Carneiro, Alicia Pené, Mario Gadán, Álvaro J. Conde, Iván Anduaga Marchetti, Maximiliano Pérez, Betiana Lerner</i>	534
Inteligencia Artificial (IA) en el laboratorio de fecundación in vitro (FIV) <i>Lorena Bori y Marcos Meseguer</i>	560
Modelos experimentales para el estudio de la fertilidad <i>Raquel Lottero Leconte, Jimena Beltrame, Camila Arroyo Salvo, Vanesa Cañumil, Nicolás Chiarante, Fernanda de la Cruz, Frida Scheffer, María Eugenia Boggetti, María Laura Ribeiro, Silvana Pérez-Martínez</i>	585
Consideraciones éticas: Derechos reproductivos y planificación familiar. Estatuto legal y moral del embrión criopreservado <i>Natacha Salomé Lima</i>	634
Perspectiva jurídica del embrión no implantado <i>Mariana Rodríguez Iturburu</i>	660
Diseño, construcción y planificación de las tareas de un laboratorio <i>Débora J. Cohen, Gisela Zang, Graciela Alaluf</i>	697
Control y gestión de la calidad del laboratorio <i>Maria Graciela Alaluf y Victoria Eyheremendy</i>	720
Control de riesgos en el laboratorio de reproducción asistida <i>Claudio Bisioli, Mercedes Papayannis, Mariana Gómez Peña</i>	742
La relación de los embriólogos clínicos con su trabajo <i>Claudio Bisioli, Mariana Gómez Peña, Mercedes Papayannis</i>	756
Sobre los autores y colaboradores	762

APLICACIONES DE LA EDICIÓN GENÉTICA EN REPRODUCCIÓN HUMANA: DÓNDE ESTAMOS Y HACIA DÓNDE VAMOS

Sebastián Demyda-Peyrás

Introducción

Breve historia de la edición génica

La edición génica es el proceso por el cual se producen modificaciones dirigidas y controladas en el genoma de un individuo con el fin de alterar el fenotipo resultante. Esta técnica comenzó a ser utilizada masivamente en modelos animales experimentales (principalmente en el ratón de laboratorio) a fines de los años 80, luego del desarrollo de una metodología conocida como mutagénesis dirigida (*gene targeting* en inglés; Thomas and Capecchi (1987), que fuera galardonada en el año 2007 con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina. En esta metodología, el primer paso es la construcción de un fragmento artificial de ADN que incluya una variante genética alternativa (secuencia de bases nucleotídicas) a la variante genética normal (conocida como “*wild type*”) existente en los individuos, la cual era combinada con secuencias nucleotídicas laterales específicas (“*flankers*”) que permitían direccionar el proceso de mutagénesis hacia un gen determinado. Esta secuencia, conocida vulgarmente como constructora introducida dentro de líneas celulares cultivadas in vitro mediante diversas técnicas biotecnológicas con el objetivo de su incorporación al genoma celular mediante un proceso de recombinación homóloga durante el proceso de replicación celular (Folger et al., 1984). Si bien el proceso fue exitoso, su eficacia era tan baja (la tasa de células que resultaban editadas era menor

que 1 por mil), así como la aparición de mutaciones incompatibles con las esperadas en un gran porcentaje de los casos hizo que esta metodología no fuese válida para la edición de líneas germinales o de embriones, quedando su uso limitado a líneas celulares de laboratorio (Capecchi, 2005). Sin embargo, este inconveniente fue elegantemente solucionado mediante un proceso de quimerización artificial, en el cual la edición génica se realizaba sobre líneas de células madre que posteriormente eran inyectadas dentro de un blastocisto de ratón. Estos embriones, compuestos por células normales y células editadas, eran transferidos a madres subrogantes en las cuales completaban su desarrollo, generando animales quiméricos que poseían parte de sus células de tipo “*wild type*” y parte de sus células editadas genéticamente. Posteriormente, los individuos machos eran retrocruzados con el objetivo de producir progenie que haya sido generada por un espermatozoide proveniente de una célula germinal con su genoma editado (Bradley et al., 1984), permitiendo establecer líneas de ratones modificados al cabo de pocas generaciones de cría. Si bien estas tecnologías seguían siendo poco eficientes, su perfeccionamiento permitió el desarrollo exponencial de los estudios de funcionalidad génica mediante la creación de modelos experimentales para más de 7000 genes diferentes (Capecchi, 2005). Cabe destacar que el desarrollo completo de un modelo experimental validado para un gen específico en el ratón de laboratorio utilizando esta técnica podía demorar más de doce meses. Por la misma razón, era imposible el pensar en desarrollar modelos animales en especies con gestaciones prolongadas como el cerdo o el bovino, que requerirían de años de espera.

2013 (o el año en que nos cambiaron las reglas del juego)

Todo cambió, y de manera rotunda, en el año 2013 con la aparición del que ha sido probablemente el mayor avance científico en las últimas décadas (Gilles & Averof, 2014). Nos referimos a la “domesticación” de un sistema de defensa adaptativo de ciertas bacterias para su uso como

una potente “tijera molecular” que permite editar genéticamente cualquier célula viva con una precisión y robustez impensada hace no más de un lustro. Dicho mecanismo está basado en la existencia de un grupo de secuencias genómicas específicas, conocidas como “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”, descritas en arqueobacterias por un grupo de la Universidad de Alicante durante hace casi veinte años (Mojica et al., 2000). Se observó que este mecanismo permitía a las bacterias el poder redireccionar el accionar de ciertas enzimas con acción endonucleasa (entre ellas la *CAS-9*) para su utilización como mecanismo de defensa contra diferentes virus a los cuales ellas o sus antecesoras hubiesen estado expuestas. Este grupo de secuencias dieron origen a lo que hoy se conoce como CRISPR (acrónimo que refiere sus iniciales en idioma inglés “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”), término acuñado por el microbiólogo español Francisco Mojica en el año 2002 (Hsu et al., 2014). Sin embargo, muchos estudios posteriores en torno a su mecanismo de acción fueron necesarios para que esta revolución se transforme en algo tangible, lo cual ocurrió en el año 2013, cuando se reportó por primera vez la realización de ediciones genómicas dirigidas mediante tecnologías basadas en CRISPR-CAS9 en bacterias (Jiang et al., 2013), modelos murinos (Ran et al. 2013) y células humanas (Jinek et al., 2013). Este fue el pistoletazo de salida que dio origen a la “CRISPRevolution”, tras lo cual su uso ha aumentado exponencialmente, logrando niveles de eficiencia y flexibilidad impensables hace poco tiempo, y dotando a los científicos, en un lapso de tan solo cinco años, de una herramienta molecular con una potencialidad de la cual no se conocen aún sus límites (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

“Tijera molecular” modelo 2015

Brevemente, el sistema CRISPR-CAS se compone de dos partes bien diferenciadas: por un lado, una enzima con actividad endonucleasa

(originalmente la CAS-9, aunque en la actualidad existen muchas más variantes) cuya única función es producir un corte en una hebra de ADN. Esta enzima es “universal” y puede ser utilizada en la edición de cualquier secuencia de ADN de cualquier especie (animal, vegetal o bacteriana). El otro componente del sistema es una secuencia de ARN de unos pocos pares de bases que tiene la capacidad de unirse, por complementariedad nucleotídica, sólo a la región genómica que se pretende editar. Este fragmento, que es conocido en la jerga científica como ARN “guía” (o “*single guide RNA*” en inglés), producido sencillamente mediante tecnologías similares a las empleadas para los cebadores (“*primers*”) utilizados en las reacciones de cadena de polimerasa (PCR), es el componente que determina el lugar físico de acción de la endonucleasa, confiriéndole al sistema CRISPR-CAS9 una altísima especificidad (Figura 1). Este complejo “enzima-guía”, sólo se activará en el momento que la sgRNA se una de manera inequívoca a una región complementaria del ADN de la célula diana, produciendo un corte (acción endonucleasa de la enzima CAS activada) en la hebra de ADN (Figura 1). Es por ello que para determinar la región del genoma en la cual se pretende realizar un “corte” sólo es necesario “diseñar” una guía de ARN específica, la cual al unirse a la enzima CAS-9 producirá el efecto deseado con altísima eficiencia. Y esta capacidad de direccionamiento y precisión ha sido la que ha hecho del CRISPR-CAS una herramienta fundamental en la biología sintética moderna. Seguidamente, y como sucede en cualquier célula en la que la integridad del ADN es se ve comprometida, se produce una respuesta natural que intentará reparar el fragmento dañado. Sin embargo, este tipo de mecanismos intrínsecos de reparación no son del todo precisos, por lo que terminan generando en la mayoría de los casos pequeñísimas modificaciones en la secuencia genómica conocidas como *indels* (palabra proveniente de la unión de los términos inserción y delección). Es por ello que para inactivar un gen específico en cualquier célula de cualquier especie “sólo”

es necesario diseñar una “guía” complementaria a su región codificante (exón), realizar el corte y esperar que la reparación produzca un cambio en su secuencia nucleotídica, lo que a su vez cambiará la secuencia y/o composición de aminoácidos codificados, produciendo una proteína defectuosa (Hsu et al., 2014). Si además de la guía y la enzima se introduce en la célula diana un constructo similar al utilizado en *gene targeting*, se ha demostrado que un porcentaje de las células resultantes lo incorporará como parte de su genoma en la posición donde se produce el corte, generando células transgénicas (Heo et al., 2015). Esto ha sido recientemente utilizado en los bovinos para introducir el gen que determina que un animal es macho (*SR Y*, localizado en el cromosoma Y) en una región del cromosoma 18, lo cual produciría “teóricamente” que el 25% de la progenie de este toro cuyos complementos cromosómicos sexuales sean compatibles genéticamente con una hembra (60,XX) presente un fenotipo de macho (Owen et al., 2020).

Hoy en día, y luego de tan sólo cinco años de perfeccionamiento, el sistema CRISPR-CAS9 ha logrado niveles de eficacia tales que permiten que pueda ser utilizado como una metodología válida para editar cigotos mamíferos, mediante microinyección directa del complejo enzima-guía en el citoplasma, con resultados más que aceptables (Jang et al., 2018). Por este motivo, el uso de esta biotecnología en la investigación científica, ha tenido un crecimiento que superó con creces las expectativas más favorables, con más de 6700 estudios publicados en el año 2019 y más de 4000 sólo durante los primeros 6 meses del año 2020.

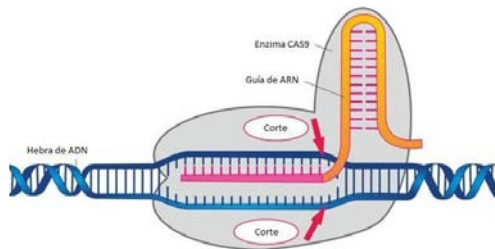


Figura 1: Componentes del sistema de edición génica CRISPR-CAS9

La “CRISPRevolution”

Una de las características más impactantes del desarrollo que viene teniendo esta tecnología es, sin lugar a duda, su capacidad de evolución. Tal es así que día a día aparecen nuevas variantes de enzimas de la familia CAS caracterizadas por una precisión y eficiencia muy superior a las originales, que están permitiendo su utilización en estudios experimentales mucho más “delicados”, en los cuales la eficiencia era una limitante (Kleinstiver et al., 2016). Pero también el sistema CRISPR posee una flexibilidad y capacidad de adaptación pocas veces vista en otras técnicas, lo cual ha logrado que mediante la introducción de modificaciones metodológicas de diversa índole pueda ser utilizado con fines tan diversos como la edición del epigenoma de una célula (Hilton et al., 2015), la atenuación (East-Seletsky et al., 2016) o incremento de los niveles de expresión de un gen determinado sin alterar su secuencia de ADN en la célula hospedadora (Guo et al., 2017), o la creación de sistemas portables de diagnóstico y detección de ácidos nucleicos (Gootenberg et al., 2017), entre otros. En particular, este último desarrollo está siendo actualmente

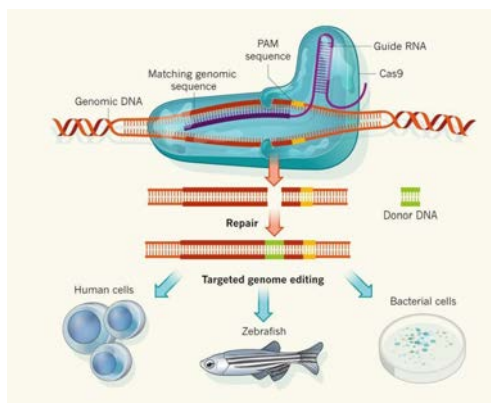


Figura 2: Metodología de producción de animales transgénicos mediante el uso de tecnologías CRISPR-CAS

utilizado para diagnosticar enfermedades tan variadas como las producidas por el virus del Zika (Gootenberg et al., 2018), dengue (Myhrvold et al., 2018) e inclusive el mismo COVID19, responsable de la pandemia acaecida en el año 2020 (Broughton et al., 2020). Sirva como ejemplo adicional de la versatilidad de esta metodología el

reciente desarrollo de una nueva metodología diagnóstica, denominada “CARMEN”, que combina CRISPR-CAS13 (una variante enzimática de la familia del CAS-9) con tecnologías de microfluidos que permite detectar simultáneamente la presencia de 169 virus conocidos en muestras provenientes de varios pacientes en un solo análisis, reduciendo el costo de detección en más de 300 veces (Ackerman et al., 2020). Pero además, esta metodología se basa en la detección de secuencias de ADN específicas, lo cual hace pensar que pueda adaptarse en un futuro a la detección a gran escala de variantes genéticas deletéreas en estudios de tipo PGD, lo cual tendría una aplicación potencial en la genómica humana.

Las tecnologías de edición génica aplicadas a los seres humanos

El uso de CRISPR en el genoma de los seres humanos data desde casi el inicio mismo del desarrollo de la técnica (Jinek et al., 2013). Y esto fue así debido a la versatilidad de la metodología, a la cual “le da igual” que el genoma a editar sea de un pez, una bacteria o un ser humano, ya que CRISPR-CAS9 “corta una secuencia de ADN”. Pero además, lo hace con una altísima eficiencia y de manera directa, lo cual hace que el tiempo necesario para obtener resultados sea muchísimo más corto. Tal es así que en un período de tan sólo siete años, la metodología fue empleada en líneas celulares humanas en aplicaciones tan diversas como como el screening genómico a gran escala (Shalem et al., 2014), la identificación de genes candidatos asociados a enfermedades (Patel et al., 2017), la creación de modelos celulares portadores de traslocaciones cromosómicas en líneas celulares (Torres et al., 2014), o la búsqueda de mutaciones asociadas a procesos neoplásicos en organelos humanos (Drost et al. 2017), entre otras. A tal punto, que CRISPR-CAS produjo en nuevo hito en la medicina en el año 2019, al ser utilizada por primera vez de manera directa en seres humanos adultos, con el objetivo de eliminar una mutación

en el gen *CEP290* modificando el genoma de las células retinales en pacientes con amaurosis congénita de Leber (Maeder et al., 2019).

Sin embargo, y como era de esperarse, el desarrollo de estas tecnologías no ha estado libre de problemáticas y posee aún algunos desafíos tecnológicos por resolver antes que puedan llegar de manera masiva a los seres humanos, en los cuales la eficiencia debe ser cercana al 100% para que su uso sea seguro. Entre ellos, el más importante de todos es la aparición de modificaciones genéticas adicionales no esperadas, conocidas como mutaciones “*off target*”, que se producen por errores en la complementariedad de la guía de ARN y la región genómica diana.

Si bien esta problemática fue descrita desde los comienzos mismos del desarrollo de esta tecnología (Fu et al., 2013), su control es relativamente sencillo en la edición génica de líneas celulares (Vassena et al., 2016) u organoides (Driehuis & Clevers, 2017), ya que estas pueden ser caracterizadas genéticamente, eliminándose todas aquellas en las cuales estas modificaciones indeseadas sean detectadas, en una especie de mecanismo de “prueba y error”, lo cual no es aplicable a muchas situaciones experimentales. Pero además, este tipo de anomalías cobra una altísima relevancia cuando las tecnologías CRISPR se utilizan en embriones mamíferos, ya que la detección de variantes *off target* no puede llevarse inequívocamente hasta estadios avanzados de la gestación (Singh et al. 2015). Esto se debe, entre otras razones, a la existencia de quimerismos embrionarios, lo cual ha sido ampliamente reportado en embriones de ratón (Yen et al. 2014) y de primates (Chen et al., 2015). Estos quimerismos, caracterizados por la detección de líneas celulares editadas y no editadas en el mismo embrión, han sido asociado principalmente al retardo del inicio y/o a la persistencia de la actividad de la enzima CAS9 a lo largo del tiempo, lo que hace que la edición pueda producirse luego de la primera replicación del ADN o bien en blastómeros producidos luego de la primera división mitótica del cigoto (Markossian & Flamant, 2016). Es por ello que cada embrión editado lleva implícito el riesgo de producir

individuos con alteraciones genómicas desconocidas que pueden producir un resultado fenotípico incierto, lo cual implica a su vez la necesidad de preguntarnos seriamente hasta donde estamos dispuestos a avanzar.

La edición génica de embriones humanos: ¿estamos listos?

Como era de esperarse, el uso “exitoso” de esta técnica en embriones mamíferos implicó el inicio de la carrera por su implementación en los seres humanos. Sin embargo, su implementación en embriones de nuestra especie es hasta el año 2020 aun muy escasa, posiblemente por razones éticas y legales que abordaremos más adelante.

El primer reporte conocido del empleo de CRISPR-CAS9 en embriones humanos data del año 2015, cuando Liang et al. modificaron genéticamente variantes anormales del gen *HBB*, causante de la betatalesmia, en cigotos humanos tri-pronucleados (3pn). Cabe hacer notar que este estudio utilizó embriones triploides incompatibles con la vida, probablemente como una forma de evitar cualquier tipo de conflicto ético y legal derivado de la posible edición génica aplicada a nuestra especie. Pero no fue hasta el año 2017, cuando comenzaron a reportarse estudios que sugerían que la tecnología CRISPR-CAS era también viable para la edición de cigotos humanos diploides, incluso sin aparentes efectos secundarios (Tang et al., 2017). Sin embargo, estudios posteriores realizados ese mismo año para determinar si la inhibición del gen *OCT4* comprometía el desarrollo embrionario (Fogarty et al. 2017) y para corregir de una variante anómala del gen *HBB* (Liang et al. 2017) pusieron de manifiesto la aparición de mosaicismos en los embriones tratados. Resultados similares fueron reportados ese mismo año por Ma et al. (2017), quienes corrigieron una mutación del gen *MYBPC3* (asociado a casos de cardiomiopatía hipertrófica) en el 15% de los embriones tratados. Sin embargo, este mismo trabajo reveló que 1 de cada 4 embriones presentaron algún tipo de mosaicismo pero además, los autores reportaron que

un 30% de los embriones tratados presentaba modificaciones *off-target*. Si bien existen protocolos de trabajo que intentan limitar la aparición de mosaicismos y modificaciones *off-target* en embriones mamíferos (Lamas-Toranzo et al. 2019), su abordaje experimental en embriones humanos es prácticamente nulo, lo que convierte a estas problemáticas en una limitación fundamental para la aplicación de las tecnologías CRISPR en embriología humana (Mehravar et al. 2019).

Finalmente, y como un ejemplo más de la importancia de esta tecnología en la ciencia actual, tres reportes preliminares fueron publicados en el momento en el cual este capítulo fue escrito. En dos de ellos, se detectaron mutaciones no deseadas (*off target*) en el 25% (Alanis-Lobato et al. 2020) y 40% (Liang et al. 2020) de embriones humanos modificados genéticamente. Pero en el tercero, se reportó directamente la pérdida completa de los dos brazos de un cromosoma debido a la realización de un procedimiento de edición génica en cigotos humanos (Zuccaro et al. 2020). Estos tres reportes dejan en claro, y de hecho es señalado por los mismos autores, que la edición génica en embriones humanos dista aún mucho de poder considerarse segura.

Las limitantes éticas y legales para el uso de técnicas de edición genética en los seres humanos: ¿quién le pone el cascabel al gato?

Uno de los hechos más importantes que acarrea el uso de técnicas de edición genética en los seres humanos a nivel embrionario es su carácter de total e irrevocable. Esto es así debido a que cualquier modificación genética producida a nivel embrionario quedará incorporada al genoma del individuo de manera permanente, incluyendo por supuesto al genoma de las células que pasarán a formar parte de su línea germinal. Por ello, las ediciones genéticas a nivel embrionario son no sólo irrevocables, sino también heredables por la posible descendencia de los futuros individuos.

Desde el mismo inicio de la “CRISPRevolución” existieron voces que comenzaron a alertar sobre los posibles peligros e implicancias éticas asociadas al uso de estas tecnologías en la edición de las líneas germinales de los seres humanos. A tal punto, que ya en el año 2015 comenzó a hablarse de una moratoria urgente en el uso de este tipo de aplicaciones en embriones humanos (Ishii, 2015). Ello derivó en la creación de diferentes grupos de trabajo en los diferentes países, entre ellos el formado en el seno de la Sociedad de Genética Humana de los Estados Unidos de América, que llegó a la conclusión que debido a la cantidad de preguntas tanto éticas como científicas que no tenían respuesta aún, la edición genética de embriones humanos era inapropiada, pero aclarando que esto era aplicable sólo si ella derivaba en el desarrollo de una gestación. Por el contrario su recomendación fue permitir su uso en investigación básica, siempre que se cuenten con todos los recaudos éticos y legales correspondientes, esta debía ser permitida (Ormond et al. 2017).

Todo cambió en 2018. El mundo quedó conmocionado en noviembre luego del anuncio del nacimiento de dos hermanas a quienes se insertó una variante del gen CCR5, que había sido asociada a una mayor resistencia frente a la infección del HIV (Samson et al., 1996). Esto produjo un efecto inmediato a nivel mundial, que terminó con el cese del investigador responsable de dicho experimento y su encarcelamiento bajo cargos de haber actuado fuera de la ley. Cabe destacar que este procedimiento fue llevado a cabo clandestinamente y a pesar de las múltiples advertencias acerca de las posibles implicancias éticas y morales de producir modificaciones irreversibles y con posibles efectos secundarios desconocidos (Lanphier et al., 2015). Pero además, este nacimiento puso de sobre el tapete el hecho de que muchos países no contaban con una legislación que tuviera en cuenta y regulara el uso de este tipo de tecnologías en los seres humanos. Es por ello que un grupo de científicos de gran renombre mundial, mayormente involucrados en el uso y desarrollo de las técnicas de CRISPR, propuso en el año 2019 que todos los

países del mundo dictaran una moratoria, inicialmente por un período de cinco años, que prohíba la realización de cualquier tipo de edición genómica en la clínica médica, así como cualquier tipo de edición genética que afecte las líneas germinales en seres humanos (Lander et al., 2019). Adicionalmente, se instruyó la creación de un observatorio mundial de la edición génica, cuya función es la de sugerir directivas para un uso racional de este tipo de metodologías desde un punto de vista ético, social y tecnológico (Jasanoff & Hurlbut, 2018).

Es por ello que el uso de este tipo de tecnologías asociadas a técnicas reproductivas asistidas en los seres humanos, si bien son viables, deben ser consideradas en casos en los cuales no exista una opción alternativa, y teniendo en consideración el alto grado de incertidumbre que podría generarse en los portadores de modificaciones genéticas de las cuales no exista un profundo conocimiento profundo de su efecto fenotípico (NCB 2018).

Pensando un poco a futuro: posibles aplicaciones de la edición génica en la reproducción humana

Dejando de lado la discusión ética y legal, e incluso las dificultades técnicas sobre el uso de la edición génica en embriones humanos, es interesante pensar, desde un punto de vista científico, la existencia de potenciales aplicaciones que justifiquen su uso en la clínica reproductiva humana. En este sentido, un grupo de científicos de renombre elaboró un interesante informe sugiriendo que a corto plazo, el principal uso de esta tecnología estaría focalizado en la corrección de variantes genéticas aberrantes asociadas a enfermedades de causa conocida (NCB 2018). Como ejemplo, actualmente existen descritas 6306 variantes en 4402 genes que producen enfermedades en los seres humanos, las cuales serían plausibles, hipotéticamente, de ser corregidas a nivel embrionario (Amberger et al., 2015).

Sin embargo, la “CRISPRevolution” no se detiene y da muestras constantes de que casi todo lo que pueda imaginarse tiene visos de poder convertirse en realidad (como dijo alguna vez Pablo Picasso). Tal es así que durante los últimos doce meses se han reportado nuevas aplicaciones para la corrección de enfermedades genéticas en ratones mediante edición génica que dan cuenta de posibles aplicaciones futuras. Por un lado, se ha logrado corregir “*in útero*” una enfermedad pulmonar de origen monogénico mediante la inyección de las enzimas CRISPR específicas en el saco amniótico de hembras gestantes (Alapati et al., 2019) con cierto grado de eficiencia. Por otro lado, se ha logrado editar genéticamente el ADN de ratones adultos portadores de la mutación causante de la distrofia muscular de Duchenne, mediante un sistema de aplicación de enzimas CRISPR-CAS9 mediada por adenovirus, que permite la entrada a las células diana de animales adultos (Zhang et al. 2020). Ambos estudios son un claro indicio de cómo la edición génica puede tener un rol fundamental y un alto grado de integración con la medicina del futuro.

Reflexiones finales

A lo largo de este capítulo se intenta resumir, de manera simple y conceptual, algunas técnicas y posibles aplicaciones presentes y futuras de la edición génica embrionaria, tanto en los animales como en los seres humanos. La intención es dejar en claro que la tecnología avanza a una velocidad muy superior a la que pudimos imaginarnos, e incluso a la que somos capaces de controlar de forma adecuada y segura. Esto genera la dicotomía entre grandes expectativas y dilemas éticos. Si bien la irrupción de la “CRISPRevolution” ya ha producido un cambio de época en la manera en que se lleva a cabo buena parte de la ciencia experimental, la producción de alimentos e incluso el diagnóstico de ciertas enfermedades, su aplicación en la reproducción humana sólo puede pensarse en el largo plazo y como el fruto de un amplio consenso internacional que

permita su implementación en forma segura y controlada, en casos en los cuales no exista una alternativa viable. Sólo nos queda esperar.

Referencias bibliográficas

- Ackerman C.M., Myhrvold C., Thakku S.G., Freije C.A., Metsky H.C., Yang D.K., et al. (2020) Massively multiplexed nucleic acid detection using Cas13. *Nature*.
- Alanis-Lobato G., Zohren J., McCarthy A., Fogarty N.M.E., Kubikova N., Hardman E., et al. (2020) Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *bioRxiv*, 2020.06.05.135913.
- Alapati D., Zacharias W.J., Hartman H.A., Rossidis A.C., Stratigis J.D., Ahn N.J., et al. (2019) In utero gene editing for monogenic lung disease. *Science Translational Medicine* 11, eaav8375.
- Amberger J.S., Bocchini C.A., Schiettecatte F., Scott A.F. & Hamosh A. (2015) OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res* 43, D789-98.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H. & Robertson E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-6.
- Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., et al. (2020) CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*.
- Capecchi M.R. (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6, 507-12.
- Chen Y., Zheng Y., Kang Y., Yang W., Niu Y., Guo X., et al. (2015) Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics* 24, 3764-74.
- Driehuis E. & Clevers H. (2017) CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312, G257-g65.

- Drost J., Van Boxtel R., Blokzijl F., Mizutani T., Sasaki N., Sasselli V., et al. (2017) Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science* 358, 234-8.
- East-Seletsky A., O'Connell M.R., Knight S.C., Burstein D., Cate J.H.D., Tjian R., et al. (2016) Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature* 538, 270-3.
- Fogarty N.M.E., McCarthy A., Snijders K.E., Powell B.E., Kubikova N., Blakeley P., et al. (2017) Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 550, 67-73.
- Folger K., Thomas K. & Capecchi M.R. (1984) Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49, 123-38.
- Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., et al. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* 31, 822-6.
- Gilles A.F. & Averof M. (2014) Functional genetics for all: Engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. *EvoDevo* 5.
- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J. & Zhang F. (2018) Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science* 360, 439-44.
- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., et al. (2017) Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 356, 438-42.
- Guo J., Ma D., Huang R., Ming J., Ye M., Kee K., et al. (2017) An inducible CRISPR-ON system for controllable gene activation in human pluripotent stem cells. *Protein and Cell* 8, 379-93.
- Heo Y.T., Quan X., Xu Y.N., Baek S., Choi H., Kim N.H., et al. (2015) CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells and Development* 24, 393-402.
- Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., et al. (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 33, 510-7.

- Hsu P.D., Lander E.S. & Zhang F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-78.
- Ishii T. (2015) Germline genome-editing research and its socioethical implications. *Trends Mol Med* 21, 473-81.
- Jang D.E., Lee J.Y., Lee J.H., Koo O.J., Bae H.S., Jung M.H., et al. (2018) Multiple sgRNAs with overlapping sequences enhance CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency. *Exp Mol Med* 50, 16.
- Jasanoff S. & Hurlbut J.B. (2018) A global observatory for gene editing. *Nature* 555, 435-7.
- 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, 233-9.
- Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E. & Doudna J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2013.
- Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., et al. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490-5.
- Lamas-Toranzo I., Galiano-Cogolludo B., Cornudella-Ardiaca F., Cobos-Figueroa J., Ousinde O. & Bermejo-Álvarez P. (2019) Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. *Scientific Reports* 9, 14900.
- Lander E.S., Baylis F., Zhang F., Charpentier E., Berg P., Bourgain C., et al. (2019) Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature* 567, 165-8.
- Lanphier E., Urnov F., Haecker S.E., Werner M. & Smolenski J. (2015) Don't edit the human germ line. *Nature* 519, 410-1.
- Liang D., Gutierrez N.M., Chen T., Lee Y., Park S.-W., Ma H., et al. (2020) FREQUENT GENE CONVERSION IN HUMAN EMBRYOS INDUCED BY DOUBLE STRAND BREAKS. *bioRxiv*, 2020.06.19.162214.
- Liang P., Ding C., Sun H., Xie X., Xu Y., Zhang X., et al. (2017) Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein & Cell* 8, 811-22.

- Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., et al. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein and Cell* 6, 363-72.
- Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.-W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., et al. (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548, 413-9.
- Maeder M.L., Stefanidakis M., Wilson C.J., Baral R., Barrera L.A., Bounoutas G.S., et al. (2019) Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine* 25, 229-33.
- Markossian S. & Flamant F. (2016) CRISPR/Cas9: A breakthrough in generating mouse models for endocrinologists. *Journal of Molecular Endocrinology* 57, R81-R92.
- Mehrvavar M., Shirazi A., Nazari M. & Banan M. (2019) Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental Biology* 445, 156-62.
- 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. *Mol Microbiol* 36, 244-6.
- Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F., et al. (2018) Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* 360, 444-8.
- NCB N.C.o.B. (2018) Genome Editing and Human Reproduction: social and ethical issues. Nuffield Council on Bioethics, London, UK.
- Ormond K.E., Mortlock D.P., Scholes D.T., Bombard Y., Brody L.C., Faucett W.A., et al. (2017) Human Germline Genome Editing. *American Journal of Human Genetics* 101, 167-76.
- Owen J.S., Hennig S., McNabb B., Mansour T., Lin A., Young A.E., et al. (2020) Production of a Gene Knock-In Bull Calf by Embryo-Mediated Genome Editing. In: Annual conference of the American Association of Animal Sciences.
- Patel S.J., Sanjana N.E., Kishton R.J., Eidizadeh A., Vodnala S.K., Cam M., et al. (2017) Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature* 548, 537-42.

- Pickar-Oliver A. & Gersbach C.A. (2019) The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 490-507.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A. & Zhang F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281-308.
- Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C M., et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-6.
- Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., Shi X., Scott D.A., Mikkelsen T.S., et al. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-7.
- Singh P., Schimenti J.C. & Bolcun-Filas E. (2015) A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics* 199, 1-15.
- Tang L., Zeng Y., Du H., Gong M., Peng J., Zhang B., et al. (2017) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Molecular Genetics and Genomics* 292, 525-33.
- Thomas K.R. & Capecchi M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-12.
- Torres R., Martin M.C., Garcia A., Cigudosa J.C., Ramirez J.C. & Rodriguez-Perales S. (2014) Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 5, 3964.
- Vassena R., Heindryckx B., Peco R., Pennings G., Raya A., Sermon K., et al. (2016) Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update* 22, 411-9.
- Yen S.T., Zhang M., Deng J.M., Usman S.J., Smith C.N., Parker-Thornburg J., et al. (2014) Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Developmental Biology* 393, 3-9.

Zhang Y., Li H., Min Y.-L., Sanchez-Ortiz E., Huang J., Mireault A.A., et al. (2020) Enhanced CRISPR-Cas9 correction of Duchenne muscular dystrophy in mice by a self-complementary AAV delivery system. *Science Advances* 6, eaay6812.

Zuccaro M.V., Xu J., Mitchell C., Marin D., Zimmerman R., Rana B., et al. (2020) Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos. *bioRxiv*, 2020.06.17.149237.