



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“CRISPR/Cas y su posible aplicación clínica vs enfermedades monogénicas en México;
perspectivas en un marco ético-jurídico y de salud pública”**

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

OSCAR HERNÁNDEZ SEPÚLVEDA

ASESOR: M. en C. Garbiñe Saruwatari Zavala

COASESOR: Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“CRISPR/Cas y su posible aplicación clínica vs enfermedades monogénicas en México;
perspectivas en un marco ético-jurídico y de salud pública”**

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

OSCAR HERNÁNDEZ SEPÚLVEDA

ASESOR: M. en C. Garbiñe Saruwatari Zavala

COASESOR: Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018

Agradecimientos

«Todo lo que existe nace sin razón, se prolonga por debilidad y muere por casualidad.» Jean-Paul Sartre

A mis padres, Lila y Oscar, a quienes esta tesis está dedicada.

Sé que mi vida universitaria no ha sido nada sencilla de sobrellevar por ustedes ya que las constantes peleas que sostuvimos cada fin de semestre cuando veía que la licenciatura no me gustaba o que no tenía futuro en lo que hacía y que mejor hubiera estudiado filosofía. Gracias papá por darme todo lo necesario para poder sobresalir en la universidad, cursos de inglés, cursos de biología molecular, artículos y libros. A ti mamá por no dejar que me muriera de hambre entre semana, a hacerme ver las cosas por medio de tu experiencia, por siempre preocuparte por que yo tuviera trabajo al terminar la licenciatura. Les agradezco a ambos su amor incondicional, aunque yo no siempre fuera algo digno de amar, les agradezco que me apoyaron durante toda la licenciatura y que no me faltara nada para poder continuar, el que si me despertaba tarde papá me dejaba bañarme primero para que yo llegara temprano a la FES aunque llegaras un poco tarde al trabajo. A ti father por haber tenido hasta tres trabajos al mismo tiempo para poder costear las comodidades de la casa, a ti mother por haber dejado de lado por unos años tu profesión médica para poder criar a mis hermanos y a mí, también por tomar el trabajo de las noches para que pasaras tiempo con nosotros entre semana. A ambos por perdonar y olvidar las mentiras y ofensas cometidas, por fumar todos el cigarro familiar.

Por todo eso y más les estoy enteramente agradecido.

A mis hermanos José, Montserrat y Miguel

La tesis no está dedicada para ustedes, pero los amo, gracias por estar ahí siempre que nos pelábamos mamá y yo. Gracias José por ayudarme a pasar álgebra aunque no entendiera nada, por ayudarme a ser mejor persona al ver tus sacrificios que hacías por mí y no hiciera nada por ti en un inicio. A ti Monche por estar siempre alegre en casa y platicar conmigo de babosadas sinsentido. A ti Miguel por ser el enano de la casa, nunca me percaté cuando creciste.

A mi tía/Dra. María Eugenia Sepúlveda González

Por haberme dado la oportunidad de comenzar mi vida de investigación contigo. Por tu manera de aconsejarme con las cuestiones microbiológicas y darme siempre otro punto de vista a que mi orgullo solo podía ver.

A mis abuelitos Nacho (RIP), Lila, Abraham y Ángeles

Por ser ustedes, por ser los octagenarios y nonagenaria de mis amores

A mis tíos Arturo, Ileana, Marigeli, Ileana S, Lupe, Dolores, Gabriel, Juan,

Por escuchar, por aconsejar, por ver por nosotros de una manera u otra

A la Profesora Lupita Witting y Guerrero

Por ayudarme a ver el mundo de manera diferente cuando estaba en quinto de primaria.

A mis suegros Juan Pablo y María, y cuñado Oscar

Por recibirme en su casa desde que su hija me llevó con ustedes, por su arroz entre semana, por aconsejarnos, por llevarnos, por ayudarnos a ser nosotros.

A mis amigos Christian, Icatíú, Lemuel, Luis Enrique, Arturo, Oscar, Cucho, Diego, Ángel, Gustavo, Ramiro, Estefanía, Erick, Leticia, Ximena, Marisa, Citlalli, Diana

Por hacer más llevadero la vida universitaria, por platicar, por debatir, por fumar, por beber, por pelearnos, por aconsejar, por ser ustedes.

A las profesoras Andrea, Rosalba, Margarita, Martita

Por ser las mamás académicas de media FES y no siendo yo excepción, les doy las gracias por todas las clases en horario y fuera de este. Por estar siempre pendientes de sus alumnos y aconsejar, pero más importante corregir.

A las profesoras Larisa, Maritere, Karla, Llasbeth, Betsabé, Sandra D, Sandra, Guadalupe, Elia, Cecilia, Nydia, Ana Laura, Paola, Dolores, Leticia, Gloria, Lourdes, Susana

Por no solo ser profesoras, pero también personas con las cuales se pude platicar de los problemas y temores de la vida. Por entender que los alumnos tenemos miedo de salir y crecer, pero ustedes

lo que hacen es convencernos que la vida no es tan terrible después de todo, ya que nos cuentan sus vivencias, sus logros y fracasos. Ya es cosa de nosotros tomar lo mejor de ustedes y aplicarlo en nuestras vidas. Gracias por ello.

A los profesores René, Erick, Ladislao, Victor Z, Victor V, Ángel, Israel, Jorge, Alejandro, Axel, Francisco.

¡Por ser los profesores más chidos que he tenido en la licenciatura!, siempre platicando de su vida, de la vida y de que hacer y que no hacer. Por ayudarme cada uno de ustedes con la tesis de una manera u otra. Al profe Ángel y Ladis por ser bibliotecas andantes, al Profe Alejandro por todo su apoyo para ya poder terminar la tesis y licenciatura. A todos ustedes por ser lo que son.

Al personal de laboratorio, biblioteca, administrativos e intendencia de la FES y del INMEGEN

Sin ustedes simplemente la FES se detiene y no podríamos hacer mucho, gracias.

A los Profesores más exigentes que he tenido en la FES; Dr. Ángeles, Dr. Marco, Dr. Botello, M.en C. Nathaniel, Dr. Victor Valdéz

Gracias por su manera de ser, de exigir y educar. Porqué en sus programas dan las aplicaciones de la teoría en la práctica de que debemos hacer “allá afuera”. En especial les agradezco el que sus exigencias me hayan puesto a estudiar más de lo que debía y que lo visto en clase me diera el trabajo que actualmente tengo. Gracias.

A Garbiñe

Por haberme aceptado en el grupo EJES, por estar ahí y discutir cuestiones ético-jurídicas con un neófito con sueños, por buscar que me quedara a trabajar en investigación contigo, por apoyarme en terminar la tesis, por el cafecito de la mañana, por las lecturas recomendadas y tu amistad.

A Violeta y Dra. Alessandra

¡Por estar siempre cuando tenía una duda y darse el tiempo de responder! Por platicarnos hasta en horas de trabajo y terminar por hacer nada. Gracias Dra Alessandra por ser la nona académica en cuestiones genéticas y clínicas, gracias Violeta por ser la bigsister en cuestiones jurídicas.

Al INMEGEN

Por darme la oportunidad de estar allá

A la UNAM

Mi alma máter, por brindarme todas las herramientas que requerí durante mi formación

A Servicios Genómicos, a Roxana, Oscar O, Carmen A, y Carmen B

Por darme mi primera oportunidad laboral, por enseñarme a trabajar en un empleo verdadero

Al Ing. Rodolfo Sánchez

Por darme mis clases de negocios y como trabajar en un ámbito corporativo

A BioMerièux, a Mirna, a Abraham, Juanjo, Susie, y Elvia

Por darme la oportunidad de trabajar en lo que amo, y por su manera de ser.

A mi amada esposa bbusca Perlita

Por tu dulzura, por tus besos, por tu apoyo, por escuchar, por estar conmigo, por ser tú y todo lo que engloba ese "tú". A pesar de que la tesis es dedicada a mis padres el fruto de esta ahora que ya terminé es para ti, para nosotros. Te amo

Índice

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Objetivos | 10 |
| Objetivo General | 10 |
| Objetivos Específicos | 10 |
| Metodología de investigación | 10 |
| Glosario | 11 |
| Índice de imágenes y tablas | 13 |
| Introducción | 14 |
| Capítulo 1 “Edición Genómica | 19 |
| 1.1 El Genoma Humano | 19 |
| 1.2 Edición Genómica y sus mecanismos | 25 |
| 1.2.1 Mutación/ Gen-Knockout | 28 |
| 1.2.2 Deleción de genes | 29 |
| 1.2.3 Corrección de genes | 29 |
| 1.2.4 Inserción de genes | 30 |
| 1.3 Generalidades sobre las Nucleasas para Edición Genómica | 31 |
| 1.3.1 Nucleasas-dedos-de Zinc (ZFNs) | 33 |
| 1.3.2 TALENs | 34 |
| 1.3.3.1 Historia del sistema CRISPR/Cas | 37 |
| 1.3.3.2 Características generales del sistema CRISPR/Cas | 38 |
| 1.3.3.3 Componentes del sistema CRISPR/Cas | 41 |
| 1.3.3.3 Proteínas Cas y funciones mecánísticas | 49 |
| 1.3.3.4 Clasificación del sistema CRISPR/Cas | 42 |
| 1.3.3.4 Complejos efectores en los sistemas CRISPR/Cas | 51 |
| 1.3.3.5 Mecanismo de CRISPR/Cas | 54 |
| 1.3.3.6 Sistema CRISPR-Cas como herramienta de edición genómica | 67 |
| 1.4 Especificidad de las Nucleasas | 68 |
| Capítulo 2 “Panorama general de las Enfermedades Monogénicas | 70 |
| 2.1.- Enfermedades Genéticas y Monogénicas | 70 |
| 2.1.1.- Desórdenes cromosómicos | 71 |
| 2.1.2.- Enfermedades monogénicas o mendelianas | 73 |
| 2.1.2.1.- Tratamientos disponibles para EMGs | 79 |
| 2.1.3.- Enfermedades genéticas multifactoriales | 82 |
| 2.2.- Enfermedades huérfanas, raras, y olvidadas en un contexto monogénico | 83 |
| 2.3.- Regulaciones internacionales para el desarrollo de medicamentos para EMGs | 85 |
| 2.4.- Enfermedades Monogénicas en México | 88 |
| Capítulo 3 “Ética” | 90 |
| 3.1.- Generalidades sobre la Ética | 90 |
| 3.2.- Ética de la Edición de la Línea Germinal | 96 |
| 4.1.- Políticas para la aplicación de la edición de embriones y línea germinal humana en diferentes países | 101 |
| 4.2.- ELG humana vía CRISPR/Cas o diagnóstico molecular preventivo como opción para evitar EMGs en la población | 104 |
| Capítulo 4 “Panorama Internacional sobre la edición de la línea germinal humana” | 101 |
| Discusión | 109 |

| | |
|--------------------|-----|
| Conclusiones | 119 |
| Bibliografía | 122 |

Objetivos

Objetivo General

Se empleará como modelo teórico de estudio a la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas y su posible aplicación como opción terapéutica alternativa al actual esquema de tratamiento farmacológico contra enfermedades monogénicas ofrecido por la Ley General de Salud en México, para determinar la factibilidad de su aplicación práctica-clínica tras analizar, constatar, y comparar las leyes, reglamentos o normativas imperantes concernientes a la edición de embriones humanos viables en nuestro país.

Objetivos Específicos

- Analizar de manera breve los aspectos éticos de la edición genómica de embriones humanos tomando como base los 4 principios de la bioética.
- Identificar a las poblaciones mexicanas con mayor riesgo de transmitir y padecer una enfermedad monogénica para determinar los posibles factores de riesgo relacionados.
- Establecer la posibilidad de realizar la edición genómica de embriones humanos en México tomando como referencia el marco jurídico que vela por la protección de estos.
- Encontrar las deficiencias o posibles problemas para la aplicación clínica de CRISPR/Cas tomando como referencia los programas nacionales en curso, y llegados a término, que contemplan el diagnóstico y tratamiento oportuno enfermedades monogénicas.

Metodología de investigación

Se realizará una recopilación y revisión bibliográfica en el lapso de un año de agosto del 2016 al 2017, tanto de libros, documentos gubernamentales oficiales, y revistas indexadas especializadas en los temas de edición genómica, biología molecular, genética molecular, ética aplicada, ética contemporánea, bioética, derechos humanos, salud pública, y farmacoeconomía empleando los motores de búsqueda accesibles por medio de la biblioteca del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Se limitará la búsqueda mediante las palabras clave: *germline genome editing, ethics of germline editing, monogenic disorders and treatments, genetic and genomic disorders, CRISPR/Cas germline editing, modern science ethics, applied philosophy of ethics, bioethics of germline editing*, más las sugeridas por ambos asesores. La depuración de la información se hará en base a los objetivos del trabajo tras leer el título, resumen, introducción, títulos de temas abordados y conclusiones del artículo o capítulo de libro.

Glosario

Advocacy associations.- término anglosajón que hace referencia a las organizaciones no gubernamentales que ofrecen ayuda integral a los pacientes y necesitados

ADN.- ácido desoxirribonucleico

ARNg.- ácido ribonucleico guía empleado en el sistema CRISPR/Cas; adaptado del término en inglés *gRNA*

ARNm.- ácido ribonucleico mensajero

ARNnc.- ácido ribonucleico no codificante; adaptado del término en inglés *noncoding-RNA*

ARNpnc.- ácido ribonucleico pequeño no codificante; adaptado del término en inglés *small-noncoding-RNA*

CBCM.- cuadro básico y catálogo de medicamentos del Consejo de Salubridad de México

CFDA.- siglas en inglés de la *Chinese Federal Drug Administration* o Administración Federal China de Medicamentos

Cascade.- término en inglés para *CRISPR-associated complex for antiviral defense*

CONEVAL.- siglas referentes al Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social

CRISPR/Cas o CCas.- siglas en inglés referentes a la herramienta de edición genómica *clustered regularly interspaced palindromic repeats*

crRNA.- término en inglés para *CRISPR-RNA*

crRNP.- término en inglés para *CRISPR-Ribonucleoprotein*

crRNA-ec.- término en inglés para *CRISPR-RNA-effector complex*

CsF.- clínicas de fertilidad

DGP.- diagnóstico genético preimplantacional

DUGHDH.- Declaración Universal del Genoma Humano y Derechos Humanos

DSS.- determinantes sociales de la salud

DxN.- diagnóstico neonatal

EG.- edición genómica

EHRs.- enfermedades huérfanas y raras

ELG.- edición de la línea germinal

ELGH.- edición de la línea germinal humana

EMA.- siglas en inglés referentes a *European Medicine Agency* o Agencia de Medicamentos Europea

EMG.- enfermedad monogénica

EnG.- enfermedad genética

EUCERD.- siglas en inglés referentes a *European Union Committee of Experts on Rare Diseases* o Comité de Expertos en Enfermedades Raras de la Unión Europea

FDA.- siglas en inglés para *Food and Drug Administration* o Administración de Alimentos y Medicamentos

FEMEXER.- Federación Mexicana de Enfermedades Raras

GWAS.- siglas en inglés para definir al estudio de asociación del genoma completo, o *genome-wide association study*.

Hairpin.- término en inglés para bucle

I&D.- investigación y desarrollo

Indels.- abreviación para inserciones y deleciones

ISCN.- siglas en inglés para el organismo internacional de nomenclatura en citogenética humana.

LGS.- Ley General de Salud, México

naive.- término anglosajón empleado en biología para hacer referencia a una “primera vez” o sin molde previo

NIH.- Instancia gubernamental del gobierno de los Estados Unidos de América. Corresponden a las siglas de los Institutos Nacionales de Salud, o *National Institutes of Health*.

NsEG.- nucleasas para la edición genómica

OMS.- Organización Mundial de la Salud

ONG.- Organización no gubernamental

ONM.- oligonucleótido monocatenario

PAM.- siglas en inglés para *Protospacer adjacent-motif* o motivo adyacente al protoespaciador

PGH.- Proyecto Genoma Humano

pre-crRNA.- siglas en inglés que hacen referencia al crRNA inmaduro

primed.- término anglosajón que designa a algo que ya cuenta con un modelo previo

PRIs.- poblaciones rurales e indígenas

RDC.- ruptura de doble cadena

RH.- reparación homóloga

RgH.- Acta de Regulación Huérfana

RLGSeMIS.- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, México

sgRNA.- siglas en inglés para *single-guided RNA*, o ARN guía sencillo.

SSA.- Secretaría de Salud, México

TALENs.- siglas en inglés para *Transcriptional activator like effectors nuclease* o nucleasas efectoras semejantes a activadores transcripcionales

TAR.- tecnología de asistencia reproductiva o tecnología de reproducción asistida

tracrRNA.- siglas en inglés para *trans-activating-CRISPR-RNA*

UTNH.- unión terminal no homóloga

VSN.- variante de un solo nucleótido

VSNns.- variante de un solo nucleótido no sinónima

ZFN.- siglas en inglés para *Zinc fingers nuclease* o nucleasa dedos de zinc

Índice de imágenes y tablas

| | |
|---------------------|------------|
| Figura 1.1.- | Página 29 |
| Figura 1.2.- | Página 31 |
| Figura 1.3.- | Página 35 |
| Figura 1.4.- | Página 35 |
| Figura 1.5.- | Página 36 |
| Figura 1.6.- | Página 41 |
| Figura 1.7.- | Página 43 |
| Figura 1.8.- | Página 44 |
| Figura 1.9.- | Página 49 |
| Figura 1.10.- | Página 53 |
| Figura 1.11.- | Página 56 |
| Figura 1.12.- | Página 59 |
| Figura 1.13.- | Página 60 |
| Figura 1.14.- | Página 62 |
| Figura 1.15.- | Página 64 |
| Figura 1.16.- | Página 65 |
| Figura 1.17.- | Página 67 |
| Figura 1.18.- | Página 68 |
| Figura 2.1.- | Página 73 |
| Figura 2.2.- | Página 76 |
| Figura 2.3.- | Página 77 |
| Figura 2.4.- | Página 77 |
| Tabla 1.- | Página 33 |
| Tabla 2.- | Página 51 |
| Tabla 3.- | Página 112 |

Introducción

Las enfermedades de origen genético o genómico son un conjunto de patologías cuyo fenotipo patológico es variable, con daños en un tejido particular o sistémico. Estas enfermedades se clasifican en monogénicas y poligénicas, afectando a un gen o a varios. A pesar de presentar fenotipos patológicos distintos ambos grupos comparten la característica de un daño genético o genómico reflejándose, principalmente, en la ausencia, sobre expresión o mal funcionamiento de su producto expresado. El diseño de opciones terapéuticas y manejo de la enfermedad es variado y dependiente del como el gen dañado o la combinación de estos afectan al paciente, lo que deriva en la viabilidad de poder diseñar o no un producto biofarmacéutico o farmacéutico. Otra característica que comparten varias de las patologías tanto monogénicas como poligénicas es una baja prevalencia en la población por lo que éstas se agrupan en un grupo conocido como Enfermedades Raras y Huérfanas, las cuales engloban ambas características ya descritas, baja prevalencia y la ausencia de opciones terapéuticas viables (Brinkman R, et al., 2006).

Antes de 1995 tanto la industria farmacéutica y biofarmacéutica limitaba la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para enfermedades monogénicas y poligénicas debido al riesgo económico que conlleva dicha investigación, por lo que en ese año el gobierno de los Estados Unidos promulgó el Acta de Medicamentos Huérfanos. En dicha acta se plantea beneficios económicos y exclusividad de mercado para las compañías biofarmacéuticas y farmacéuticas que diseñen y lleven al mercado medicamentos para enfermedades raras y huérfanas. Este modelo económico propuesto por los Estados Unidos fue rápidamente adoptado y puesto en práctica por otros gobiernos alrededor del mundo para asegurar un continuo desarrollo de medicamentos para la población menesterosa; a pesar de ello, prevalecen varios problemas para lograr la aprobación y comercialización del medicamento relacionados a las regulaciones imperantes en materia del diseño y prueba de los nuevos medicamentos a nivel tanto nacional como internacional. A pesar de las inversiones millonarias son pocos los medicamentos que llegan al mercado y al hacerlo poseen precios muy altos haciéndolos casi impagables. Recientemente ha habido una leve tendencia a la baja en el precio comercial para los medicamentos destinados a cánceres raros, mas no para el resto. Entre las enfermedades raras y huérfanas destacan más de 4,000 enfermedades monogénicas diagnosticadas a la fecha, de las cuales aproximadamente menos del 5% cuenta con un tratamiento

aprobado. Los medicamentos disponibles para algunas enfermedades monogénicas, especialmente aquellos destinados a un reemplazo enzimático, poseen los precios más altos en el mercado internacional, entre los \$250,000 a poco más de \$400,000 dólares por dosis la cual es requerida semanalmente o mensualmente por el resto de la vida del paciente (Phillips MI., 2013).

Debido a los altos costos de los medicamentos y en muchos casos una baja efectividad para mantener la integridad del paciente, se han buscado alternativas para poder suplir los actuales tratamientos disponibles y así ofrecer al paciente y a su familia una mayor calidad de vida. Mediante las diversas aplicaciones clínicas de las tecnologías genómicas se ha podido estudiar con mayor escrutinio a este grupo de enfermedades, mejorando así su diagnóstico y buscando mejorar su tratamiento por medio de la terapia génica o celular, ya que no existe mejor terapia que aquella que logre restaurar la función del gen disfuncional. Por medio de la terapia génica o celular se pretende diseñar de manera específica la secuencia canónica del gen e insertarla nuevamente en la célula o reemplazar la mayor cantidad de tejido disfuncional de manera ex vivo. Al igual que con cualquier otra tecnología o herramienta novedosa la terapia génica y celular han tenido sus historias de éxito y fracaso. A la fecha existen 2463 protocolos de investigación activos para diversas enfermedades; sin embargo, desde 1989 al 2016 solo se ha logrado la comercialización de un solo medicamento basado en terapia génica para una enfermedad metabólica relacionada al metabolismo de lípidos y ninguna autorizada para terapia celular. (Wirth T, et al., 2013).

El trabajo de laboratorio para el desarrollo de terapia génica y celular está sujeto a la casuística al momento de comprobar la integración y funcionamiento de lo realizado, por lo no siempre ha sido del todo efectivo. Entre los años 2012 y 2013 hubo un avance importante relacionado a las herramientas de modificación genética. Basada en el sistema inmune de las bacterias, el sistema CRISPR/Cas es capaz de reconocer mediante un RNA guía una secuencia diana específica, cortar ésta mediante su nucleasa en ambas hebras de DNA y al proveer a la célula de la secuencia deseada ésta es capaz de introducirla en el sitio de corte reemplazando así la secuencia anterior por una diseñada exprofeso (Charpentier E, Doudna JA., 2014; Charpentier E, et al., 2012). A finales del año 2013 se comenzó a trabajar la edición de líneas celulares humanas y de ratones mediante el sistema CRISPR/Cas obteniendo resultados sobresalientes como una alta precisión al reconocer la secuencia blanco y al añadir la secuencia exógena se observó una baja tendencia off-target, baja tasa de indels y aunado a esto se vislumbró la posibilidad de escalar la modificación no de un solo gen por vez sino a varios a la vez (Cong L, et al., 2013).

En el año 2015 un grupo de investigación empleo el sistema CRISPR/Cas para editar por primera vez embriones humanos y eliminar una enfermedad monogénica. En dicho experimento se emplearon embriones humanos triploides y debido a la inviabilidad de éstos no fue posible obtener resultados sólidos sobre la capacidad del sistema CRISPR/Cas como herramienta terapéutica en embriones humanos al encontrar una baja eficiencia de reparación de la secuencia deseada, mosaicismo, y cortes fuera del lugar al cual fue dirigida la nucleasa (Huang J, et al., 2015). A pesar de que el comité de ética de la Universidad de Sun Yat-Sen ,dónde fue llevado a cabo el estudio, aprobó éste debido a la inviabilidad de los embriones se inició un debate a nivel internacional entre la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, El NIH, La Academia China de Ciencias y la Real Sociedad de Londres sobre la responsabilidad inmanente de las mujeres y hombres de ciencias al editar la línea germinal humana. Dicho debate se dividió en dos posturas, quienes afirman que bajo ningún motivo es correcta la aplicación de la edición de la línea germinal humana debido a la existencia de técnicas de reproducción asistida y diagnóstico pre-implantacional, y otros quienes defienden que la edición de ésta es adecuada como opción para el tratamiento de enfermedades monogénicas. Al finalizar el debate se llegó al acuerdo de una moratoria sobre la prohibición de continuar la investigación en la edición de la línea germinal humana con aplicación clínica, y trabajar en regulaciones adecuadas para su aplicación tanto clínica como de investigación básica con el objetivo de evitar prácticas nocivas en un posible mercado negro y turismo médico en dónde la legislación en genoma humano y edición de este no se encuentren reguladas o mencionadas por sus leyes (Wade N., 2015).

Ninguno de los grupos de trabajo que formaron parte los debates son autoridades legales de lo que es posible hacer y lo que no, por lo que al poco tiempo de terminada la reunión se publicaron dos trabajos de investigación con embriones humanos para eliminar enfermedades monogénicas (Kang X, et al., 2016; Liang P, et al., 2015). Países como China, el Reino Unido, Suecia y ciertas regiones federales de los Estados Unidos permiten la creación expofeso de embriones humanos para la investigación básica pero no la implantación de estos para llevar a término un embarazo (Cavaliere G., 2017). A la fecha existen 20 protocolos de investigación clínica que aprueban el uso de CRISPR/Cas, su gran mayoría se llevan a cabo en China, para tratamiento de diferentes cánceres o inmunodeficiencias basándose en la edición de las líneas somáticas y posterior re-inserción al cuerpo del paciente (Olena A, 2017). Por otro lado, los trabajos publicados que buscan la edición de la línea germinal humana con CRISPR/Cas son pocos y no existe una periodicidad en su publicación; sin embargo, cada uno de ellos ha terminado con la destrucción del

embrión por norma, obteniendo diferentes resultados en cuanto a la practicidad y aplicabilidad clínica. Los autores de los artículos publicados no descartan su continua investigación y aplicación futura cuando la tecnología desarrollada llegue a probar su completa seguridad (Vassena R, et al., 2016).

A mediados del año 2016 se llevó a cabo en México un procedimiento de manipulación embrionaria para remplazo mitocondrial. El trabajo clínico fue llevado a cabo con éxito, y de hecho el bebé que nació actualmente goza de perfecta salud. La cobertura mediática fue inmediata y entre las declaraciones realizadas por los responsables del procedimiento se destacó el hecho que México no cuenta con una regulación fuerte en cuanto al genoma humano, tampoco cuenta con una regulación en materia de reproducción asistida y lo poco que está disponible permite una libre interpretación a lato sensu para la aplicación de cualquier procedimiento. La declaración anterior tardo poco tiempo en politizarse con dos partidos políticos previendo una regulación ajustada de la metodología en materia de reproducción asistida y prohibiendo cualquier modificación al genoma humano al considerarlo como poco ético (Cavaliere G., 2016). A la fecha no ha habido más declaraciones por parte de las cámaras de diputados y senadores de México.

Es importante considerar y ponderar de manera adecuada los riesgos y beneficios que se obtendrían de permitir primeramente la investigación básica y posterior aplicación clínica terapéutica de la modificación del genoma humano a partir de la línea germinal. En México existe un número desconocido de pacientes afectados por enfermedades monogénicas y el tratamiento farmacológico disponible no es el más amplio por lo que diversas organizaciones no gubernamentales se han dado a la tarea de concientizar a la población de las necesidades especiales de estos pacientes y buscar donaciones para tratamientos no disponibles en México. Considerando la problemática anterior que sufren los pacientes y sus familias, la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas es una opción que debe ser considerada por las legislaciones mexicanas y la opinión pública pues al realizar un análisis consecuencialista de la situación el beneficio podría extenderse a no solo las parejas afectadas que deseen tener un hijo sano, sino a la población en general al ofrecer una alternativa en caso de no saber que también son portadores sanos de una enfermedad monogénica.

La introducción de CRISPR/Cas para la edición de la línea germinal humana a cualquier sistema de salud plantea serios problemas y dilemas éticos, sociales, y económicos tanto para el sector público como el privado pues es necesario buscar un bien común y no solo para un sector poblacional. Otro problema es la adecuación de las legislaciones para que a la larga se permita la

modificación de la línea germinal al emplear para ello un embrión humano viable y así mismo, garantizar que el producto de una concepción mediante la edición genómica goce de todas las garantías y derechos que una persona concebida de manera natural y viceversa. Lo importante no es prohibir sino regular de manera adecuada en base a las necesidades conocidas y las nacientes.

Capítulo 1 “Edición Genómica”

1.1 El Genoma Humano

La triada vida-enfermedad-muerte ha cautivado a la humanidad desde los albores de la misma adjudicando la causante a los malos humores, a demonios o al pecado original. Al avanzar el estudio de la salud humana se amplía a su vez el conocimiento de las diferentes etiologías causantes de enfermedad y muerte. Las primeras etiologías descritas involucran a los microorganismos y parásitos; sin embargo, una persona logró describir una relación “familiar” entre pacientes afectados. Al Dr. Sir Archibald Garrod se le adjudica la primera descripción de una enfermedad genética al evaluar su carácter recesivo entre los miembros de varias familias estudiadas (Porteus MH., 2015), en su momento él lo denominó “un carácter heredable” y dejó de lado el estudio biológico para concentrarse en las causas químicas de la alcaptonuria.

Gracias a los grandes avances de la medicina se han podido vislumbrar las diferentes etiologías de enfermedades humanas, destacando entre ellas las de origen genético. Las primeras descripciones de enfermedades genéticas incluían análisis del número final de cromosomas, mas, ello sólo aplica para ciertas patologías dejando de lado a todas aquellas en las cuáles modificaciones estructurales o en el número de copias de cromosomas no estaban alterados (Gersen SL, Keagle MB., 2013). Poco a poco se comenzó el estudio *molecular* de los cromosomas y sus regiones, dando comienzo a la era de la biología molecular y a su vez de la conceptualización del *genoma*.

El estudio de la genética humana ha impulsado una vasta cantidad de proyectos enfocados en el mejoramiento de la salud y entendimiento de las enfermedades que han aquejado a la humanidad. A inicios de 1990 se tenía un conocimiento básico del funcionamiento de los genes y su relación con enfermedades humanas; sin embargo, no se veía venir un tratamiento adecuado para todas ellas. Así pues, la lógica empleada fue -si encontramos la causante genética de una enfermedad podemos diseñar plataformas de diagnóstico temprano y finalmente llegar a un tratamiento personalizado-, y de esta forma surge a principios de la década de 1990 el primer proyecto de cooperación internacional para la investigación genómica humana. El Proyecto Genoma Humano (PGH) nació con el objetivo de develar la posición y función de cada uno de los genes contenidos en los 23 pares de cromosomas. Así mismo, el PGH prometía crear un “genoma de

referencia” contra el cual cotejar las diferentes variables genéticas relacionadas a una patología y corregirlas *expofeso* mediante la introducción de la variable canónica. En sí, el PGH planteaba dar inicio a la era de la medicina personalizada (Olson MV., 1993; Green ED, et al., 2011).

El PGH parte del paradigma “un gen, una proteína” basado en el primer modelo del dogma central de la biología molecular, que llevó a la especulación (fuertemente arraigada entre los científicos) de la existencia de entre 50,000 a más de 100,000 genes codificantes funcionales. Este punto de partida fue de gran importancia debido a que se pensaba que gran parte del genoma humano era enteramente codificante y de ser así el mapeo completo del mismo no tomaría más de 5 años (Dham R., 2005).

Tras 12 años de secuenciar pequeños fragmentos, armarlos y estructurarlos en un orden lógico el PGH comenzó a dar sus primeros frutos. En el año 2001 dos grupos de investigación independientes publicaron los primeros borradores del genoma humano con resultados sorprendidos. Entre ellos y de los más importantes es que el genoma humano no posee más de 100,000 genes codificantes como se había hipotetizado, sino que sólo el 1.1% del genoma humano es codificante. El genoma humano se compone de ~3.2 mil millones de pares de bases, de las cuales solo ~35 millones de pares de bases son responsables de ~180,000 exones correspondientes a poco más de 20,000 genes (Venter CJ, et al., 2002; Lander ES, et al., 2001). Tras la culminación del PGH nació la división y clasificación del genoma humano de acuerdo con su capacidad de expresar un producto funcional, ya sea en regiones codificantes y regiones no-codificantes también conocidas como ADN basura.

Las regiones codificantes del ADN fueron las primeras y más ampliamente estudiadas, incluso antes del PGH, en diferentes procesos celulares tanto de homeostasis como patologías. Tras terminar el PGH fue posible determinar que los genes y exones resultantes de estas regiones poseen una gran variabilidad sujeta al splicing-alternativo por el cual cada uno de los exones es sometido. Ejemplo de lo anterior es el gen de la histona H1A, cuya secuencia génica es de 781 nucleótidos sin intrones que resultan en una proteína de 215 aminoácidos; por otro lado, la distrofina abarca más de 2.2 millones de pares de bases, que resultan en 79 exones, mientras que la titina abarca 281,434 pares de bases pero genera 364 exones (Marian AJ., 2015). Esta relación entre intrones-exones-longitud del gen se adjudica a mecanismos evolutivos de millones de años y aún no existe una respuesta contundente (Bernardi G., 2008). Es importante recalcar que todo el proceso de expresión de un gen se dice fácil, más involucra mecanismos altamente regulados para mantener la homeostasis celular (Alberts B, et al., 2008).

Por otro lado, las regiones no-codificantes del ADN son más variadas y están compuestas por múltiples elementos entre los que destacan: pseudogenes, regiones intrónicas, secuencias reguladoras del ADN como promotores, potenciadores, silenciadores e insuladores, secuencias repetitivas y secuencias relacionadas a elementos genéticos móviles llamados transposones (Riethoven JJ., 2010; Salzberg SL, et al., 2011). A pesar de que desde 1960 las regiones no-codificantes del ADN ya eran conocidas faltaba revelar su papel en la biología celular, en qué proporción se encontraban y en dónde. Las primeras regiones no-codificantes del ADN en ser estudiadas y asignarles un papel biológico fueron las secuencias reguladoras del ADN e intrones, a quienes corresponde entre el 8-20% y 26% del genoma humano, respectivamente (The ENCODE Project Consortium., 2013). Posteriormente, las regiones repetitivas del ADN fueron vistas como marcadores biológicos en análisis forense, genealogía, patologías e integridad telomérica (Salzberg SL, et al., 2011), mientras que los diferentes elementos móviles del ADN fueron concebidos como los “arquitectos” del genoma al tener la capacidad de integrarse en diferentes posiciones génicas y promover eventos de mutagénesis o inversiones y translocaciones de secuencias genómicas completas (Morell SH., 2014, 1-26). Recientemente se ha comprobado que las regiones no-codificantes del ADN en realidad sí son codificantes. Este fenómeno se conoce como transcripción penetrante o profunda (adaptado del término en inglés *pervasive transcription*) en el cual se da lugar la generación de >50,000 ARNs-no-codificantes (ARNnc), incluyendo >2,000 *microARNs*. Muchos de estos dos últimos elementos están involucrados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la correcta regulación de la producción de proteínas (Marian AJ., 2015; Bird A., 2013).

Es así que tanto la combinación de las secuencias codificantes y no-codificantes se involucran en los procesos de expresión y mantenimiento del genoma humano; una guarda y expresa mientras la otra regula parte del proceso. Tras terminar el PGH se dieron a la tarea de comenzar a emplear los resultados y los conocimientos técnicos adquirido durante los 12 años de investigación. Una de las primeras aproximaciones fue en el ámbito del diagnóstico para la secuenciación personalizada del genoma debido a la gran abundancia de variantes en cada ser humano que pudiesen estar relacionadas a patologías. Las primeras dos personas en ser secuenciadas y hacer públicos los resultados con la comunidad científica entre los años 2006 y 2008 fueron el Dr. John Craig Venter y el Dr. James D. Watson. El genoma del Dr. Watson comprende cerca de 3.3 millones de variantes de un solo nucleótido (VSNs), incluidas >10,000 variantes de un solo nucleótido no-sinónimas (VSNns); de las cuáles 7.3% son posiblemente patogénicas, y 310 VSNns implicados en enfermedades humanas. Así mismo, el Dr. James D. Watson posee en su

genoma 10 variantes génicas relacionadas a enfermedades monogénicas recesivas con un alto grado de penetrancia, y hasta dónde es sabido, él y sus hijos no padecen ninguna de las enfermedades a las que estaban predispuestos. Caso similar es el Dr. John Craig Venter (Marian AJ., 2015). La categorización distintiva de variantes clínicas es y ha sido un gran reto para las biociencias estando siempre sujetas tanto a falsos positivos y falsos negativos.

El fenotipo “expresado” por un genoma es la resultante de la confluencia de una gran variedad de factores genéticos y ambientales, donde cada uno contribuye a su manera en la expresión genómica. Las variantes genéticas en cada uno de nosotros (logro importante del PGH) son importantes determinantes del fenotipo, pero su efecto ponderado es variado con rangos de lo despreciable hasta importante, incluidas aquellas con una penetrancia casi completa (Marian AJ., 2015; Bird A., 2013).

El genoma humano es una unidad compleja, con la capacidad de responder a estímulos celulares y ambientales. Parte de esta capacidad de respuesta es estudiada bajo los elementos funcionales del ADN que incluyen genes codificantes de proteínas y ARNnc, versiones canónicas y variantes de transcritos, diferentes sitios de interacción proteína-material genético, proteínas mitocondriales contenidas en el genoma nuclear y epigenómica/ epigenética (The modENCODE Consortium, et al., 2010). Es en este punto cuando “genoma” comienza a ser visto como algo más allá del código genético, o de meras instrucciones; ya que la unicidad del correcto funcionamiento celular subyace no sólo en el número de genes, sino en el complejo control y regulación de los mismos en cuanto al cómo, cuándo y dónde deben ser expresados.

Per se cada célula en nuestro organismo está formada por el mismo material genético nuclear, sin embargo, este no se encuentra “libre” dentro del núcleo celular, sino enrollado en complejos de proteínas llamadas histonas; éstas están sujetas a modificaciones post-transduccionales como metilación y acetilación, pero sin cambiar la secuencia original en la doble hebra. Esto permite una regulación continua del estado de la cromatina para permitir o denegar el acceso a reguladores de la transducción específicos. Lo anterior da lugar en parte a todos los linajes celulares mediante la expresión diferencial de genes. La mayoría de estas diferencias y exclusividades en la expresión de los genes surgen durante el desarrollo primario embrionario y son retenidas durante la mitosis, regulando así complicados patrones de expresión ya en la vida adulta. Este campo de la epigenética/ epigenómica tuvo un importante incremento en producción científica en el campo de la oncogenómica al descubrir ciertas regiones de genes sujetos a una hipermetilación diferencial en protooncogenes, que resultaban en la malignización tisular o mantenimiento de un

estado de salud (Bird A, Jaenisch R., 2003). Recientemente se ha encontrado que no sólo regiones en el genoma e histonas son susceptibles a estos cambios epigenéticos, también lo son los ARNs mensajeros (ARNm). Resulta ser que estos intermediarios en la expresión de un gen poseen complejos patrones de metilación que se relacionan con la regulación y mantenimiento de la expresión en diferentes tejidos y patologías. A este proceso se le ha denominado *epitranscriptómica* (Chi KR., 2017).

El estudio del genoma humano ha abierto la puerta a muchos proyectos de investigación como: los 100 o los 1000 genomas; ENCODE; El Genoma de la República Popular de China; El Genoma Coreano; El Genoma Mexicano; mapas epigenéticos/ epigenómicos de tejidos humanos; librerías de ARNs largos no-codificantes; librerías de ARNm; secuenciación de genoma completo; secuenciación de exoma completo; estudios de secuenciación de genoma completo (GWAS/WGAS); búsqueda y asignación de variantes genéticas en diversas patologías; y un largo etcétera; todo lo anterior está en función de determinar posición, función(es), relación(es), interacción(es), diferencias y similitudes entre los genes contenidos en los 23 pares de cromosomas. La intención de muchas investigaciones es acercarnos un poco más a la utopía de la medicina personalizada.

A pesar de que por poco más de 30 años se ha estudiado al genoma humano, actualmente no existe una definición acordada entre científicos y legislaciones para el término “genoma”; sin embargo, de manera general, se emplea para hacer referencia a la secuencia polimérica completa de cuatro nucleótidos dispuestos de manera particular que conforman el material genético de un organismo. Es común el entender y conceptualizar al genoma como una secuencia, o código, inmutable y heredable que contiene todas las indicaciones para formar a un organismo. Si bien es cierto que el genoma está conformado por la polimerización de cuatro bases nitrogenadas posicionadas en un orden particular de pequeños bloques de información llamados genes y estos a su vez expresan un producto funcional, el genoma va más allá de una aproximación simplista y determinista con grandes repercusiones en salud y enfermedad.

La investigación del genoma humano ha planteado retos para todos los campos de las biociencias pero a su vez desencadenó una serie de dilemas ético-jurídicos, muchos de los cuáles se discuten aún hoy en día. Esta serie de problemas se pueden resumir en 4 categorías que competen tanto al derecho como a las regulaciones internacionales en materia de:

- a. Manipulación genética (embriones, quimeras, clonación, etc).
- b. Tratamiento y protección de la información genética.
- c. Discriminación fundada en razones genéticas.

d. Apropiación del material genético, comprendiendo el régimen de acceso. (Darío Bergel; 2002)

La serie de problemáticas mencionadas engloban una serie de dilemas que conllevan de manera directa o indirecta tanto a la eugenesia positiva y negativa; siendo este ámbito eugenésico el más ampliamente debatido y cuestionado ya que la división entre una aplicación correctiva y una eugenésica es casi inexistente e históricamente su aplicación ha terminado en catástrofes humanitarias. (Knoppers B., 1999, citado por Darío Bergel., 2002).

Por esta serie de problemas la UNESCO se dió a la tarea de proclamar en 1997 la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y Derechos Humanos (DUGHDH); la cual vincula al género humano, siendo éste un ente biológico-social, y sus inmanentes derechos para evitar actos de violencia o discriminación como los vistos en la Segunda Guerra Mundial (UNESCO,1997).

La DUGHDH establece que:

Artículo 1.- El genoma humano es la base de la unidad fundamental de todos los miembros de la familia humana y reconocimiento de su dignidad intrínseca y su diversidad. En sentido simbólico, el genoma humano es el patrimonio de la humanidad.

Artículo 2.-

a. Cada individuo tiene derecho al respeto de su dignidad y sus derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas.

b. Esta dignidad impone que no se reduzca a los individuos a sus características genéticas y que se respete el carácter único de cada uno y su diversidad.

Artículo 3.- El genoma humano, por naturaleza evolutivo, está sometido a mutaciones. Entraña posibilidades que se expresan de distintos modos en función del entorno natural y social de cada persona, que comprende su estado de salud individual, sus condiciones de vida, su alimentación y su educación.

Artículo 4.- El genoma humano en su estado natural no puede dar lugar a beneficios pecuniarios.

En ella rezan los principios básicos de igualdad y no discriminación que se deben tener considerando que cada uno de nosotros compartimos aproximadamente el 99.09% de nuestro

genoma con nuestros congéneres y es en aquella fracción sobrante dónde recae la gran diversidad de la humanidad. Esta declaración sentó la base para que diferentes países también adoptaran medidas para la protección del genoma humano. Es por ello que cada legislación posee diferentes definiciones formales y sustantivas del mismo. Países como EUA, Canadá, Alemania, Argentina y España actualmente cuentan con órganos e instrumentos legales bien definidos de lo que es posible realizar en investigación del genoma humano, pero sobre todo de lo que es y que define al genoma humano (Jürgen; 2002). Es importante volver a recalcar que en la actualidad no existe una definición acordada entre los científicos, países o legislaciones para el término “genoma”, empero comúnmente se emplea para hacer referencia a la secuencia completa de nucleótidos que conforman el código genético de un organismo. No es finalidad del presente trabajo realizar una comparación entre las diferentes legislaciones; más es importante dar a conocer que cada país tiene definiciones y acercamientos diferentes para el genoma humano.

En el año 2011 en México se añadió a la Ley General de Salud (LGS) el capítulo Quinto Bis que comprende los artículos 103 Bis al 103 Bis 7, el contempla al genoma humano. El *Artículo 103 Bis* establece que *“El genoma humano es el material genético que caracteriza a la especie humana y que contiene toda la información genética del individuo, considerándosele como la base de la unidad biológica fundamental del ser humano y su diversidad”*. En el resto del capítulo también se hace referencia a la no-discriminación, confidencialidad de la información genética, objetivos de la investigación en pro de la salud, y cada individuo es propietario de su información genética.

Tanto la mencionada Declaración, como la LGS consideran al genoma humano como un profundo vínculo para nuestra especie e induce a la reflexión sobre la igualdad de las personas y entre personas, lo que se ve traducido en el principio de no-discriminación. Una parte importante de la aproximación compartida tanto por la DUGHDH y la LGS es que contemplan las múltiples y complejas interacciones que suceden dentro de las células y dan como resultado un fenotipo, esto es, que no lo ven una estructura biológica inalterable sino como una estructura dinámica.

1.2 Edición Genómica y sus mecanismos

La edición genómica (EG), previamente llamada *targeting* de genes, es un método para modificar una o varias secuencias de nucleótidos en el genoma de un organismo. El proceso fundamental de la EG depende de crear en el ADN rupturas específicas llamadas rupturas de doble cadena (RDC; adaptado del término en inglés *double-strand-brakes*), tras lo cual la célula empleará sus mecanismos de reparación de RDC para arreglar el daño inducido viéndose reflejado en cambios

específicos de nucleótidos en la secuencia. Al modificar mediante RDC al ADN, los científicos han podido dirigir los mecanismos de reparación endógena para crear modificaciones genómicas específicas como sustituciones de un solo nucleótido, deleciones tanto largas y cortas, e inserción de secuencias exógenas de ADN en regiones genómicas deseadas.

La célula posee dos mecanismos principales para la reparación de las rupturas de doble cadena, unión terminal no-homóloga (UTNH; adaptado del término en inglés *non-homologous end joining*) y recombinación homóloga (RH; adaptado del término en inglés *homologous recombination*). En un proceso de UTHN, ambos fragmentos terminales de la hebra rota del ADN son ligados nuevamente mediante una serie de pasos que involucran a las proteínas Ku70, Ku80, ADN-PKcs, ADN ligasa 4, y proteínas XLF; este proceso de ligamiento se conoce como *zurcido molecular*. Generalmente, las regiones terminales creadas tras el corte con nucleasas son reparadas con alta fidelidad (> 70%) y al volverse a unir los extremos no se crean mutaciones por UTHN (Porteus M., 2016; Davis AJ, Chen DJ., 2013). Este mecanismo no requiere de un molde previo de ADN para re-ligar la cadena de ADN; sin embargo, es proclive a errores y es común observar inserciones y/o deleciones (indels) en el sitio dónde fue llevado a cabo el corte inicial. Los indels son causados debido a la actividad prolongada de la nucleasa empleada, la cuál vuelve a cortar en el sitio que fue previamente reparado y re-ligado, creando nuevamente otra RDC lo que eventualmente llevará a formar indels en el sitio de corte. A lo anterior se le debe añadir la complejidad del daño a reparar, por lo que la célula dispondrá de múltiples enzimas que cortaran o modificarán los extremos terminales para llevar a cabo la reparación; es en este proceso en el cual se pierden bases de la secuencia. Por otro lado, el evento de inserción involucra ADN libre que se encuentra en el núcleo celular, el cual es incorporado durante el evento de reparación. El tamaño de los indels es variado, pero usualmente involucra de 1-15pb pero pueden ser mucho mayores (Porteus M., 2015; Davis AJ, Chen DJ., 2013).

El segundo mecanismo de reparación de RDC es el llamado RH, el cuál es dependiente de una secuencia homóloga, la cual está disponible durante la fase G2 del ciclo celular. Durante el evento de RH la célula identifica los extremos rotos y crea extremos libres 3', los cuales interaccionan físicamente con una sección de homología al sitio del RDC creando un bucle-D y emplea a ese homólogo de ADN a manera de molde en un mecanismo en el cual se polimeriza la sección homóloga y se liga al gen dañado todo sin dañar al molde inicial. De manera común, el molde empleado es la cromátida hermana. Durante la edición genómica selectiva mediante RH se ha visto

que la célula prefiere incorporar el ADN exógeno en vez de invadir la secuencia homóloga (Porteus M., 2016; Gersbach CA, Meader ML., 2016; Porteus M., 2015).

El mecanismo por el cual la célula elige como reparar una RDC es desconocido a la fecha. Ambos mecanismos de reparación son esenciales en las células, mas defectos en cualquiera de las fases de RH es resultante en muerte celular tras uno o dos ciclos celulares; por otro lado, defectos en UTHN requieren de más ciclos celulares antes de la muerte celular (Porteus M., 2015).

La evolución de la EG provino de tres líneas de investigación individuales, las cuales compartían como objetivo la modificación del genoma de un organismo. La primera línea de investigación se basó en la importancia del *targeting* de genes para modificar genomas celulares en la cual se reparaba el ADN por RH. Este método poseía bajas tasas de eficiencia (en el orden de 10^{-6} a 10^{-7}) debido a que no empleaba la inducción de RDC, por lo que no se consideró como opción terapéutica; sin embargo, sentó las bases para la EG. El segundo método se basó en la inducción localizada de una RDC, tras lo cual se estimulaba la vía de reparación RH lo que corregía el daño en el ADN. La inducción de RH por RDC aumentaba entre 100 a 50,000 veces la eficiencia de reparación (dependiente del tipo celular y condiciones de experimentación), mas solo el 5% de las células en cultivo presentaban la reparación del gen. El tercer método se basó propiamente en la ingeniería de nucleasas para diseñarla *exprofeso* a un sitio específico. Para lo anterior se fusionó un dominio de unión al ADN tipo dedo de zinc a una nucleasa de restricción tipo II llamada FokI, con lo cual se podía diseñar el sitio de unión y secuencia mediante la modificación del dominio dedo de zinc y así dirigir el corte (Porteus M., 2016; Gersbach CA, Meader ML., 2016; Porteus M., 2015; Barbas III CF, Gaj T, et al., 2013).

Las recientes investigaciones en edición genómica parten del aprovechamiento de la maquinaria de reparación endógena del ADN, con la cual ha sido posible diseñar una gran variedad de alteraciones genómicas de manera localizada. Para ello a través de los años se han propuesto 4 vías factibles para eliminar o “añadir genes” en una determinada posición: mutación/gen-knockout, delección del gen, corrección del gen, e inserción del gen. Cada una tiene particularidades por las cuales pueden ser empleadas o no en un modelo de estudio, mas lo importante es el objetivo de dicha modificación (Barbas III CF, Gaj T, et al., 2016; Gersbach CA, et al., 2016; Naldini., 2015).

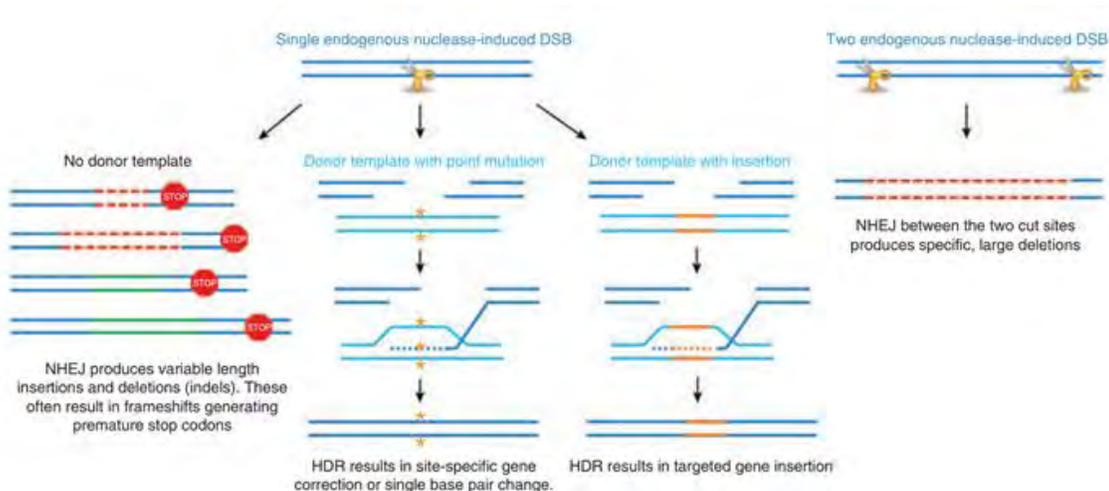


Figura 1.1.- Esquematación simplificada sobre los mecanismos de reparación del ADN tras RDC por una nucleasa vía RH y UTNH. (Tomado de Gersbach CA, Meader ML., 2015)

1.2.1 Mutación/ Gen-Knockout

Es la manera más sencilla de edición genómica que emplea la naturaleza proclive a errores del UTNH para introducir pequeños indels en los sitios blanco. La vía clásica de UTNH une de manera directa los extremos dañados del ADN sin procesar, mientras la vía alterna llamada *unión de extremos-mediado-por-microhomología* (MMEJ) requiere de “emparejar” los extremos dañados. Parte del proceso de MMEJ, tras empalar los extremos, consta en una alineación por microhomología y subsecuente ligamiento de la cadena del ADN. Una característica de ambos UTNH es que pueden llevarse a cabo en cualquier fase del ciclo celular, mas, ambas producen al final indels en el sitio reparado (Gersbach CA, et al., 2016; Hotta A, et al., 2014)

Al emplearse una nucleasa dirigida a una región codificante en particular, el mecanismo de UTNH no cambia, pero, el resultado es una modificación en el marco de lectura del gen objetivo. Dependiendo de lo que se desee realizar es posible obtener ventaja de este mecanismo, ya sea para inducir indels que restauren el marco de lectura, o inducir un cambio en el marco de lectura que cause un knockout. La última aplicación es la más común, debido a que es posible inducir a una modificación disruptiva de manera permanente en el gen objetivo. En la distrofia muscular de Duchenne se ha realizado con modelos celulares, la restauración parcial de la proteína funcional al

inducir indels ya sea *up-stream* o *down-stream* del sitio de la mutación. Caso contrario es la enfermedad de Huntington, en donde la expansión en el alelo del gen de la huntingtina (*HTT*) es causante de la intoxicación por una proteína mutante; que es posible “corregir” al inducir indels para acortar los repetidos y así llevar a una proteína trunca e infuncional (Gersbach CA, et al., 2016; Marian AJ., 2016; Tolar J., 2015).

1.2.2 Delección de genes

Los indels producidos tras UTNH son pequeños (< ~25pb), pero es relativamente sencillo aumentar el tamaño del indel al flanquear la secuencia con dos RDC. Al realizar dos RDC de manera simultánea se aumenta la cantidad de bases “borradas” en el orden de megabases. Esta aproximación es útil para estrategias terapéuticas que requieran de remover una región completa para así inutilizarla, como es el caso de regiones *enhancers* involucradas en hemoglobinopatías, o en distrofias musculares en donde es posible eliminar múltiples regiones internas del gen. Estas regiones a su vez cambian el marco de lectura y al ser eliminadas es posible recuperar una proteína parcialmente funcional (Gersbach CA, et al., 2016; Tolar J., 2015).

1.2.3 Corrección de genes

Si bien es cierto que tras una ruptura en la doble cadena existen resultados impredecibles por parte del mecanismo UTNH, es posible inducir a la edición genética estimulando a la vía de recombinación homóloga; sin embargo ello no es sinónimo de éxito en todos los intentos. La vía de recombinación homóloga se encuentra activa principalmente en las fases S y G2 del ciclo celular, empleando de manera canónica la cromátida hermana como molde para la reparación del ADN; sin embargo, se puede suministrar de manera exógena un molde diseñado a la zona que se desea corregir. Es así que cualquier secuencia encontrada en el *molde* suministrado puede ser incorporada a un locus deseado.

El problema para lograr lo anterior ha sido la manera en la cual se introduce la secuencia diseñada a la célula. De manera tradicional los plásmidos han sido la opción más común, pero no siempre efectiva. Actualmente se han empleado para el mismo propósito dos métodos: el primero consta de oligonucleótidos monocatenarios (ONM; adaptado del término en inglés *single-stranded oligonucleotides*) < 80pb; y el segundo de vectores virales. Los ONM se emplean de manera directa como moldes, mientras en el segundo se toma como ventaja la capacidad recombinante de los virus-adeno-asociados (Gersbach CA, et al., 2016; Porteus MH., 2015 (2)).

1.2.4 Inserción de genes

El objetivo de la terapia génica es restablecer la función de un gen tras la inserción de una copia “sana” de éste al locus correspondiente. El problema principal es que mediante los métodos comunes más empleados, como lo es la integración viral, es casi imposible controlar de manera completa el sitio de integración, traduciéndose esto en una mutagénesis no intencionada. Para solventar un poco este problema es necesario flanquear la secuencia deseada con extensiones homólogas, incluyendo secuencias idénticas al sitio donde fue realizado el daño; lo que permite una integración específica mediada por RH. Esta inserción dirigida debe ser realizada en loci claves llamados “bahías de seguridad”, lo que disminuye el riesgo de mutagénesis no intencionada y permite mantener una elevada expresión del transgén. Como mecanismo alternativo para la inserción dirigida del transgen es posible optar por forzar la unión mediante UTNH, con sus respectivos inconvenientes (Gersbach CA, et al., 2016; Porteus MH., 2015; Van Ness B., 2015).

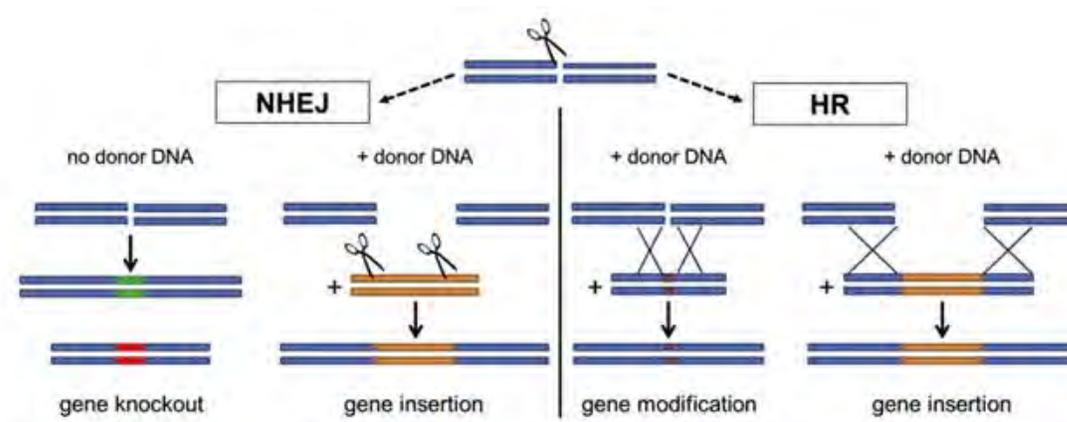


Figura 1.2.- Esquematización de las cuatro estrategias de edición genómica. Tomado de Meader ML & Gersbach CA, 2015.

1.3 Generalidades sobre las Nucleasas para Edición Genómica

Las nucleasas para edición genómica (NsEG) son herramientas moleculares empleadas para eliminar, borrar, o remplazar una secuencia génica en específico. Lo anterior es logrado gracias a que pueden ser diseñadas para reconocer y cortar secuencias en el genoma nuclear de entre 18-40pb mediante sus dos componentes principales. El primero de ellos consta de una endonucleasa con un módulo de corte-ADN; y el segundo es un dominio de unión específico a la secuencia del ADN deseada. En si, la combinación de ciertas nucleasas con un dominio de unión específico al ADN puede ser diseñadas en conjunto para virtualmente reconocer cualquier secuencia en el genoma nuclear. Las actuales herramientas como TALENs, ZFNs y CRISPR/Cas comparten las características ya mencionadas, volviéndolas necesarias para realizar alteraciones predeterminadas.

Debe ser entendido que el objetivo de toda herramienta de edición genómica tiene como fin realizar rupturas en el ADN genómico, sin importar su posición. Todas las NsEG son capaces de llevar a cabo su objetivo con alta especificidad, mas ninguna es perfecta. Durante el proceso de RDC, y por lo tanto de realizar los cambios deseados, se induce a la reparación del ADN por alguna de las dos vías ya mencionadas. Cada vía de reparación da como resultado una forma diferente de alteración genómica ya sea prevista o imprevista; por lo que, el sitio blanco de la nucleasa y el diseño del molde exógeno deben ser considerados dependiendo de la aplicación final de la edición genética (Hotta A, et al., 2013).

El campo de NsEG no es nuevo pues el primer reporte de su aplicación data del año 2005. En el modelo experimental se empleó la herramienta nucleasa con dominios de dedos de zinc (ZFNs) en un modelo de células de cultivo humanas para restaurar la función en el gen IL2R γ relacionado a la enfermedad inmunodeficiencia combinada grave ligada al X (X-linked-SCID/ SCID), con resultados favorables (Hotta A, et al., 2013; Urnov FD, et al., 2010). Desde entonces, varios investigadores se dieron a la tarea de demostrar la factibilidad de tratar varios desórdenes genéticos empleando las 4 estrategias de corrección, previamente mencionadas, en combinación con las NsEG.

A pesar de que cada una de las NsEG puede ser empleada con cualquiera de las cuatro estrategias, se han preferido una sobre otra debido a la facilidad con la cual es posible estandarizar el método a seguir y obtener el mismo resultado. Para la interrupción de un gen se ha empleado cualquiera de las tres NsEG; para mover el marco de lectura se ha preferido ZFNs y TALENs; para

substitución de un gen e inserción de una secuencia exógena se ha preferido el uso de CRISPR/Cas y TALENs.

Estrategias de edición genómica más comunes por tipo de nucleasa

| Mecanismo | Nucleasa | Tipo Celular | Patología | Causante | Corrección |
|--------------|------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Disrupción | ZFN | CD34+ HSCs | SIDA | Infección VIH | Disrupción de CCR5 -/- |
| | CRISPR/Cas | CD4+ T | SIDA | Infección VIH | Disrupción de VIH LTR |
| | TALEN | PSCs | Hepatitis C | Infección VHC | Eliminación de mtDNA mutante |
| Frameshift | ZFN | Mioblasto | DMD | Distrofina exón 51-53; 51-60 | Frameshift (1+3n)pb en exon 50 |
| | TALEN | Mioblasto inmortalizado | DMD | Distrofina exón 48-50 | Frameshift (2+3n)pb en exon 51 |
| Knock-in | ZFN | Linfocitos B inmortalizados | SCID ligada al X | Truncación de IL2R γ en o después del exón 5 | Knock-in IL2R γ en cDNA (exón 5-8) |
| | ZFN | PSCs | Síndrome de Down | Trisomía 21 | Knock-in Xist para la inactivación de la trisomía 21 |
| Substitución | ZFN | PSCs | Enfermedad de Parkinson | α -sinucleína | Tyr53Ala (A>G) |
| | CRISPR/Cas | PSCs | Anemia falciforme | β -globina | Val6Glu (T>A) |
| | TALEN | PSCs | Epidermólisis bulbosa | COL7A1 | Stop ⁶¹³ Arg (T>G) |

Tabla 1.- Se muestran las cuatro estrategias de edición genómica: nucleasas mayoritariamente empleadas para ello, tipo celular y enfermedad en la cual se ha buscado cambiar la condición patológica. (Adaptado de Hotta A *et al*, 2014)

Actualmente las NSEG han vislumbrado campos diferentes al de las biociencias humanas, como en la agricultura y ganadería. El actual abasto de alimentos es inadecuado, y la situación empeorará mientras la población mundial siga creciendo al ritmo actual. La aplicación de NSEG en cosechas es fundamental para modificar los valores nutricionales y de resistencia de éstas

volviéndose más adecuadas a entornos de difícil crecimiento. En el caso del ganado se ha sugerido la modificación de los de tipo silvestre de la miostatina con variantes heterocigotas naturales encontradas en cerdos y vacas para aumentar la producción de carne magra en cada animal en un 7%. La ventaja de los organismos creados por NsEG es que emplean material genético propio de la especie o simplemente un cambio en el marco de lectura original y no un transgén derivado de algún otro organismo como es el caso de los organismos genéticamente modificados. Alrededor del mundo existen legislaciones que no permiten la comercialización de organismos genéticamente modificados debido a la creencia de que representan un riesgo en la salud del consumidor, ya que se argumenta que el ADN recombinante que posee el nuevo organismo al no ser suyo puede provocar efectos no previstos en un inicio. (Carroll D, Charo A.,2015).

1.3.1 Nucleasas-dedos-de Zinc (ZFNs)

Los ZFNs son proteínas artificiales compuestas por dos dominios. La actividad enzimática de la nucleasa proviene de una endonucleasa de restricción tipo IIS llamada FokI; mientras su especificidad es debida al dominio de unión al ADN por dedos de zinc (ZF). Este dominio consta de arreglos individuales de ZF, aproximadamente 30 aminoácidos organizados en una estructura $\beta\beta\alpha$ en presencia de un átomo de zinc, en la cual aminoácidos específicos en la hélice α (Cys_2-His_2) media la unión de 3-4pb del surco mayor del ADN. Un dominio de unión completo de ZFN consta de 3-6 módulos individuales de ZF, que en conjunto crean un sitio de reconocimiento de entre 9-18pb. Para poder realizar su actividad catalítica FokI trabaja como un dímero. Por esta razón es necesario diseñar a los ZFN en par para su sitio de reconocimiento, creando de esta manera una especificidad total de 18-36pb (Porteus MH., 2015 (2)).

Desde que comenzó su uso en 1996 se ha sacado ventaja de la posibilidad de diseñar cada dominio ZF de unión al ADN, con el objetivo de reconocer una gran variedad de diferentes secuencias. Actualmente el método más empleado es vía ensamblado molecular, el cual se basa en el diseño individual de cada módulo para que reconozca una secuencia de 3pb específicas y posteriormente se forma un tándem de entre 6 a 12 módulos. Existen otros dos métodos para el diseño de ZFNs; sin embargo son sumamente complicados y tardados de realizar. Cabe mencionar que los métodos que poseen dicha complejidad tuvieron que ser diseñados en respuesta a la protección intelectual del diseño de ZFNs vía ensamblado molecular pues son sólo dos compañías las que controlan el mercado actual. A pesar de la existencia de otros métodos para el diseño de

ZFNs, sólo los diseñados por ensamblado molecular tienen “permiso” para ser empleados en ensayos clínicos (Barbas III CF, et al., 2015; Porteus MH., 2015; Urnov FD, et al., 2010).

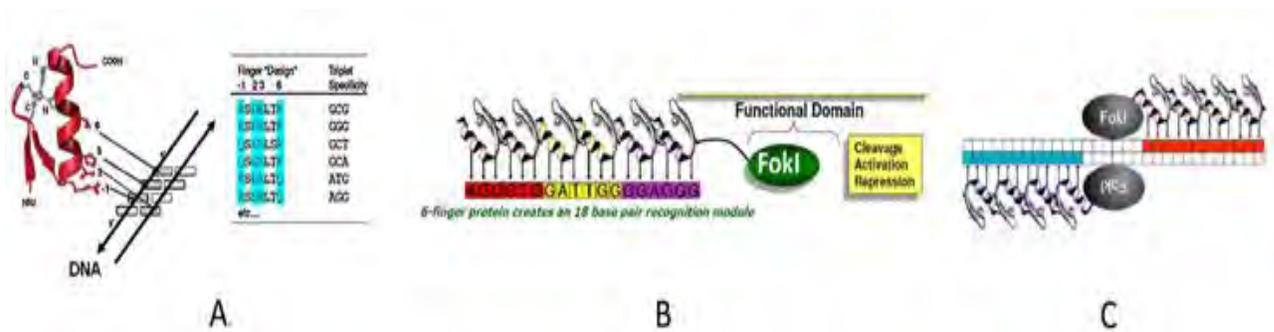


Figura 1.3.- Esquema representativo de Nucleasa-dedos-de-Zinc (ZFNs). a) Estructura 3D de un dedo-de-zinc mostrando los cuatro aminoácidos que selectivamente se unirán a tres bases adyacentes del ADN y una muestra de su código correspondiente. b) Estructura de una ZFN unido a FokI. c) La espontánea dimerización de dos ZFNs lleva a realizar una RDC en el sitio de reconocimiento. (Tomado de F. Quétier, 2016)

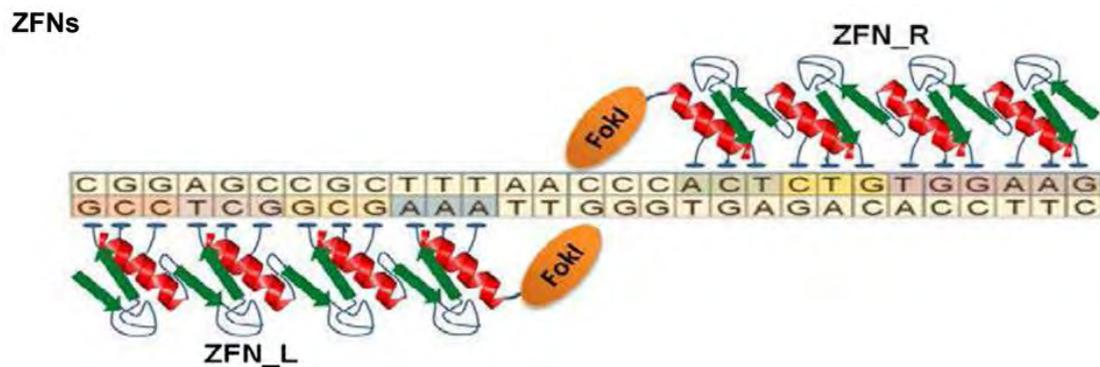


Figura 1.4.- Estructura de unión entre dímero de ZFN con su secuencia blanco en el ADN genómico. (Tomado de Chandrasegaran S, Carroll D., 2015)

1.3.2 TALENs

En el año 2009 se descubrieron proteínas de origen natural en bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas* llamadas *transcriptional-activator like-effectors* (TALEs). Estas ofrecen una manera más sencilla de realizar el reconocimiento modular del código genético a través del diseño de proteínas con unión al ADN. TALEs está conformado por repetidos altamente

conservados de entre 33-35 aminoácidos y cada unión es para una sola base nitrogenada con una especificidad dictada por dos residuos hipervariables. La estructura por cristalografía de la unión TALEs-ADN reveló que cada repetido forma una estructura de doble hélice conectadas por un *loop*, el cual posee el sitio de los residuos hipervariables dentro del surco principal mientras que la proteína se enrolla alrededor del ADN en una estructura super helicoidal.

ZFNs dejó el precedente del conocimiento y aplicaciones sobre la edición genómica, y a este prontamente se le unió TALEs al darse cuenta que el dominio de unión al ADN puede ser diseñado, lo que culminó con la creación de TALENs. Al igual que ZFNs, las nucleasas TALENs han demostrado inducir tanto el mecanismo de reparación UTNH y RH en cultivo celular empleando para ello la confiable nucleasa FokI. Las nucleasas TALENs pueden ser diseñadas para que tengan como objetivo cualquier secuencia deseada; mas es necesario cumplir con la condición de tener 5'T en el dominio N-terminal constante. Además de ello, al emplearse la nucleasa FokI se requiere generar dos monómeros TALENs de unión mínima a 13pb en dirección sentido y antisentido de la secuencia deseada (Gersbach CA, et al., 2016).

A pesar de ser una herramienta prometedora tiene como principal defecto su tamaño. Si comparamos con la predecesora ZFN, ésta es una proteína de 30 aminoácidos que se unen a 3pb; mientras la segunda son monómeros individuales asociados en tándem (lo que al final se le conoce como monómero TALEN) de 34 aminoácidos que solo pueden reconocer una sola base nitrogenada de la secuencia. Esto ha provocado múltiples problemas para ser empaquetadas dentro de los vectores empleados (adenovirus y lentivirus) lo que provoca problemas de rearrreglo molecular (Zhang F, et al., 2015).

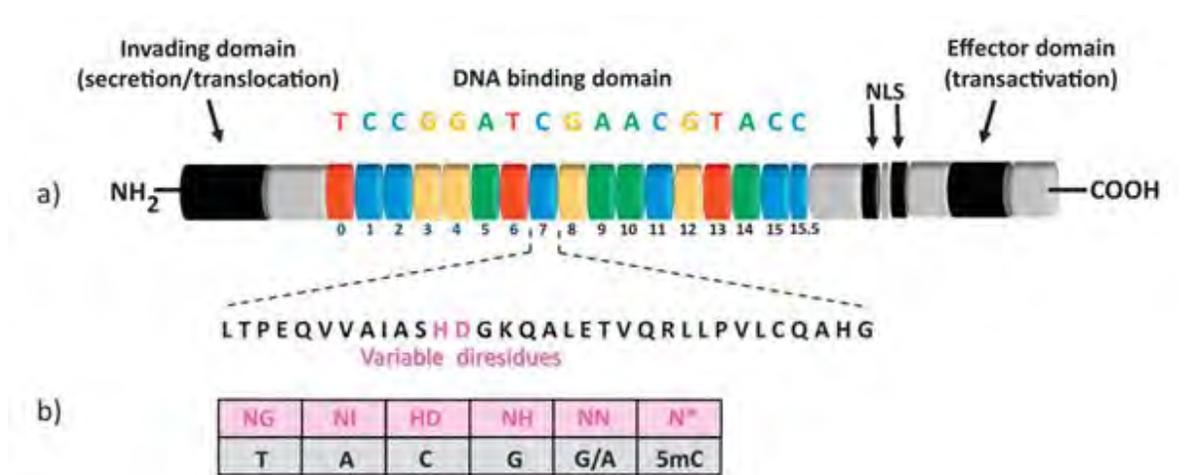


Figura 1.5.- Estructura típica de un TALE de *Xanthomonas* y su tabla correspondiente de reconocimiento. a) Los diferentes dominios de un TALE repetido 15.5. Los segmentos en negro son dominios funcionales empleados por bacterias patogénicas; NLS son señales de localización nuclear. El dominio de unión al ADN aquí mostrado es un arreglo de 15.5 unidades repetidas (el repetido n° 15.5 es la mitad N-terminal de la unidad). La secuencia de aminoácidos de uno de los repetidos se muestra agrandada para mostrar los residuos invariables en negro de los variables en violeta, los cuales de

1.3.3. Sistema CRISPR/Cas

De manera natural, las bacterias y arqueas han desarrollado mecanismos de defensa contra las infecciones virales, destacando entre ellos el versátil sistema CRISPR/Cas (CCas). El sistema CCas posee la capacidad de diferenciar y específicamente incorporar secuencias cortas de elementos génicos invasores, de bacteriófagos o plásmidos, en regiones propias del genoma que se caracterizan por ser repetidos cortos palindrómicos regularmente interespaciados agrupados en clúster (CRISPR; adaptado del término en inglés *clustered regularly interspaced palindromic repeats*). Estas mismas secuencias pueden ser transcritas y procesadas para formar ARNs pequeños no-codificantes (ARNpnc; adaptado del término en inglés *small noncoding-RNAs*) que funcionan como guías para los complejos proteicos multifuncionales (formados de distintas variedades de proteínas Cas (*CRISPR-associated* o asociadas a CRISPR) quienes reconocen y escinden el material genético exógeno invasor. La acción combinada de reconocimiento-incorporación y expresión-escisión le han ganado el nombre de sistema inmune adaptativo en bacterias y arqueas (Bhaya D, Davison M, et al., 2011).

El mecanismo por el cual el sistema CCas logra realizar el reconocimiento, inhibición y degradación del material genético invasor no ha podido ser del todo caracterizado, debido a que ciertos componentes actúan de manera diferente dependiendo la clase, tipo y subtipo de sistema CCas del que se trate, por lo que no se ha propuesto un mecanismo arquetipo basado en la evidencia disponible. La clasificación actual del sistema CCas está basado en las proteínas y genes *cas*, las cuales han sido dividido en dos clases, tres tipos y 16 subtipos, la cual refleja la relación evolutiva entre ellas (Rath D, Amlinger L, et al., 2015; Bhaya D, Davison M, et al., 2011).

Parte del imaginario colectivo concibe al sistema CCas como una novedad biotecnológica recientemente descubierta; sin embargo, en el año 1987 fue por primera vez descrito, pero no fue hasta el año 2005 que se le asignó una función biológica funcional como sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas. Actualmente, la investigación y aplicación del sistema CCas se ha centrado en la caracterización completa del mecanismo de acción, la virulencia de bacterias patogénicas relacionada a las proteínas Cas, pero más importante (y tema particular del presente trabajo) es el

uso como herramienta de edición genómica en organismos eucariontes superiores (Rath D, Amlinger L, et al., 2015; Yamamoto KR, et al., 2015).

1.3.3.1 Historia del sistema CRISPR/Cas

La herramienta de edición genómica CCas comenzó a emplearse como tal a partir del año 2012 en procariontes y a inicios del 2013 en células eucariontes superiores; sin embargo, el sistema CCas no es una herramienta de edición genómica *per se*, sino que fue adaptada a partir del sistema inmune de los organismos procariontes.

Las bacterias de vida libre tienen la cualidad de estar presentes en los ambientes más inhóspitos de la tierra y con ellas sus virus predatorios. Para poder sobrevivir, las bacterias desarrollaron mecanismos de defensa contra los virus como lo son la infección abortiva, casuística en la mutación de sus receptores, modificación por enzimas de restricción, y recientemente se ha descubierto el sistema CCas.

Este peculiar locus fue descrito por primera vez en 1987 en el genoma de *E.coli* por Ishino y colaboradores. En la publicación original lo que reportaron fue una serie de repetidos cortos de ADN de aproximadamente 20pb con secuencias espaciadoras entre ellos. En su momento no se le definió función alguna y estuvieron olvidadas hasta el año de 1993 cuando un equipo de investigación que trabajaba con el genoma de *E.coli* volvió a encontrar los repetidos cortos y secuencias espaciadoras. Entre los años 1993 al 2000 el equipo de investigación dirigido por Francisco Mojica comenzó a caracterizar el locus CRISPR, publicando lo que serían los primeros borradores de un locus CRISPR funcional (Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

A mediados del año 2002 todavía no se conocía la función biológica del locus CRISPR, y de hecho no tenía nombre asignado. En ese mismo año se realizó un modelado *in silico* de secuencias de *E.coli* tanto patógenas como no patógenas para buscar las mismas secuencias descritas por Mojica. Los resultados preliminares mostraron la presencia de dichas secuencias por lo que el análisis se amplió a las demás bacterias y archeas. Los resultados finales de Jansen y colaboradores demostraron que ambos procariontes poseían en promedio 2 a 4 juegos de secuencias de repetidos cortos separados por regiones de ADN con secuencias no funcionales; así mismo se encontró, que

invariablemente de la especie de la que se tratara, una secuencia muy cercana a los *loci* CRISPR que expresa una proteína con motivos característicos de helicasa y exonucleasa. En su trabajo acuñó el nombre CRISPR para la secuencia de repetidos y Cas a la proteína codificada por el gen del mismo nombre (Jansen, et al., 2002). Posterior a la publicación de Jansen y colaboradores, se pensaba que el locus CRISPR actuaba como un elemento móvil del ADN procarionte y el gen *cas* ejercía su función durante el metabolismo del ADN. La función de CRISPR se mantuvo sin resolver hasta el año 2005 cuando tres grupos de investigación reportaron que las secuencias espaciadoras encontradas en CRISPR eran homólogas a elementos génicos exógenos como genes virales y plásmidos, y así mismo, la proteína Cas se expresaba durante un evento de transducción o transformación mas no conocían la razón de ello (Bolotin A, et al., 2005; Mojica F, et al., 2005; Pourcel P, et al., 2005). Debido a la presencia de material genético exógeno incorporado con precisión en la secuencia espaciadora del locus CRISPR se especulaba que podría tratarse de un sistema inmune adaptativo de los procariontes (Barrangou R, Marraffini LA., 2014; Hsu PD, et al., 2014).

En el año 2007 se emplearon fagos líticos contra la bacteria *Streptococcus thermophilus*, encontrando que parte del material viral había sido incorporado *de novo* al locus CRISPR y al repetir el experimento con las colonias sobrevivientes se encontró una degradación del material viral añadido al cultivo, lo que apoyó la primicia de que CRISPR actúa a manera de sistema inmune adaptativo en bacterias (Barrangou PR, et al., 2007). La hipótesis que se manejaba en el año 2007 consistía en que la secuencia de CRISPR codificaba un ARN antisentido que se unía a una secuencia de ADN o ARN plasmídico o viral y el gen *cas* ayudaba para eliminar los restos de material exógeno no deseado. En el año 2008 se demostró que la secuencia CRISPR expresa un ARN inmaduro el cuál es procesado para formar un RNA maduro llamado crRNA (CRISPR-RNA) el cuál se une y funciona como guía para la proteína Cas, siendo este complejo el que interfiere con la proliferación viral (Brouns SJJ, et al., 2008). Tras esta publicación se pudo acuñar el término CRISPR/Cas debido a que fue posible determinar que un *locus* funcional está compuesto por un arreglo CRISPR de repetidos idénticos intercalados por el ADN exógeno espaciador que codifica los componentes del crRNA y un operón *cas* al cual se une un RNA guía para mover a la nucleasa expresada a su sitio de corte.

Como se demostró con los experimentos y publicaciones derivadas de ellos, el sistema CCas en sí mismo es parte del sistema inmune adaptativo de los procariontes, y es debido a que se basa en un RNA guía para dirigir a una nucleasa al sitio de corte que se comenzó a vislumbrar la posibilidad de emplearlo como herramienta de edición genómica.

1.3.3.2 Características generales del sistema CRISPR/Cas

El sistema de defensa CCas posee la característica de incorporar secuencias cortas de material genético invasor, conocidas como espaciadores, en posiciones específicas dentro del *locus* CRISPR. Estos espaciadores son transcritos y procesados para formar ARNpnc quienes en conjunto con complejos específicos de proteínas Cas pueden unirse al material genético exógeno so condición de que haya una concordancia completa o parcial (>80%aprox) con éste. El reconocimiento específico de la secuencia invasora termina con la destrucción de la misma. Valiéndose de su capacidad de integración de secuencias, el sistema CCas puede seleccionar e incorporar de manera aleatoria nuevas secuencias de invasiones *de novo*, así como modificar o eliminar secuencias ya existentes en el arreglo CRISPR. Esta capacidad es una respuesta dinámica ante los depredadores naturales de bacterias y arqueas que les permite un grado de sobrevivencia mayor. Además de su respuesta y adaptación dinámica, una de las características más importantes del sistema CCas es que puede ser heredado a las células hijas, ya sea como plásmido o ADN genómico (Hille F, Charpentier E., 2016; Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

Un *locus* CCas funcional posee dos componentes necesarios para su actividad. El primero de ellos es el arreglo CRISPR localizado en el genoma de la bacteria o arquea (ya sea en el cromosoma o plásmido), el cual contiene a los espaciadores hipervariables adquiridos de bacteriófagos o plásmidos. Y el segundo componente es el grupo de genes *cas* localizados en la vecindad del *locus* CRISPR, los cuales codifican proteínas requeridas durante las diferentes fases del mecanismo de defensa (Hille F, Charpentier E., 2016; Bhaya D, Davison M, et al., 2011).

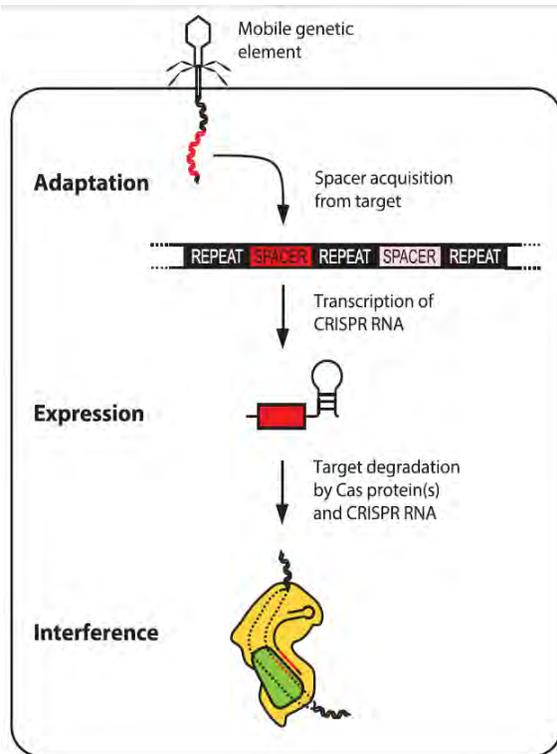
El mecanismo de defensa puede ser dividido en tres fases. La primer fase es referida como adaptación y es cuando el sistema CCas reconoce e integra a los nuevos espaciadores entre dos unidades de repetidos adyacentes en el arreglo CRISPR. Estos espaciadores parecen ser integrados principalmente en el extremo final de la secuencia líder en el *locus* CRISPR (Se entiende por secuencia líder el extremo 5' del crRNA precedente al primer repetido CRISPR, el cual contiene regiones ricas en A-T y un promotor), por lo que el posicionamiento de los espaciadores es un registro cronológico de las pasadas infecciones. Parte del reconocimiento del protoespaciador (Una secuencia protoespaciadora es la secuencia exógena invasora previo a su reconocimiento y procesamiento) es debido a la presencia de motivos cortos llamados motivos adyacentes protoespaciadores (PAM; adaptado del término en inglés *protospacer adjacent motif*), el cual es necesario para el reconocimiento y adquisición del nuevo espaciador. Durante esta primera fase se requiere mínimamente de dos nucleasas, Cas1 y Cas2, las cuales se

encuentran universalmente presentes en todos los genomas de bacterias y arqueas que posean un sistema CCas funcional (Hille F, Charpentier E., 2016; Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

Durante la segunda fase, que se llama expresión, un transcrito primario denominado *pre-CRISPR RNA* (pre-crRNA) es transcrito a partir del *locus* CRISPR por la ARN polimerasa. Posteriormente, endoribonucleasas específicas escinden el pre-crRNA en fragmentos más cortos llamados CRISPR RNAs [son los ARN_{pnc} mencionados en un inicio] (crRNA) que toman la función de guías moleculares. La fase de interferencia es el tercer y último paso, en donde el crRNA se encuentra dentro ya sea de un complejo multiprotéico o de una sola proteína efectora, y puede reconocer por medio de la complementariedad entre las bases la secuencia blanco en el ADN o RNA invasor. Para lo anterior debe existir una complementariedad total o parcial entre ambas, y tras esta unión, se da inicio al proceso de corte inhabilitando de esta manera la replicación o expresión del material genético invasor. A pesar que la complementariedad entre el crRNA y su blanco puede ser completa o parcial, el reconocimiento de la secuencia PAM debe ser completa y de no ser así la escisión de la secuencia no se lleva a cabo (Hille F, Charpentier E., 2016; Marraffini LA., 2015; Kin T, Tsui M, Li H., 2015; Rath D, Amlinger L, et al., 2015).

Es importante hacer mención que a pesar de que el sistema CCas se ha dividido para su estudio en un mecanismo que consta de tres pasos, cada uno de ellos puede trabajar de manera independiente, tanto *mecanicamente* como temporal. La manera en lo que sucede lo anterior no ha sido descrita (Kin T, et al., 2015).

Figura 1.6.- Pasos clave para la inmunidad en bacterias mediada por CRISPR-Cas. 1) Adaptación: inserción de nuevos espaciadores al *loci* CRISPR. 2) Expresión: transcripción del *loci* CRISPR y procesamiento de ARNs. 3) Interferencia: detección y degradación de elementos genéticos exógenos vía crRNAs y Cas. (Tomado de Rath D, Amlinger L, et al., 2015)



1.3.3.3 Componentes del sistema CRISPR/Cas

Un *locus* CCas funcional consta de dos componentes principales: un arreglo de ADN de repetidos cortos intercalados por espaciadores (también llamado arreglo CRISPR), un set de genes *cas* adyacente y una secuencia líder entre ambos. El arreglo CRISPR se conforma por secuencias de repetidos cortos, principalmente, palindrómicos, semi-palindrómicos y en casos excepcionales, no-palindrómicos. La secuencia de cada unidad de repetidos es diferente para cada *locus* CRISPR conservado, aunque existe cierta parcialidad en la conservación de fragmentos de la secuencia de repetidos como el motivo GTTg/c en el extremo 5' y el motivo GAAAC en el extremo 3'. Esta secuencia de repetidos es específica para cada *locus* CCas y oscila una longitud de entre 23 a 55pb. Estos repetidos se encuentran interespaciados por distintas secuencias espaciadoras que igualan el material genético exógeno proveniente de plásmidos o bacteriófagos invasores, con una longitud promedio de 21 a 72pb. La complementariedad entre las regiones espaciadoras y los elementos genéticos invasores es la base por la cual el sistema CCas realiza el *targeting* de estos elementos. Hasta el momento se conoce que la secuencia líder posee una limitada conservación en cuanto a su tamaño (el tamaño mínimo registrado es de 47pb y el máximo es de poco más de 100pb), lo cual está relacionado a la especie de bacteria o arquea a la cual pertenezca. A pesar de su carácter poco conservado, la secuencia líder juega un papel importante en la biología de CCas al contener

promotores poco caracterizados pero específicos para la transcripción de CRISPR, y adaptación de nuevas secuencias; aunque a la fecha todavía es debatida su función debido a que la mayoría de los *loci* CRISPR son carentes de ella. Por otro lado, las proteínas Cas son las responsables de llevar a cabo todas las funciones catalíticas durante los tres pasos de los que consta el mecanismo de defensa mediado por el sistema CCas (Kin T, Tsui M, Li H., 2015; Jiang W, Marraffini LA., 2015).

Los genes *cas* expresan proteínas tanto catalíticas como no-catalíticas, ambas con funciones específicas durante el mecanismo de protección de CCas. Las proteínas Cas son muy diversas en estructura y función pues contienen dominios característicos de helicasas, nucleasas, polimerasas, y de unión a ADN/RNA, según sea el caso. A pesar de la diversidad presentada se han clasificado en diez superfamilias, Cas1 a Cas10. Parte del mecanismo del sistema CCas se basa en la unión del crRNA con proteínas Cas específicas; esta unión es conocida como complejo ribonucleoprotéico CRISPR (crRNP) el cual está dividido en dos grupos. El primer grupo son los crRNPs de vigilancia, los cuales no poseen función catalítica para escindir al material invasor pero su unión recluta complejos adicionales llamados crRNPs efectores, quienes poseen actividad catalítica y conforman al segundo grupo de crRNPs. Como se verá más adelante, las proteínas Cas son muy diversas y pueden ejercer su función de manera combinada o en solitario, lo que ha sentado la base para su clasificación actual (Kin T, Tsui M, Li H., 2015; Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

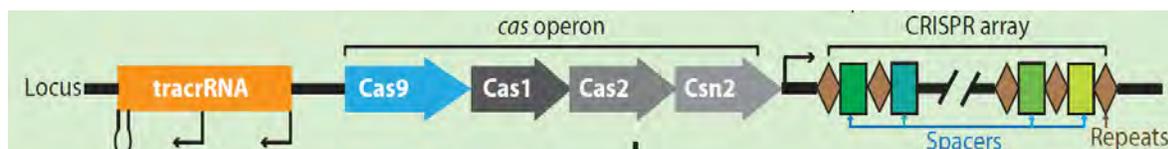


Figura 1.7.- Locus funcional de una sistema CRISPR-Cas tipo II mostrando sus componentes tales como: operón *cas* y arreglo CRISPR con secuencias espaciadoras y repetidos. (Adaptado de Jiang F, Doudna J., 2017)

1.3.3.4 Clasificación del sistema CRISPR/Cas

El sistema CCas es muy diverso y esto ha dificultado su clasificación. Generalmente, los sistemas CCas y sus elementos son hipervariables y difieren ampliamente en términos de ocurrencia, genes *cas*, secuencias, cantidad y tamaño en el genoma. De hecho, los repetidos de CRISPR varían entre los 23-55pb, aunque típicamente comprenden entre los 28-37pb, y su naturaleza palindrómica o parcialmente palindrómica le permite formar estructuras de horquilla en su misma secuencia. Por otro lado, los espaciadores de CRISPR varían en tamaño, entre los 21-72pb,

mas es común encontrarlos entre los 32-38pb. Estas secuencias espaciadoras son muy diferentes entre familias y especies de procariontes, ejemplo de ello es *Haliangium ochraceum* quien posee 588 secuencias espaciadoras diferentes, cuando la media es de 50. Otro ejemplo notable de la variabilidad de CRISPR entre especies es *Methanocaldococcus spp* que tiene 19 *loci* distintos de CRISPR y *Methanotorris spp* que tiene 25, cuando el promedio es de uno a dos *loci* CRISPR. De acuerdo a la base de datos CRISPRdb, los loci CRISPR ocurren de manera natural, es decir, se encuentran de manera común entre las diferentes especies de procariontes. En los repositorios de genomas procariontes se ha encontrado que aproximadamente el 45% y el 83% de las bacterias y archaeas secuenciadas, respectivamente, contienen por lo menos un *loci* CRISPR. De hecho se llegó a proponer el emplear los repetidos en los *locus* CRISPR para hacer la clasificación de los mismos; sin embargo, debido a su inconsistencia y gran variabilidad es que no se concretó el sistema (Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

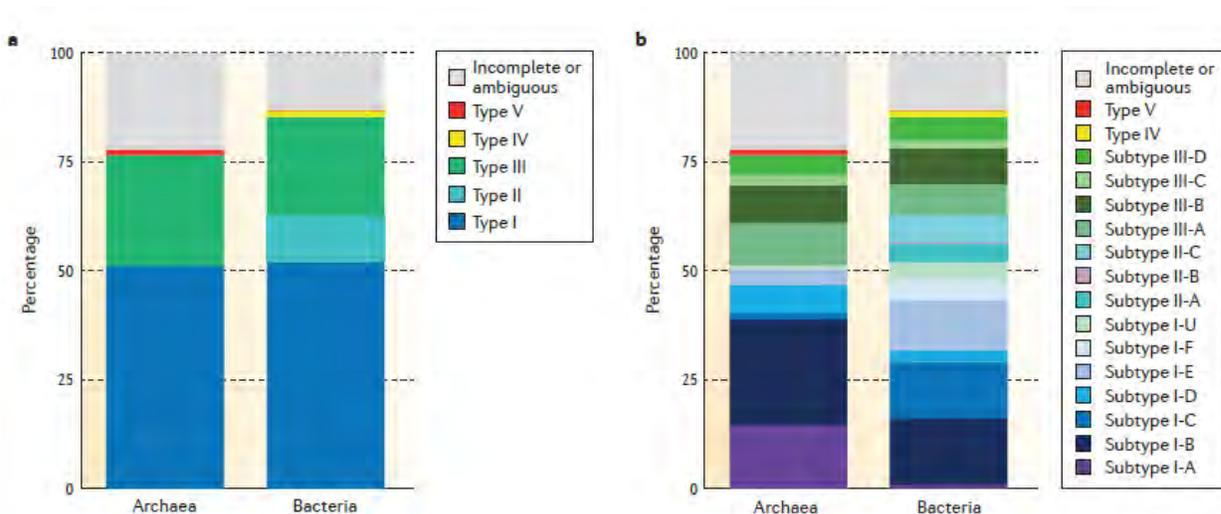


Figura 1.8.- Distribución de los sistemas CRISPR-Cas tanto en arqueas como bacterias. En “a” se muestra únicamente el sistema-tipo, mientras en “b” se aprecian los sistemas-subtipos presentes en la mayoría de los eucariontes. (Tomado de Makarova KS, et al., 2015)

La primera clasificación del sistema CCas empleada fue propuesta en el año 2005 por Haft y colaboradores. Ésta tomó como referencia los cuatro operones *cas* descritos por Jansen y colaboradores en el 2002 y se agregaron dos operones más. Estos operones *cas* eran constantes en

los ocho genomas de referencia empleados ya que solo contenían un *locus* CCas (Se emplearon los genomas de las bacterias: *Escherichia coli*, *Yersenia pestis*, *Neisseria meningitidis*, *Desulfovrio vulgaris*, *Thermotoga neapolitana*, *Haloarcula marismourti*, y dos cepas de *Mycobaterium tuberculosis*). Así el núcleo central de operones *cas* eran *cas1*, *cas2*, *cas3*, *cas4*, *cas5*, y *cas6*. Este núcleo fue comparado en su posición y cantidad relativa en el genoma de 40 bacterias y archeas genotipificadas, encontrando que varias de las secuencias *cas* se encontraban compartidas entre las bacterias y archeas analizadas. Por lo anterior se consideró una nomenclatura parecida a la empleada en las nucleasas de restricción; por ejemplo, las encontradas en *E.coli* fueron llamadas CRISPR-*system of E.coli gene number* con las siglas *cse1*, *cse2*, *cse3*, *cse4* y *cse5e*. A pesar de ser una aproximación simple no tomaba en cuenta la presencia de ortólogos o relaciones evolutivas de las proteínas *cas*, por lo que llegaban a tener hasta cinco nombres diferentes cada una a pesar de ser la misma. Lo que complicó todavía más la aceptación de esta clasificación es que los sistemas CRISPR/Cas pueden co-existir y estar contenidos tanto en el cromosoma bacteriano como en los plásmidos siendo completamente diferentes entre sí, incluso tratándose de cepas de la misma especie (Haft DH, et al., 2005; Makarova KS, et al., 2011).

Siguiendo la idea propuesta por Haft y colaboradores se continuó el análisis de los genes y proteínas *cas*, encontrando que invariablemente de la familia, especie, o cepa procarionte los genes *cas1* y *cas2* son virtualmente universales debido al papel central que juegan en el mecanismo de defensa; esto apoyó la idea de que una adecuada clasificación de los sistemas CCas idealmente debe representar la relación evolutiva entre los diferentes *loci*. Al continuar la línea de esta investigación basada en la relación filogenética de las proteínas y genes *cas* se estableció que éstos forman un grupo muy diverso y pueden ejecutar su función de manera cooperativa o en solitario; así mismo, los resultados de los análisis de estructura-función indican que de manera característica las proteínas Cas poseen dominios de helicasa, nucleasa, o de unión al ADN/ARN. Parte de los resultados encontrados en los análisis filogenéticos es que existe un intercambio profundo y divergente en la función y posición de los genes *cas* entre diferentes *loci*. Lo anterior ha develado que existe una relación evolutiva muy compleja que no permite una clasificación sencilla en grupos individuales de genes *cas* (Makarova KS, Haft DH, et al., 2011).

La actual clasificación de los diferentes sistemas CCas combina tanto la relación evolutiva como la función combinada o individual de los diferentes *loci cas*; y para ello parte de un análisis en dos pasos, en el cual el primero consta en identificar todos los genes *cas* en cada *locus* para posteriormente en el paso dos identificar los genes particulares, signatura, y la arquitectura

distintiva que permite asignar a cada *locus* en una clase, tipo y subtipo. De esta manera es posible clasificar a los diferentes sistemas en base a los módulos efectores empleados, ya sean complejos multiméricos o monoméricos. Así, existen dos grandes grupos de sistemas CCas, siendo los Clase 1 quien posee complejos multiméricos efectores sobre crRNA, mientras en los Clase 2 todas las funciones efectoras son llevadas a cabo por una sola proteína Cas9 (Koonin E, Makarova KS, et al., 2017).

Los sistemas CCas Clase 1 están definidos por la presencia de complejos multiméricos efectores sobre crRNA, siendo el principal de ellos el complejo Cascade y sus variantes (CRISPR-*associated complex for antiviral defence (Cascade)* y sus variantes Csm, y Cmr. Esta clase incluye a los sistemas CRISPR/Cas tipo I, tipo III y un sistema putativo tipo IV que se encuentra todavía bajo investigación por lo que no formará parte del presente trabajo. El tipo I está definido por la presencia del gen signatura *cas3* o su variante *cas3'* que expresa una proteína Cas3 con dominios tanto helicasa y ADNsa -nucleasa-, localizados en posición amino terminal, responsables de degradar el blanco. Este dominio en particular posee el nombre de HD, el cual es un dominio de nucleasa con residuos de histidina y aspartato en un arreglo H-HD-D o HD-H-D. Actualmente se conocen seis diferentes subtipos del sistema tipo I, identificados como I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F, los cuales son variables en su número y arquitectura de genes *cas*. Se ha postulado que todos los subtipos clasificados como tipo I poseen como ancestría común un clúster de genes *cas* formado por *cas1*, *cas2*, *cas3*, *cas4*, *cas5*, *cas6*, *cas7*, y *cas8*; sin embargo, el producto final de la arquitectura no posee ese orden ya que esto es dependiente del subtipo que se trate. Ejemplo de ello es que todos comparten la presencia de *cas1*, *cas2* y *cas3*, mas dependiendo del subtipo el gen *cas3* puede encontrarse como *cas3* o *cas3'* por separado, fusionado consigo o con *cas2*. Otra diferencia de la arquitectura es el operón efector Cascade que se encuentra codificado de manera común por *cas5*, *cas7* y *cas8*, máxime sucede lo mismo que en el ejemplo anterior ya que dependiendo del subtipo la organización de los genes *cas* cambia e incluso existen híbridos de dos genes *cas* y variantes de los mismos que al final realizan la misma función (Makarova KS, et al., 2015; Makarova KS, et al., 2011).

Es importante denotar que los primeros estudios filogenéticos del gen *cas3* y sus variantes *cas3'* y *cas3''* (ésta última solo está presente en el subtipo I-D) lograron establecer que *cas3* refleja un grado de coherencia evolutiva; empero, recientemente se ha continuado un análisis a mayor profundidad de éste gen y proteína revelando que *cas3* presente en los subtipos I-A, I-B y I-C son

polifiléticos, es decir, que no descienden de un ancestro en común. La hipótesis más aceptada para el fenómeno visto con *cas3* ha sido una transferencia horizontal de los genes y tras ello una rápida variación evolutiva que conservó la misma función (Makarova KS, et al., 2011).

El sistema CCas tipo III posee como gen signatura a *cas10*, el cual codifica una proteína multidominio que contiene en particular el dominio Palm (el cual es una variante de un motivo de reconocimiento al ARN (*RNA recognition motif (RRM)*)) el cual es homólogo al dominio central de numerosas polimerasas y ciclasas de ácidos nucleicos y además es la subunidad efectora más grande del tipo III. Todos los *loci* del tipo III codifican una pequeña subunidad proteica Cas5 y de típicamente varios parálogos de la proteína Cas7, las cuales están relacionadas al módulo efector de crRNA. El sistema tipo III se ha clasificado en dos subtipos, el tipo III-A y el III-B, los cuales pueden ser distinguidos por la presencia y ausencia de genes específicos y así mismo, ambos subtipos han demostrado capacidad de unión co-transcripcional a nivel de ARN o ADN. El *locus* subtipo III-A contiene a los genes *cas1*, *cas2* y *cas6*, así como los genes efectores *csm2*, *csm3*, *csm4*, y *csm5*; mientras que el *locus* tipo III-B posee como genes efectores a *cmr1*, *cmr2*, *cmr3*, *cmr4*, *cmr5* y carecen de los genes *cas* del subtipo III-A, por lo que el subtipo III-B depende de otros sistemas CCas disponibles en la célula. Lo anterior apoya fuertemente la hipótesis que existe cierta modularidad cooperativa entre sistemas CCas en una misma célula, mas el mecanismo preciso del como esto sucede es desconocido. Es importante denotar que tanto los genes *csm* y *cmr* codifican subunidades de los complejos efectores Csm y Cmr en los subtipos III-A y III-B, respectivamente, que suplen al complejo efector Cascade presente en el subtipo I. Así mismo, tanto los genes *csm* y *cmr* poseen funciones análogas a genes *cas* propios del complejo Cascade (Makarova KS, et al., 2015).

En fechas recientes se ha vislumbrado que la composición y organización del sistema tipo-III es más diversa que la tipo-I, si bien esta última posee más subtipos, los subtipos encontrados en el sistema tipo-III son más polimórficos. Esta diversidad es debida a duplicaciones y deleciones, fusiones e inserciones de dominios poco caracterizados que podrían estar relacionados en el complejo efector crRNA. Se conocen por lo menos dos variantes del sistema tipo-III, una de ellas pertenece al subtipo III-A y la otra al subtipo III-B; sin embargo, poseen un nombre no derivado del subtipo original y adopta otro nuevo. El subtipo III-C (propio de III-B) posee como característica la aparente inactivación de un dominio tipo ciclasa en la proteína Cas10, así como una extrema divergencia en la secuencia de la proteína. El subtipo III-D (propio de III-A) posee una proteína Cas10 carente del dominio HD. Por otro lado, el subtipo III también posee un gen parecido a *cas5* llamado

csx10 la cual se ha visto que suple sin problemas la función de *cas5* en cualquiera de los subtipos del tipo III (Makarova KS, et al., 2015; Koonin E, Makarova KS, et al., 2017).

El sistema CCas Clase 2 está definido por la presencia de una sola proteína efectora multidominio que asiste en el mecanismo de adaptación de CCas, participa en el procesamiento del crRNA y corta al ADN blanco asistido por crRNA y un ARN guía llamado tracrRNA (*trans-activating* - CRISPR RNA). El tipo II es el sistema representativo de la Clase 2, el cual difiere grandemente de los tipos y subtipos I y II al ser más sencillo en cuanto al número de genes *cas* involucrados. El gen signatura para el sistema tipo II es *cas9* el cuál conjunta las funciones previamente mencionadas. Todos los *loci* CCas de tipo II identificados comparten los genes *cas1*, *cas2* y *cas9*, y la mayoría de ellos también codifican para un tracrRNA, el cual es parcialmente complementario a los repetidos respecto a un arreglo CRISPR (Makarova KS, et al., 2015; Jiang W, Marraffini LA., 2015).

Como se mencionó previamente, una de las metas de la clasificación del sistema CCas es lograr que represente coherencia evolutiva; empero, la proteína y gen *cas9* parecieran haber evolucionado a partir de genes de elementos transponibles que no estaban asociados en un inicio a un *locus* CRISPR. Cabe mencionar que existe cierta similitud entre Cas9 y sus homólogos no relacionados al sistema CCas, por lo que Cas9 por si misma no puede ser empleada como la única signatura para la identificación de los sistemas tipo II. No obstante, la presencia del gen *cas9* en la vecindad de *cas1* y *cas2* es distintivo del sistema tipo II.

El sistema CCas tipo II está clasificado en tres subtipos, II-A, II-B y II-C. El subtipo II-A incluye los genes previamente mencionados y añade a *csn2*, al que se le considera el gen signatura para éste subtipo. Existen variantes cortas y largas de *Csn2*, mas sin importar la variante forman un clúster sobrepuesto a Cas9 para apoyar en la unión al ADN de doble cadena. El subtipo II-B carece de *csn2* pero en vez de ella posee a *cas4*, la cual es propia de los sistemas tipo I. Lo anterior es debido a que el subtipo II-B tuvo su posible origen recombinante a partir de sistemas homólogos de tipo I. Por otro lado, el subtipo II-C solo posee tres genes (*cas1*, *cas2* y *cas9*) volviéndolo el más sencillo de todos los tipos de CCas y el elegido para edición genómica (Koonin E, et al., 2017; Makarova KS, et al., 2015).

Dentro de la clasificación de la Clase 2 podemos encontrar al sistema putativo tipo V el cual no corresponde directamente al sistema CCas, pero comparte ciertas características que lo ubican dentro de la clase mencionada. Recientemente se detectó la presencia del gen *cpf1* (previamente

llamado TIGRFAM) adyacente a los genes *cas1*, *cas2* y arreglos de CRISPR en el genoma de varias bacterias y una archa. *cpf1* expresa una proteína con una región homóloga al dominio de nucleasa tipo RuvC de Cas9, así como regiones ricas en arginina propias tanto de Cas9 como de la proteína dedos de zinc TnpB. No se ha podido establecer con precisión el papel que juega este gen en un sistema CCas, debido a que Cpf1 es expresada en múltiples contextos celulares no relacionados al mecanismo de defensa con CCas; sin embargo se ha determinado que cuando se expresa en un contexto de defensa ejerce su acción a manera de una sola unidad de proteína efectora como sucede con Cas9. (Barrangou R, Marraffini LA., 2014; Hsu PD, et al., 2014).

1.3.3.3 Proteínas Cas y funciones mecánicas

Las proteínas Cas pueden ser divididas en cuatro diferentes funciones mecánicas: adaptación (adquisición de nuevas secuencias espaciadoras), expresión (procesamiento de crRNA y unión al blanco), interferencia (escisión del blanco), y auxiliar (regulación y otras funciones asociadas a CRISPR). En años recientes se ha acumulado mayor y mejor información concerniente a la estructura y función de las proteínas Cas centrales (Cas1-Cas10) (Barrangou R, Marraffini LA., 2014).

El módulo de adaptación es ampliamente uniforme entre los diversos sistemas y subsistemas de CCas y consiste en las proteínas Cas1 y Cas2, con la posible participación de la superfamilia de enzimas de restricción Cas4 y, en el sistema tipo II Cas9. Cas1, quien adopta una sola conformación en α -hélice, es una integrasa que media la inserción de nuevas secuencias espaciadoras en un arreglo CRISPR mediante la escisión de sitios específicos dentro de los repetidos. El papel que juega Cas2 es poco comprendido, ya que ésta posee sitios catalíticos de RNasa y ADNsa que son dispensables durante el proceso de adaptación, por lo que se ha catalogado como una subunidad del complejo de adaptación que apoya a Cas1 (Makarova KS, et al., 2015).

El módulo de expresión e interferencia son representadas por el complejo multimérico efector sobre crRNA-ec (*multiprotein CRISPR RNA (crRNA)-effector complex*) o en los sistemas tipo II por Cas9. En la fase de expresión, pre-crRNA está unido a crRNA-ec, o a Cas9, y es procesado a un crRNA maduro en un paso catalizado por una RNA-endonucleasa (típicamente Cas6) en los sistemas tipo I y III o un mecanismo alternativo que involucra a RNasa III y un tracrRNA en los sistemas tipo II (Makarova KS, et al., 2015; Jiang F, Doudna JA., 2017).

Tabla 2.- Principales proteínas Cas y sus funciones. (Adaptado de Bhaya D, 2011)

| Proteína | Distribución | Proceso | Función |
|--------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cas1 | Universal | Adquisición del espaciador | ADNsa, no específica, unión a RNA; presente en todos los tipos. |
| Cas2 | Universal | Adquisición del espaciador | RNAasa pequeña de regiones ricas en U; presente en todos los tipos. |
| Cas3 | Signatura para tipo I | Interferencia | Helicasa de ADN, fusión a HD. |
| Cas4 | Tipo I, II | Adquisición del espaciador | Nucleasa semejante a RecB con actividad de exonucleasa. |
| Cas5 | Tipo I | Expresión de crRNA | Proteína RAMP, endoribonucleasa involucrada en la biogénesis de crRNA; parte de Cascade. |
| Cas6 | Tipo I, III | Expresión de crRNA | Proteína RAMP, endoribonucleasa involucrada en la biogénesis de crRNA; parte de Cascade. |
| Cas7 | Tipo I | Expresión de crRNA | Proteína RAMP, endoribonucleasa involucrada en la biogénesis de crRNA; parte de Cascade. |
| Cas8 | Tipo I | Expresión de crRNA | Proteína grande con dominio de nucleasa HNH y semejante a RuvC, parte de Cascade. |
| Cas9 | Signatura tipo II | Interferencia | Proteína multidominio grande con nucleasa HNH y semejante a RuvC. |
| Cas10 | Signatura tipo III | Expresión de crRNA e interferencia | Dominio de nucleasa HD, dominio de palma, bucle Zn, cierta homología a Cascade. |

En el módulo de interferencia, crRNA-ec o Cas9 combinan la actividad de nucleasa con dominios dedicados a la unión con RNA. La unión al blanco se basa en la unión por complementariedad de bases entre la región espaciadora del crRNA y la molécula a degradar; por otro lado, la escisión del blanco es llevada a cabo por la familia de nucleasas HD (Cas3'' o un dominio particular en Cas3) en los sistemas tipo I, por la acción combinada de las proteínas Cas7 y Cas10 en los sistemas tipo III, o por la proteína Cas9 en el sistema tipo II. En los sistemas tipo I, el dominio de nucleasa HD se encuentra ya sea fusionado a la super-familia 2 de helicasa *Cas3'* o se encuentra codificada por el gen *cas3''*, mientras que el sistema tipo III un dominio de nucleasa HD distinto está fusionado a Cas10 y se ha propuesto que durante la fase de interferencia ésta puede escindir al ADN monocatenario. En los sistemas tipo II, la proteína multidominio Cas9 es capaz de llevar a cabo las tres fases funcionales de la inmunidad mediada por CCas (adaptación, expresión e interferencia) debido a la presencia de dos dominios clave en ella. La combinación de los dominios de nucleasa semejante a RuvC (*RuvC-like nuclease domain*) y el dominio de nucleasa HNM permite la escisión del ADN blanco (Jiang F, Doudna JA., 2017; Wang H, et al., 2016).

El módulo auxiliar es una combinación de varias proteínas y dominios que se encuentran fuera del *locus* CCas, por lo que sus funciones no se encuentran del todo caracterizadas y son poco comunes; sin embargo, es sabido que presentan funciones putativas, de protección o incluso participar en eventos de apoptosis. En los sistemas tipo I y III se cuenta con sets de proteínas que poseen un dominio con pliegue Rossmann asociado a CRISPR (CARF; adaptado del término en inglés *CRISPR-associated Rossmann fold domain*) que regulan alostéricamente la tasa de actividad del sistema CRISPR/Cas; otro ejemplo notable es la proteína Csn2 que parece participar en la prevención del daño al ADN cromosómico durante el evento de integración (Makarova KS, et al., 2011).

1.3.3.4 Complejos efectores en los sistemas CRISPR/Cas

Todos los sistemas CCas constan de dos principales módulos formados de *sets* de genes que codifican proteínas involucradas en el proceso de adaptación (esto es la adquisición de nuevas secuencias espaciadoras) y función efectora, la cual consiste en el procesamiento del pre-crRNA, reconocimiento del blanco y escisión del mismo. El módulo de adaptación es ampliamente uniforme entre los diversos sistemas CCas y consisten en la endonucleasa Cas1 y su subunidad estructural Cas2. Esta uniformidad contrasta con la variabilidad encontrada en los módulos efectores ya que éstos son dependientes de las subunidades o unidades que conforman a cada tipo y subtipo del sistema CCas (Koonin E, et al., 2017).

En los sistemas CCas tipo I y III el complejo multimérico efector sobre crRNA-ec median las fases de procesamiento e interferencia del sistema de defensa por CCas. En el sistema tipo I este complejo es conocido como Cascade, mientras en los tipos III-A y III-B estos complejos son conocidos como Csm y Cmr respectivamente. Una característica estructural común (bucle rico en glicina) encontrada entre las proteínas Cas del crRNA-ec es el motivo de reconocimiento *RRM*, un dominio de unión a ácidos nucleicos que es el pliegue central de la extremadamente diversa superfamilia de proteínas RAMP. (Durante la primera comparación sistemática de secuencias de las proteínas Cas se identificó una extensa superfamilia de diversas proteínas que mostraban una limitada similitud entre ellas, centrándose en un bucle rico en glicina. Estas proteínas fueron llamadas RAMPs (Repair-Associated Mysterious Proteins) dado que se suponía en un inicio que las proteínas Cas formaban parte de un sistema de reparación del ADN no descrito. Subsecuentemente, cuando se aclaró la relación entre los repetidos CRISPR y las proteínas Cas, esta superfamilia fue renombrada como *Repeat-Associated Mysterious Proteins* sobreviviendo el acrónimo RAMP. La comparación de múltiples estructuras cristalizadas de RAMPs llevó a denotar que todas ellas poseen formas distintas del dominio RRM. Actualmente las RAMPs poseen el nombre de familia Cas5, familia Cas6 y familia Cas7). Las RAMPs Cas5 y Cas7 comprenden el esqueleto de crRNA-ec. En los sistemas tipo I, Cas6 es típicamente la endonucleasa activa que es responsable del procesamiento de crRNA, mientras que Cas5 y Cas7 son las proteínas no catalíticas responsables de la unión al RNA; empero, recordando la gran variabilidad y posible recombinación modular presentada por las proteínas Cas, en el subtipo I-C al procesamiento de crRNA es catalizado por Cas5. En los sistemas tipo III, la enzima responsable para el procesamiento de crRNA no ha sido identificada, mas es supuesto que Cas6 es la responsable; sin embargo, Cas6 no es subunidad de los complejos efectores en este sistema, y en algunos casos ésta es provista de manera *trans* por otros *loci* CRISPR-Cas. Por otro lado Cas7 está involucrada en la degradación co-transcripcional del RNA durante la fase de interferencia (Makarova KS, et al., 2015; Kin T, et al., 2015). En adición a Cas5, Cas6, y Cas7, los crRNA-ec típicamente contienen dos proteínas designadas de acuerdo a su tamaño, subunidad mayor y subunidad menor. La subunidad mayor está presente en todos los tipos I y III conocidos de crRNA-ec, mientras la subunidad menor está ausente en ciertos *loci* de tipo I, por lo que la subunidad mayor sustituye funcionalmente a ésta por medio de un dominio carboxilo terminal que provee de estabilidad estructural. En los sistemas tipo III, la subunidad mayor es una enzima putativa relacionada a las ciclasas codificada por *cas10*, mientras en los sistemas tipo I la subunidad mayor es codificada por diversos genes *cas8* que adoptan una estructura en complejo que no demuestra similitud con otras

proteínas. Cas10 contiene dos dominios Palm semejantes a ciclasas, que son una forma de dominios RRM, y la conservación de residuos de aminoácidos catalíticos implica que uno de estos dominios está activo mientras el otro no; el sitio catalítico del dominio activo es requerido para la escisión del ADN de doble cadena durante la fase de interferencia, pero esta actividad todavía carece de caracterización a detalle. Se ha especulado que Cas8 es homóloga a Cas10, y la similitud entre la organización estructural de crRNA-ec entre los sistemas tipo I y tipo II apoyan esta hipótesis, mas análisis estructurales y de secuencia demuestran lo contrario. Se ha demostrado que ciertas Cas8 del subtipo I-B poseen actividad específica de nucleasa para el ADN monocatenario, la cual es requerida para la fase de interferencia. Esta actividad no se ha podido determinar si es característica determinante y universal de la subunidad mayor (Kin T, et al., 2015).

Las proteínas de la subunidad menor son codificadas por los genes *csm2* (subtipos III-A y III-D), *cmr5* (subtipos III-B y III-C), *cse2* (subtipo I-E), o *csa5* (subtipo I-A). Estas son proteínas α -hélice que no poseen homólogos, aunque comparaciones estructurales entre todas ellas han planteado la posibilidad de que las proteínas en las subunidades menores en los sistemas tipo I y III sean homólogas entre ellas. A pesar de las diferencias en detalles estructurales la forma y arquitectura entre los complejos Cascade, Cmr y Csm son sorprendentemente similares. Esto sugiere que un complejo efector ancestral evolucionó previo a la divergencia de los sistemas tipo I y II. A la fecha se desconoce alguna función catalítica de las subunidades menores en los complejos crRNA-ec, mas los análisis por cristalografía han demostrado que las α -hélices presentes en ellas ayudan a formar una especie de andamiaje o apoyo estructural para el complejo (Hille F, Charpentier E, 2016; Kin T, et al., 2015).

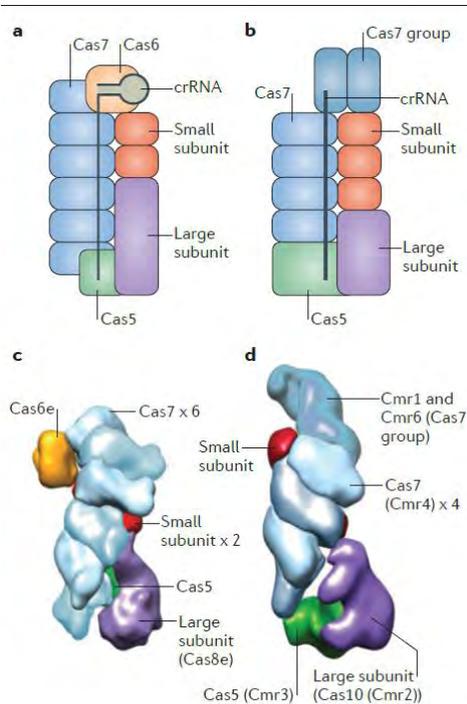


Figura 1.10.- Estructura de un complejo multiprotéico del sistema CRISPR-Cas. Complejo multimérico *Cascade* para el sistema tipo I se muestra en “a”. Los complejos multiméricos para los sistemas tipo III-A y III-B conocidos como Csm y Cmr se muestran en “b”. Variantes para los complejos anteriores se muestran en “c” y “d”. (Tomado de Makarova KS, et al., 2015)

1.3.3.5 Mecanismo de CRISPR/Cas

Como ya se ha mencionado, un arreglo CRISPR consta de secuencias cortas repetidas separadas por espaciadores con secuencias únicas. Estos espaciadores tuvieron su origen en el material genético de un virus o un plásmido el cual pasó por un proceso para ser introducido en el arreglo CRISPR y ser reconocido por las proteínas efectoras Cas en una invasión posterior. Dado que el genoma de la bacteria o arquea es modificado en el proceso de adquisición e integración de nuevas secuencias invasoras, éstas mismas son heredadas a la progenie de la bacteria o arquea ya sea en el cromosoma bacteriano o plásmidos. La adición de estas nuevas secuencias espaciadoras se hace a un costado del arreglo CRISPR, haciendo que este sea una suerte de registro cronológico de las invasiones pasadas tanto suyas como de la célula progenitora.

El mecanismo de defensa mediado por CCas puede ser dividido en tres fases, procesos o pasos. El primero de ellos, adaptación, lleva a la inserción de nuevos espaciadores en el *locus* CRISPR. En la segunda fase, expresión, el sistema se prepara para la expresión de los genes *cas* y la transcripción del arreglo CRISPR en un largo pre-crRNA. Subsecuentemente, el pre-crRNA es *madurado* en un crRNA mediante las proteínas Cas y factores accesorios. En el tercer y último paso, interferencia, el ácido nucleico blanco es reconocido y destruido por la acción combinada del crRNA y proteínas Cas. Sin excepción, todos los tipos de sistemas CCas llevan a cabo las tres fases, con

cambios principalmente dependientes en los módulos efectores de cada sistema (Koonin E, et al., 2017).

La fase de adaptación provee de una memoria genética, la cual es un prerequisite indispensable para las subsecuentes fases de expresión e interferencia que neutralizan a los ácidos nucleicos invasores. La inserción de nuevos espaciadores ha sido experimentalmente demostrada en diversos subtipos de CCas y en diversas bacterias y arqueas. Hay dos formas de adquirir una nueva secuencia espaciadora; *naive*, cuando la secuencia invasora no ha sido previamente procesada, y *primed*, cuando existe una secuencia previa en el arreglo CRISPR (Rath D, et al, 2015).

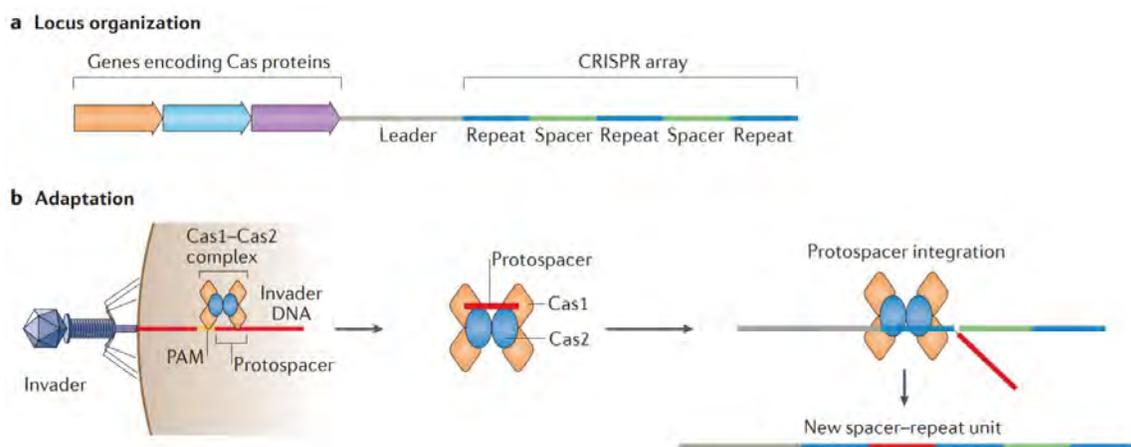


Figura 1.11.- En la imagen superior (a) se observa una organización típica de un arreglo CRISPR con sus componentes y las proteínas Cas. En (b) se aprecia de manera resumida el mecanismo de adaptación mediante CRISPR/Cas. Nótese las proteínas Cas1 y Cas2 como efectoras en este mecanismo. Tomado de (Amitai G, Sorek R., 2016)

A pesar de que la adquisición de nuevos espaciadores ha sido observada y demostrada, el mecanismo es parcialmente entendido. Conceptualmente, el proceso puede ser dividido en dos subprocesos: la selección del protoespaciador y generación del material espaciador seguido de la integración de éste al arreglo CRISPR y síntesis de un nuevo repetido. Ocasionalmente la delección de espaciadores es requerida debido al limitado tamaño del arreglo CRISPR, aunque esto parece ser dependiente de la especie de bacteria o arquea de la que se trate; empero, se conoce poco acerca del mecanismo y la frecuencia con lo que esto sucede ya que solo se cuenta con la evidencia en el arreglo CRISPR, mas no el hecho biológico reproducible (Rath D, et al, 2015; Makarova KS, et al., 2015).

Los factores clave para la integración del espaciador son las proteínas nucleasa Cas1 y Cas2. Éstas forman un complejo en el cual un dímero de Cas2 se une a dos dímeros de Cas1. La formación de este complejo es requerida para la adquisición de una nueva secuencia espaciadora, pero, la actividad catalítica que posee Cas2 es dispensable durante todo el proceso. Se ha especulado que el complejo Cas1-Cas2 posee la funcionalidad de transportar el material espaciador y llevar a cabo la integración del mismo, lo que puede explicar la presencia de cuatro subunidades Cas1 en el complejo funcional. Se conocen pocos factores adicionales requeridos para adquirir un nuevo espaciador: Cas9, Csn2 y tracrRNA en el tipo II-A, y Cas4 para el tipo I-B. El papel de tracrRNA, Csn2 y Cas4 no son claros pero Cas9 guía la maquinaria de integración. Las polimerasas, ligasas y recombinasas de la célula en la cual se está llevando a cabo el proceso de defensa mediado por CCas toman un papel genérico durante la adaptación debido a que son comunes en todas las células que poseen el sistema de defensa CCas (Rath D, et al., 2015; Hille F, Charpentier E., 2016).

La selección de espaciadores es guiada por ciertos elementos en la secuencia blanco. Los análisis en estas secuencias han revelado un motivo corto adyacente a ésta llamado motivo PAM la cual es crucial para la discriminación entre “lo propio y lo no propio”. Inicialmente se había pensado que la secuencia PAM era solo importante durante la fase de interferencia, posteriormente la evidencia sugirió que PAM es importante en la fase de adquisición del espaciador debido a que es adyacente al protoespaciador. Una vez localizado, no es sabido si el protoespaciador es cortado o copiado del blanco debido a que tras la selección ocurre una degradación total de la secuencia invasora (Hille F, Charpentier E, 2016; Kin T, et al., 2015).

Una vez obtenida la secuencia es necesario integrarla al arreglo CRISPR, en este punto la actividad nucleasa de Cas1 es requerida para cortar el arreglo CRISPR e integrarlo al mismo. Los estudios *in vitro* han determinado que el complejo Cas1-Cas2 es el responsable de la inserción por medio de un mecanismo reminiscente a las integrasas retrovirales. Sin embargo, no se ha podido determinar si este mecanismo de integración es conservado entre los diferentes tipos CCas, ya que esto solo ha sido descrito en *E.coli*. Lo que ha sido bien establecido es que, durante la fase de adaptación, sin importar la clase de sistema CCas o especie de bacteria o arquea de quien se trate, el complejo Cas1-Cas2 es necesario.

Hay que recordar que una parte fundamental, todavía en debate, del sistema CCas es la secuencia líder. Se ha demostrado que la secuencia líder y un repetido aledaño son requeridos para la integración del espaciador; además, la secuencia líder proximal a los repetidos funciona como

molde para la síntesis de un nuevo repetido, es decir, la duplicación del mismo (Koonin E, et al., 2017). Se ha sugerido que la integración polar de los nuevos espaciadores es dependiente a la secuencia líder, aunque hay múltiples excepciones. La característica palindrómica o semi-palindrómica de los repetidos CRISPR son importantes para determinar la posición e integración del nuevo espaciador al arreglo CRISPR. Debido a las cualidades de estos repetidos, forman bucles llamados estructuras cruciformes que reclutan al complejo Cas1-Cas2 para ser escindido por Cas1 e integración posterior de la secuencia espaciadora. En modelos *in vitro* el complejo de adaptación Cas1-Cas2 reconoce a toda aquella estructura cruciforme presente en el ADN a pesar de no ser repetidos palindrómicos o semi-palindrómicos propios de un arreglo CRISPR. Lo anterior no posee función biológica benéfica o perjudicial alguna sobre la secuencia reconocida por “error” ya que el complejo solo queda unido mas no es cortado (Kin T, Tsui M, et al., 2015; Bhaya D, Davison M, et al., 2011).

Se ha determinado que la fase de adaptación se encuentra acoplada a la maquinaria de interferencia por medio de la adquisición de la secuencia espaciadora *primed*, lo que ocurre cuando ya está presente un espaciador diana en el arreglo CRISPR. La maquinaria de interferencia y el espaciador prexistente aceleran la adquisición de espaciadores subsecuentes de la misma diana. La adquisición *primed* de espaciadores solo ha sido reportada en los sistemas CCas tipo I y sus subtipos, mas en los tipos II y III no. De hecho, el mecanismo por el cual se lleva a cabo el *priming* es desconocido (Koonin EV, et al, 2017; Rath D, Amlinger L, et al., 2015).

En la fase de expresión, el *locus* CCas es transcrito para generar el complejo RNA-proteína. Primeramente el *locus* CRISPR es transcrito iniciando a partir de la región de la secuencia líder. Ésta contiene elementos promotores y sitios de unión para proteínas reguladoras, además de elementos importantes para la integración de nuevos espaciadores. Al inicio se genera un transcrito largo, el pre-crRNA, el cual llega a presentar *hairpins* debido a los palíndromos del *locus* CRISPR. Este pre-crRNA es procesado en fragmentos más cortos correspondientes a un solo espaciador flanqueado por repetidos. Las proteínas Cas responsables del procesamiento del crRNA varían de acuerdo a la clase a la cual pertenezca el sistema CCas, lo que ha complicado la manera de explicar el mecanismo. Es importante denotar que una célula puede contener los tres tipos de sistema CCas en su genoma, sin importar su localización en cromosoma o plásmido, co-existiendo y co-funcionando, y a pesar de ello cada sistema procesa su propio pre-crRNA (Rath D, Amlinger L, et al., 2015).

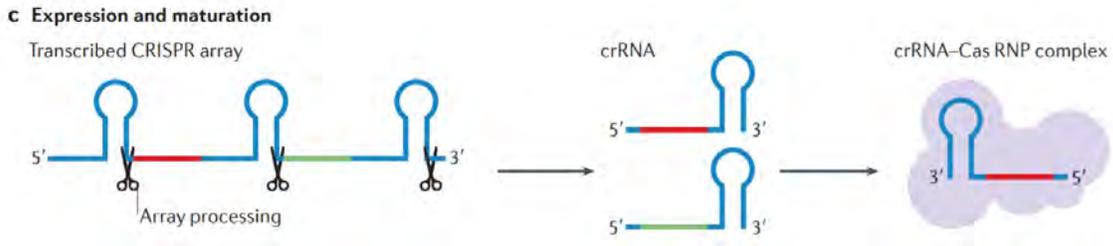


Figura 1.12.- Representación de la fase de expresión y maduración (c) en dónde se observa el proceso de maduración tras la expresión del crRNA el cual servirá como guía para eliminar la secuencia invasora. (Tomado de Amitai G, Sorek R., 2016).

Si se hace una comparación general entre los tres tipos de sistema CCas, se denota que el tipo I y III comparten similitudes en la manera por la cual procesan el pre-crRNA, así como la estructura y del complejo crRNP formado. Todos los sistemas tipo I y III emplean la proteína Cas6 para el procesamiento del pre-crRNA, a excepción del sistema I-C o I-E que emplean Cas5d o Cas6e respectivamente. El sistema tipo I (el más estudiado a la fecha en *E.coli*) forma el complejo Cascade que consta de Cas6e, Cse1, dos copias de Cse2, Cas5e, seis copias de Cas7 y el crRNA. El complejo Cascade posee forma de hipocampo, en dónde las proteínas Cas7 proveen de un sostén helicoidal para el crRNA mediado por pulgares β -hairpins; mientras Cas5e y Cas6e anclan los extremos 5' y 3' a lados opuestos del complejo Cascade. Por otro lado en los sistemas tipo III, la maduración del pre-crRNA también involucra a Cas6, así mismo los complejos Csm y Cmr poseen una estructura y función similar a Cascade (Rath D, Amlinger L, et al., 2015; Makarova Ks, et al., 2015).

En esta misma fase, el sistema tipo II emplea un mecanismo completamente diferente para la transcripción del pre-crRNA, ya que ésta se basa en la dependencia a la RNase III del hospedador y un tracrRNA que se une por complementariedad de bases al pre-crRNA. De manera común, y descrita hasta ahora, esta fase depende de Cas9 (Makarova KS, et al., 2015), lo cual se discutirá más adelante.

El principio de interferencia es sencillo, el crRNA unido al complejo efector localiza la secuencia protoespaciadora para activar la degradación del blanco mediante nucleasas Cas específicas. En el sistema tipo I, el complejo Cascade localiza al ADN blanco y Cas3 o sus variantes realizan la degradación. Se ha visto que Cas3 puede estar ausente en el complejo Cascade y de suceder esto, Cas3 es reclutado en el momento requerido para el corte. Tanto el sistema tipo I y III requieren para la fase de interferencia la presencia de la secuencia PAM, además de una

coincidencia completa protoespaciador-crRNA en una región llamada “semilla” la cual es adyacente a PAM. En el complejo Cascade puede interactuar de manera no-específica con el ADN y escanear por PAMs y regiones semillas, siendo éstas detectadas por Cse1. El apareamiento de bases comienza por la región semilla y continúa por el resto del crRNA, lo que lleva a la dislocación de la hebra del ADN no-unida y la formación de báculos-R. La unión del crRNA al blanco causa un cambio conformacional tanto en el complejo Cascade y en el ADN blanco, lo que pudiera ser la señal para el reclutamiento de Cas3 si no está presente en el complejo. Cas3 procede al *nicking*, es decir el corte en una sola cadena, del ADN blanco y continúa una degradación progresiva de éste cada seis bases. Al finalizar el complejo Cascade se disocia del blanco degradado, más no se conoce si éste se desarma o puede recibir un nuevo crRNA (Rath D, Amlinger L, et al., 2015; Marraffini LA., 2015).

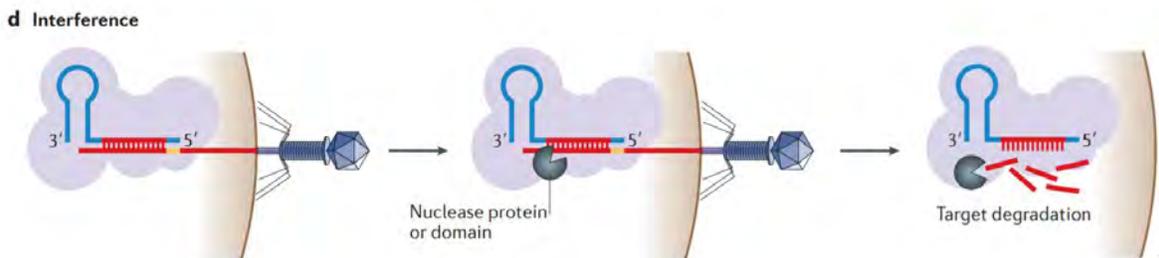


Figura 1.13.- Representación del mecanismo de interferencia (d) tras la expresión y maduración del crRNA. Cabe denotar que éste último lleva a cabo la función más importante para combatir las infecciones de bacteriófagos. (Tomado de Amitai G, Sorek R., 2016).

Por otro lado, el sistema tipo III es caracterizado por la acción de complejos multiméricos similares a Cascade, el complejo Csm y Cmr. El complejo Csm del sistema CCas III-A está formado por seis proteínas pero la nucleasa aún no ha sido identificada; mientras Cmr del tipo III-B está compuesto por seis o siete proteínas (dependiendo de la especie y subtipo) y de ellas Cmr4 es la nucleasa funcional. El sistema tipo III no ha sido caracterizado del todo debido a que en ciertas especies de arqueas el complejo Cmr reconoce tanto ARN y ADN, mientras en la mayoría el reconocimiento de ADN es llevado a cabo por Csm y el ARN por Cmr; así mismo recientemente se descubrió que la arquea *S.islandicus* posee un *locus* híbrido de proteínas efectoras pertenecientes tanto al sistema III-A y III-B. A pesar de ello, de manera general se concibe que ambos complejos actúan de una manera similar a Cascade, empleando un andamio de soporte para el blanco y la nucleasa actuando sobre de éste cada cuatro a seis bases (Rath D, Amlinger L, et al., 2015; Marraffini LA., 2015). Una característica importante encontrada entre el sistema tipo I y II es la dependencia a

PAM para reconocer entre el material propio del no-propio; esta misma característica está ausente en el sistema tipo III y se ha hipotetizado que la discriminación es llevada a cabo por un apareamiento extendido entre el crRNA y el material endógeno, lo que inactiva el complejo efector del tipo III. Sin embargo, este mecanismo todavía sigue siendo investigado (Koonin EV, et al., 2017).

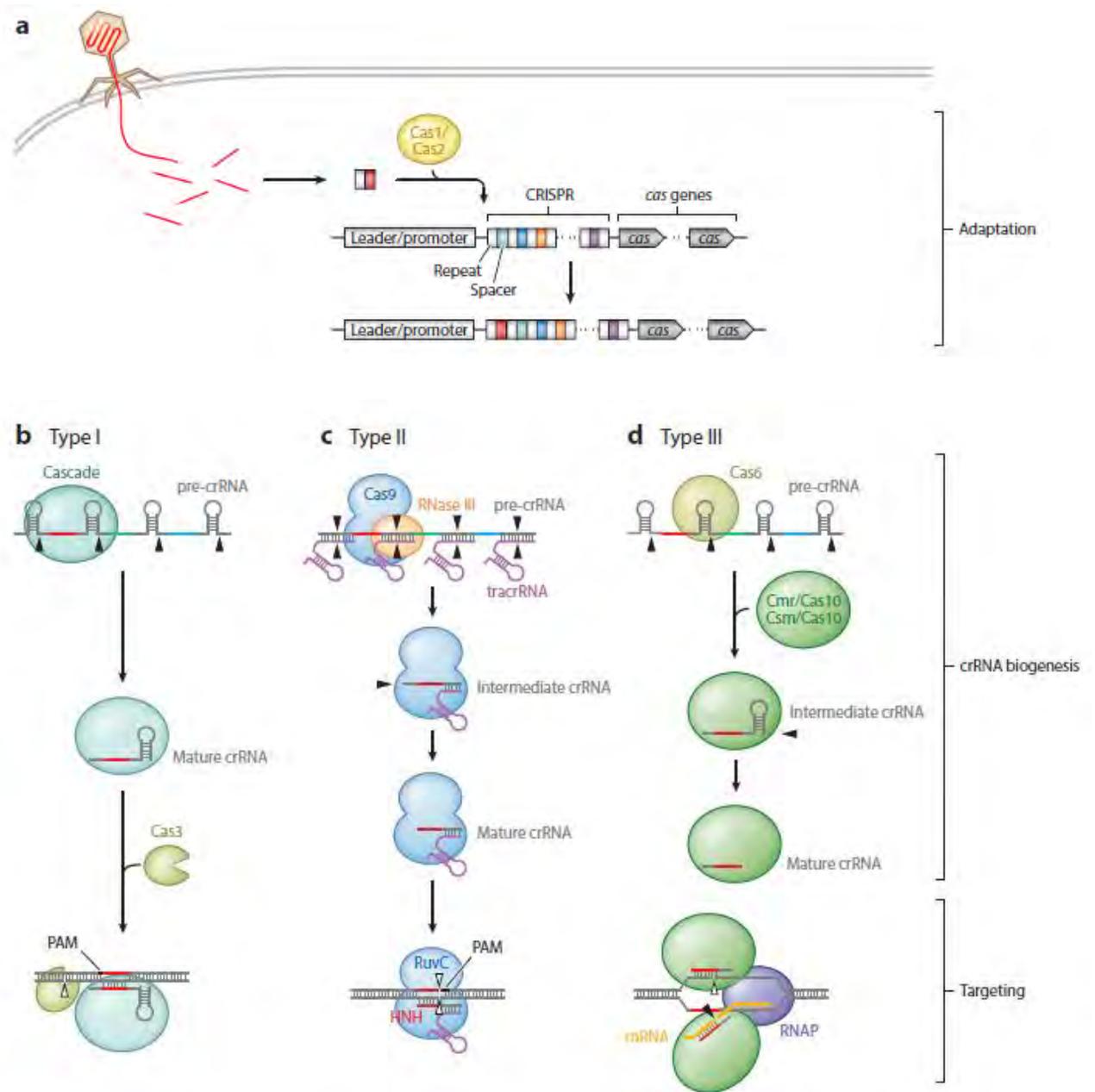


Figura 1.14.- Esquematización del mecanismo del sistema CRISPR-Cas tras una infección con material genético exógeno. En "a" se resume la fase de adaptación, mientras en "b", "c" y "d" se muestran las diferentes vías de biogénesis de crRNA y unión al blanco dependientes del tipo de CRISPR-Cas al cual pertenezcan. (Tomado de Jiang W, et al., 2015)

Como se ha descrito en el presente trabajo, el sistema CCas posee tanto generalidades y particularidades que han complicado la investigación básica del sistema como su aplicación; no obstante, el sistema más estudiado ha sido el tipo II. *Per se*, el sistema CCas tipo II se basa en la interacción de la proteína efectora Cas9 que en conjunto con un particular ARN guía (ARNg) lleva a cabo el reconocimiento y degradación del blanco. A comparación de los otros dos sistemas en los cuales el pre-crRNA es procesado y empleado posteriormente, el pre-crRNA del sistema tipo II es disfuncional. La biogénesis de un crRNA funcional involucra la co-transcripción del pre-crRNA y el tracrRNA. Una característica importante del tracrRNA es que es homóloga a los repetidos blanco encontrados en el *locus* CRISPR, uniéndose esta secuencia de ARN_{pnc} por complementariedad a la primera sección de repetidos 3' del pre-crRNA. Tras ésta unión el complejo formado pre-crRNA-tracrRNA es escindido en fragmentos más cortos por la acción enzimática de la ARNasa III de la célula procarionte. El complejo madurado es llamado ARNg que actúa a manera de sonda que se une al blanco exógeno invasor reclutando a Cas9, no obstante otro modelo propuesto dicta que el armado del ARNg y unión a Cas9 tiene lugar primero antes de unirse al blanco. El ARNg se une a partir de la secuencia 5' terminal del protoespaciador blanco empleando la secuencia crRNA, mientras que el tracrRNA forma un anclaje molecular con la proteína Cas9. Esta proteína posee una forma bi-lobular conformada por los dominios estructurales REC1, REC2, PI (PAM Interacting domain) y dos dominios nucleasa llamados RuvC y HNH localizados de manera encontrada sobre el sitio catalítico, los cuales cortan la doble cadena del ADN. La escisión del ADN de doble cadena es llevada a cabo entre la tercer o cuarta base posterior a la secuencia PAM, la cual en el caso de Cas9 posee el motivo NGG. Tras el corte, Cas9 puede unirse a un nuevo complejo ARNg y repetir la acción protectora del sistema CCas (Jiang F, Doudna JA., 2017; Nishimasu H, Nureki O., 2017).

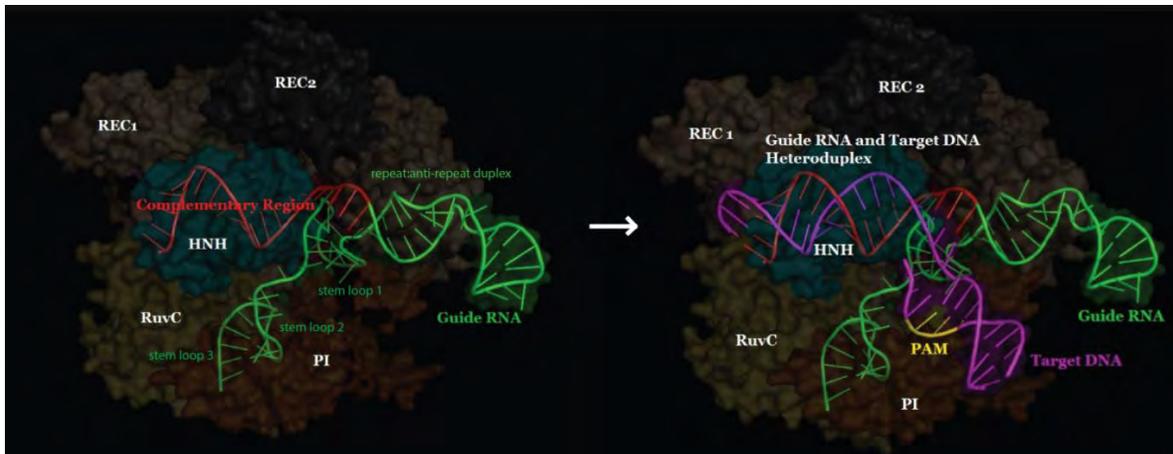


Figura 1.15.- Estructura por cristalografía de la unión de Cas9 con su blanco. Nótese los cinco dominios que forman únicamente a la proteína Cas9. (Tomado de Trufts University, 2017).

Es importante hacer denotar que la manera en la cual el gRNA se une a la proteína Cas9 no ha sido descrita en su totalidad. Se sabe que el sitio de unión de los bucles del ARNg, formados entre los repetidos del pre-crRNA y tracrRNA, tiene lugar en REC1 quien funge como soporte, mientras que REC2 no posee una función directa con el ARNg. Mutaciones dirigidas en REC1 anulan completamente la unión de Cas9 con el ARNg, mientras las realizadas en REC2 disminuyen transitoriamente la actividad de Cas9, lo que sugiere una función esencial de REC1 y una función dispensable para REC2. Se ha hipotetizado que durante el proceso de unión del gRNA existe un fuerte cambio conformacional transitorio que expone los sitios catalíticos de Cas9, sin embargo el sitio nucleasa RuvC también funge como soporte para el gRNA a pesar de que el análisis del sitio indica una completa actividad de nucleasa. Parte del reconocimiento del gRNA y de la secuencia blanco es mediado por las interacciones entre éste y el sitio PI. Los residuos de arginina 1333 y 1335 del PI se unen al surco mayor de las guaninas de la secuencia PAM mientras que el residuo de serina 1109 del *phosphate lock loop* posicionado en +1 PAM, estabilizan en conjunto al ADN promoviendo un giro de 180° de la secuencia diana hacia el gRNA. Tras la rotación y apareamiento de las bases gRNA-blanco toma lugar la escisión (Nishimasu H, Nureki O., 2017; Nishimasu H, et al., 2014).

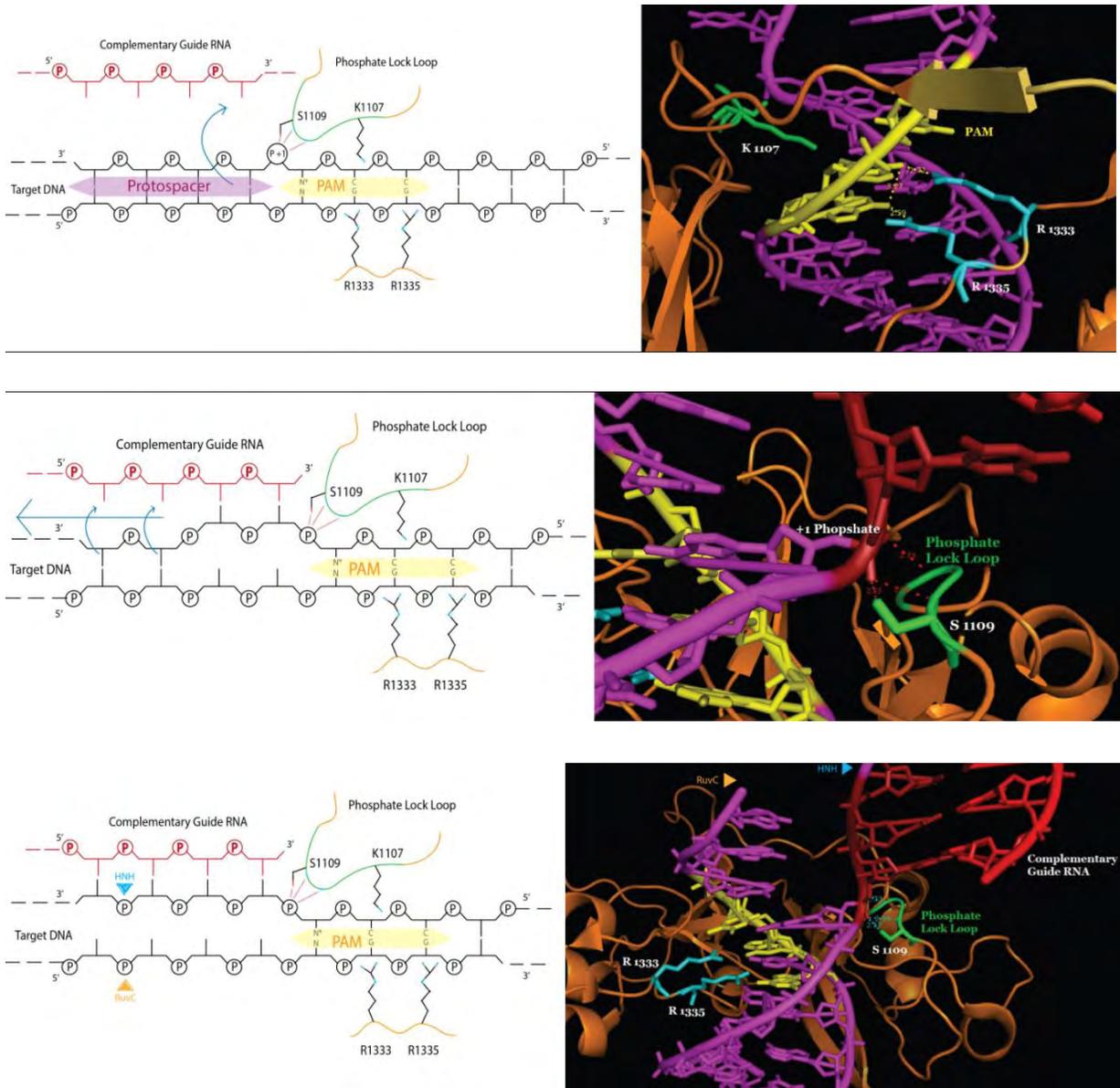


Figura 1.16.- Representación del proceso de unión de Cas9 a su sitio blanco. Ver párrafo superior para explicación de la misma. Imagen original de Anders, et al., 2014; Nishimasu H, et al., 2014. (Tomada de Trufts University; 2017)

El mecanismo de escisión es llevado a cabo por las nucleasas putativas (Las nucleasas putativas poseen la característica de no reconocer de manera específica una secuencia para el corte o degradación) RuvC y HNH las cuales son dependientes de iones metálicos. El dominio HNH de Cas9 escinde la cadena de ADN complementaria al ARNg en su sitio catalítico $\beta\beta\alpha$ -metal-fold, en el cual el residuo de histidina 840 activa una molécula de agua para el ataque nucleofílico sobre el fosfato escindible quien es más electrofílico gracias a la unión coordinada con un ión magnesio, lo que se

traduce en la escisión 3'-5' del enlace del fosfato y ruptura del ADN. El mecanismo por el cual RuvC lleva a cabo la escisión de la cadena no complementaria al ARNg es similar a HNH, sin embargo, emplea dos iones magnesio en coordinación con el fosfato de las bases nitrogenadas, siendo el principal cambio el ataque nucleofílico a partir del residuo de histidina 983 (Nishimasu H, Ran FA, et al., 2014).

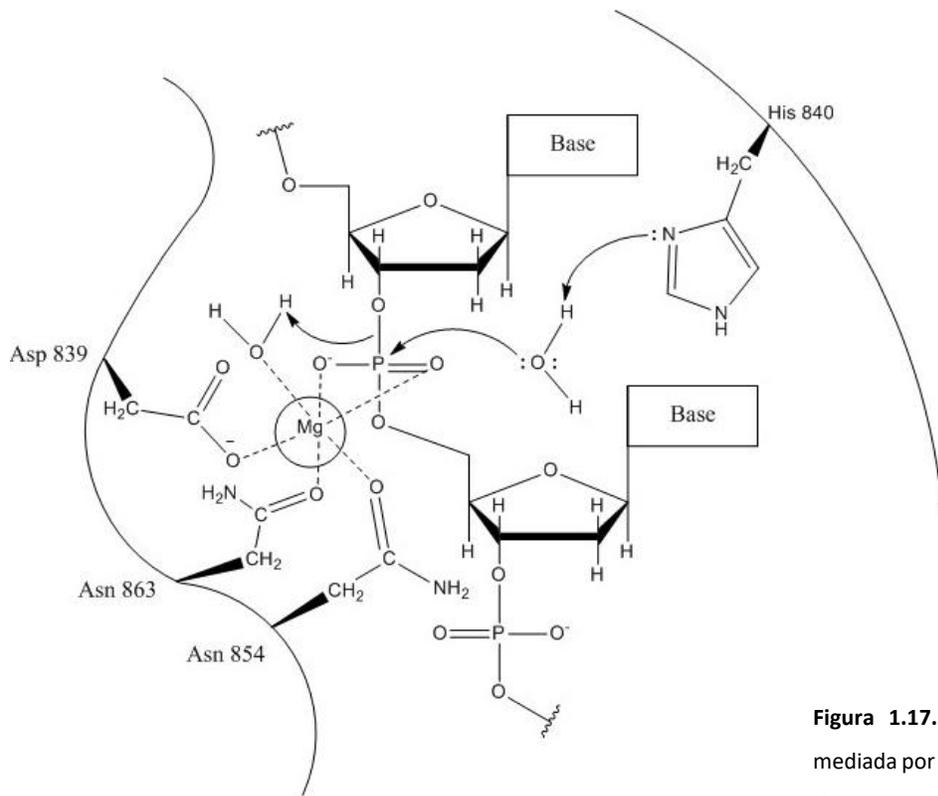
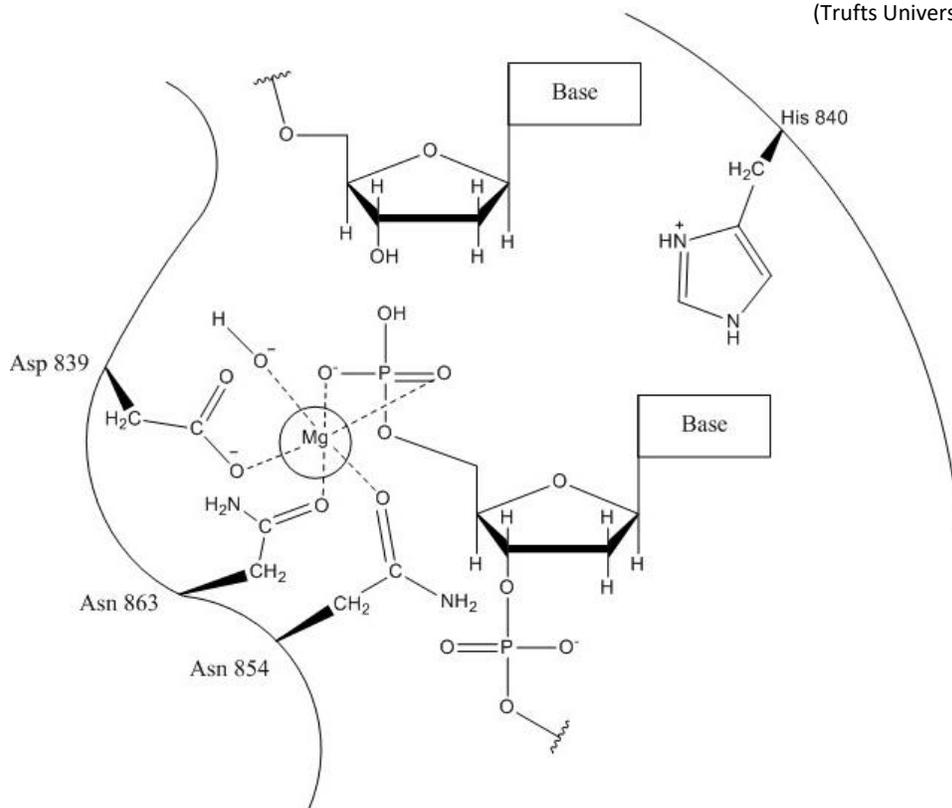


Figura 1.17.- Esquemática de la escisión mediada por el dominio HNH de la proteína Cas9. Original de Anders, et al., 2014; adaptada por (Trufts University., 2017)



1.3.3.6 Sistema CRISPR-Cas como herramienta de edición genómica

Varias de las proteínas Cas caracterizadas a la fecha poseen de una u otra forma un dominio de unión a ácidos nucleicos; por lo que el sistema CCas puede ser empleado como la base para crear a partir de el un set de herramientas ingeniería genómica o edición genómica. A pesar de las diferentes proteínas Cas existentes, únicamente Cas9 puede ser diseñada para reconocer su sitio blanco en virtud de ser guiada por un ARN.

Para hacer más conveniente el sistema tipo II, la dupla tracrRNA:crRNA fue hibridada en uno solo, llamado *single guided-RNA* (sgRNA) quien tiene dos características importantes: una secuencia complementaria al ADN (típicamente de 20pb) y una estructura de doble cadena en la posición 3' que se une a Cas9. El sistema CCas emplea a Cas9 para introducir rupturas de doble cadena específicas en las secuencias blanco de ADN. Para que esto suceda el sistema CCas9 requiere del motivo PAM en la porción 3' final de la cadena de ADN blanco para facilitar su unión. El reconocimiento de PAM es necesario para activar la conformación de Cas9. PAM también es importante como un sistema de reconocimiento y control para proteger al sgRNA de si mismo y evitar ser el blanco. De ésta manera la actividad de nucleasa de Cas9 puede ser dirigida a cualquier región genómica que posea inmediatamente un PAM 5', simplemente mediante el diseño de un sgRNA que sea complementario a la secuencia ADN blanco (Pellagatti A, Dolatshad H, et al., 2015).

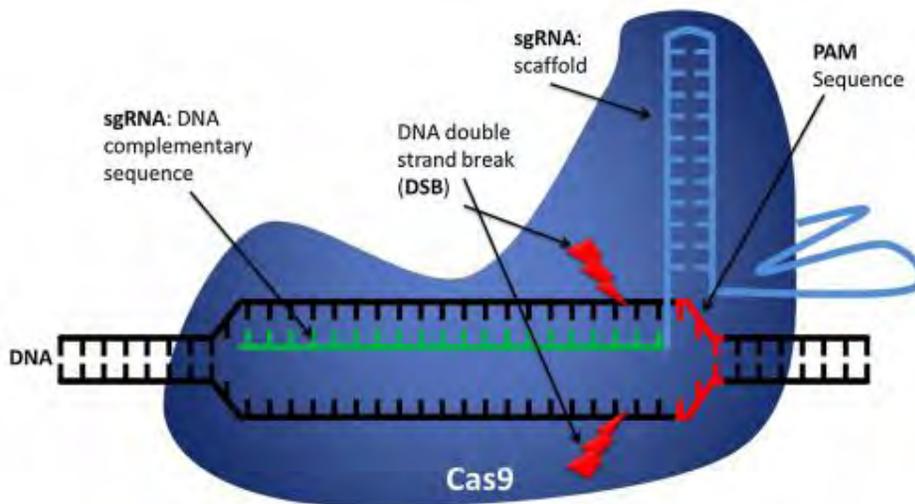


Figura 1.18.- Representación de un sgRNA unido al blanco y a Cas9. (Tomado de Pellagatti A, Dolatshad H, et al., 2015)

1.4 Especificidad de las Nucleasas

Al ser empleadas para manipular genomas complejos, las nucleasas sintéticas deben ser altamente específicas con un mínimo o nada de impacto en el genoma nuclear circundante para evitar modificaciones no intencionadas. Por lo tanto la especificidad de una nucleasa se resume en una característica simple -cortar en un solo sitio sin dañar, directa o indirectamente, al resto genoma nuclear-. Debido a lo anterior, la especificidad de las nucleasas es un tema de interés mayor en el campo de la edición genómica. Existen otras características que son deseables en el diseño de una nucleasa sintética como la facilidad con la cual pueden ser diseñadas (incluyendo el sitio de reconocimiento a la secuencia) y eficiencia con la cual pueden ser introducidos a la célula deseada y que realicen en aquella cantidad el efecto deseado.

Los primeros experimentos para mejorar las cualidades de las nucleasas se realizaron en FokI, empleada tanto por ZFNs y TALENs. De manera natural FokI no es dimérica y era propensa a cometer varios errores al cortar debido a la baja especificidad relacionada a la falta de un soporte. Al fusionar la nucleasa con los dominios de unión y reconocimiento específico del ADN se modificó ésta para que actuara de manera obligatoria como heterodímero. Al editar el dominio de dimerización se logró aumentar exponencialmente la especificidad y reconocimiento espacial de la secuencia deseada, siendo ésta modificación la más empleada, tanto por grupos de investigación como por laboratorios privados, para realizar los cortes con sistemas dependientes de FokI (Scharenberg AM, et al., 2016; Porteus MH, 2015).

Ha sido demostrado que tanto ZFNs y TALENs pueden ser empleados en experimentos de edición genómica estable, hasta el punto en que ya están siendo empleadas en ensayos clínicos de terapia celular con resultados prometedores; sin embargo, a pesar de su éxito no es posible negar los pequeños errores que presentan ambas herramientas por lo que no han alcanzado un *status* de seguras para aplicación clínica en humanos por las agencias reguladoras internacionales. Ambas sufren del efecto *off-target*, en mayor o menor medida, pero este es apreciable en las zonas cercanas al sitio deseado y no diseminadas de manera aleatoria en el genoma. De acuerdo a revisiones recientes en el tema, no es posible determinar de manera certera las causas de este fenómeno, e.j. algunos casos son debido a células más permisivas que otras, marcadores epigenéticos cercanos a la secuencia deseada, CpGs, cantidad de repetidos circundantes, variantes de los dominios de unión al ADN empleados, vía de transfección y método para lograrlo, entre las causas más destacables (Steward CN Jr, et al., 2014; Porteus MH, 2015; Zhang F, et al, 2015).

Con el descubrimiento de la capacidad de programación del sistema CCas se propuso que los avances en la edición genómica serían a grandes saltos, pero no fue así debido a una serie de problemáticas relacionadas al diseño del híbrido sgRNA-nucleasa cas (Charpentier E, et al., 2012). Desde que se comenzó a emplear como herramienta para edición genómica, diferentes grupos de investigación se abocaron a estudiar la especificidad del mismo y encontrando que de los tres es el que menos ofrece una reproducibilidad en su especificidad a pesar de ser el más sencillo de diseñar y probar *in silico*. Diversos estudios salieron a la luz dejando en claro que CRISPR/Cas tiene un elevado índice *off-target* y no solo en las secuencias aledañas sino también de manera aleatoria en el genoma nuclear (Huang J, et al., 2015) con graves efectos, propios de la reparación del ADN por cualquiera de las dos vías ya mencionadas. La causante principal de ello es el mismo sgRNA empleado. Al ser una secuencia pequeña (18-20pb) aumenta la posibilidad de encontrar en el genoma secuencias parecidas que tengan la región PAM completa; caso contrario, son ZFNs y TALENs que al reconocer secuencias de mayor tamaño se vuelve más difícil el hecho de equivocación. En la actualidad CRISPR/Cas es la más estudiada y se han realizado esfuerzos para modificar y establecer guías para diseñar de manera correcta al sgRNA o incluso modificar los dominios de unión de *cas* para que acepte dos sgRNAs (sentido-antisentido) para aumentar la especificidad del sistema, lo que ha demostrado grandes beneficios (ver más adelante en el presente trabajo).

Sin importar el tipo de nucleasa elegida es difícil poder determinar el espectro completo de cortes fuera del blanco en un genoma complejo. De manera común los estudios de especificidad se basan en un conocimiento *a priori* de modelos *in silico* con modelos matemáticos con una capacidad de predictibilidad aceptable, mas solo es en las secuencias ya conocidas o previamente reportadas con una frecuencia alta de cortes *off-target*. El problema verdadero para poder ser empleadas como herramientas para la edición genómica terapéutica son las secuencias codificantes o reguladoras con una baja frecuencia *off-target* que pasan desapercibidas en la mayoría de los modelos matemáticos o biológicos que no emplean tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación complementadas vía Sanger. Hasta la fecha no se ha podido consolidar las reglas básicas para el diseño de cada una de las herramientas de edición genómica debido a que los efectos *off-target* varían entre linajes y senescencia celular, longitud de la secuencia, etc (Li J, et al., 2015; LaFontaine JS, et al., 2015).

Uno de los objetivos principales que se tienen con el uso de las herramientas de edición genómica es el tratamiento de enfermedades de diversa índole, en especial aquellas que representan un problema de salud en la población. Como se vio en las tablas anteriores las enfermedades que son empleadas como modelos terapéuticos suelen ser cánceres, inmunodeficiencias o incluso obesidad; empero, están diseñadas para modelos *ex vivo*, es decir, obtener células del paciente y tras modificarse volver a ser introducidas. No en todos los casos a estudiar es viable realizar la terapia celular o génica en un tejido *in vivo*, ya que ciertas enzimas son tejido específicas o ampliamente distribuidas por el organismo y el cambio en un solo lugar no es suficiente para recuperar la funcionalidad fisiológica en su totalidad.

Lo anterior es representativo de las enfermedades monogénicas, en las cuales una sola disrupción en un gen es capaz de causar serias patologías que pueden tener un tratamiento paliativo que mejore ligeramente la vida del paciente o no tenerlo. Debido a la falta de medicamentos para muchas de ellas se ha visto como una opción la edición de genes para poder sacar adelante a los pacientes afectados; mas, para ello se debe recurrir a metodologías prácticas poco aceptadas como lo es la modificación genómica en un embrión humano viable, ya que en estos casos la mejor terapia es aquella que restituya la funcionalidad del gen o su proteína efectora.

Capítulo 2 “Panorama general de las Enfermedades Monogénicas”

2.1.- Enfermedades Genéticas y Monogénicas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a las enfermedades humanas en cuatro grupos dependiendo su razón etiológica: endógenas, exógenas, ambientales, y multifactoriales (WHOICD; 2016). Los cuatro grupos anteriores comprenden más de 7,000 diferentes patologías, de las cuales aproximadamente más de 6,000 están clasificadas en endógenas-multifactoriales de etiología genética o relacionada a ésta. El término de enfermedad genética (EnGs) o condición genética es muy amplio, mas hace alusión a una (o unas) aberración(es) en el material genético, cuyo origen puede ser hereditario o adquirida a lo largo de la vida y pone en riesgo la salud de un paciente en un menor o mayor grado. Por convención las EnGs se dividen en tres categorías principales: desórdenes cromosómicos, enfermedades mendelianas o monogénicas, y enfermedades multifactoriales.

2.1.1.- Desórdenes cromosómicos

Éstos pueden ser divididos en dos grandes grupos: aquellos causados por anomalías numéricas o aquellos causados por anomalías estructurales. Las anomalías cromosómicas numéricas incluyen múltiplos exactos del número haploide, a lo que se le denomina poliploidía. Tanto la anomalía triploide (69 cromosomas) como tetraploide (92 cromosomas) son diagnosticadas en fetos o embriones de abortos espontáneos debido a que ambos problemas son incompatibles para la vida (Luthardt FW, Keitges E., 2001).

Las anomalías numéricas más comunes son resultado de la ganancia o pérdida de uno o más cromosomas, siendo denominadas como aneuploidía. Éstas ocurren por un evento irregular de separación de los cromosomas durante la división celular denominado no-disyunción, la cual ocurre durante la primer o segunda división meiótica. Esto da lugar ya sea a una copia extra de un cromosoma (trisomía) o una copia faltante (monosomía). La aneuploidía también puede ocurrir durante la mitosis posterior a la concepción y conlleva a un mosaicismo cromosómico, en el cual una persona tiene una mezcla de dos líneas celulares al tener cada una un número cromosómico diferente (Lam WWK, Mueller RF., 2002).

Las anomalías cromosómicas estructurales resultan de rupturas en los cromosomas. Si un solo cromosoma se ve afectado por un evento de ruptura el resultado será una delección (pérdida de material), duplicación (ganancia de material), o inversión cromosómica (rearrreglo del material). Si el cromosoma presenta delecciones en ambos extremos da lugar a un cromosoma anillado, mientras que un evento sincrónico de delección y duplicación da como resultado un isocromosoma, el cual posee ya sea dos brazos cortos o dos brazos largos con información genética por duplicado. Cuando el evento de ruptura involucra a más de un cromosoma el resultado es la translocación, que es el intercambio de material entre dos cromosomas. Lo anterior puede ser balanceado (sin pérdida de material) o no-balanceado (con pérdida de material); siendo este último el que presenta un fenotipo anormal debido a un desequilibrio en el material cromosómico como en el caso de las delecciones y duplicaciones (Luthardt FW, Keitges E., 2001).

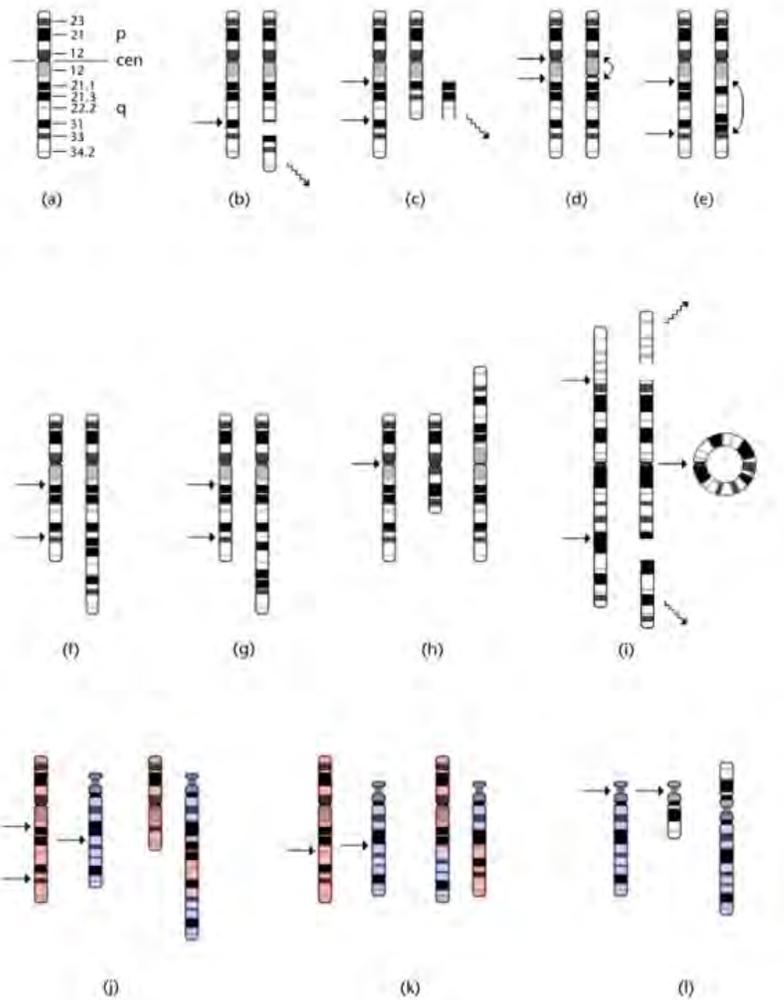


Figura 2.1.- Rearreglos cromosómicos estructurales. a) Brazo cromosómico y bandeo numérico acorde al ISCN (1995). b) Deleción terminal y c) deleción intersticial, cada una con pérdida de fragmento acéntrico. d) Inversión pericéntrica e e) inversión paracéntrica, cada uno con rotación de segmentos entre rupturas. f) Duplicación directa y g) duplicación invertida. h) Formación de isocromosóma por brazo corto y largo. i) Cromosóma anillado con dos fragmentos acéntricos. j) Inserción de un segmento cromosómico en un cromosóma no-homólogo. k) Translocación recíproca con intercambio de segmentos entre cromosómas no-homólogos. l) Translocación Robertsoniana entre cromosomas acrocéntricos. (Tomado de Luthardt FW, Keitges E., 2001)

Recientemente grupos de investigación llevaron a cabo experimentos en los cuales lograron eliminar cromosomas Y completos en ratones mediante el uso del sistema CCas. Para ello diseñaron sgRNAs con diana en los centrómeros de los cromosomas lo que generó una inestabilidad que culminó con la fragmentación de los mismos. De acuerdo con los autores es el primer reporte en el cual mediante las herramientas de edición genómica fue posible eliminar un cromosoma de manera selectiva lo que da pie a continuar la investigación en patologías cromosómicas numéricas (Fatwa A, et al, 2017).

2.1.2.- Enfermedades monogénicas o mendelianas

Este grupo de enfermedades es originado ya sea por un alelo mutante o un par de alelos mutantes en un solo locus génico. Éstas pueden ser de carácter hereditario o una mutación *de novo* durante el desarrollo embrionario primitivo. En el caso de ser hereditarias, la mayoría de las veces presentan patrones de herencia bien definido, lo que es importante precisar pues se relaciona a las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad; ya que en otros casos, no es posible definir con exactitud el patrón de herencia lo que llega a dificultar el diagnóstico temprano y progresión favorable de la patología. Estos patrones de herencia pueden ser: autosómica dominante, autosómico recesivo, ligado al X recesivo o dominante, y ligado al Y (Kennedy MA., 2005).

El patrón de herencia autosómico recesivo es el más común entre las enfermedades monogénicas. Las patologías de esta índole pueden ocurrir tanto en mujeres como en hombres, viéndose afectados pocos miembros de una familia en un análisis de genealogía de múltiples generaciones, poseyendo un riesgo de heredar la mutación causante a la futura descendencia de aproximadamente 25%. Los pacientes afectados son homocigotos para el gen dañado, esto es, que requieren de la presencia de dos copias del gen para desencadenar la patología. Caso contrario con el patrón de herencia autosómico dominante. En éste, la patología puede ser específica de sexo biológico, posee un riesgo de herencia de aproximadamente 50%, los pacientes afectados son heterocigotos para el gen en cuestión, y al analizar una genealogía familiar de múltiples generaciones es posible encontrar una mayor cantidad de personas afectadas. La gran mayoría de las enfermedades monogénicas (EMGs) son de carácter recesivo mientras que las dominantes son más escasas; empero, ambas son raras en la población.

Por otra parte, los portadores sanos no presentan antecesores afectados en un análisis de genealogía familiar siendo muchas veces casos *de novo*. Un factor de riesgo importante para que los

descendientes presenten la patología es la consanguinidad entre los padres, a pesar de que no se cumple esta condición en todas las veces, es determinante para aumentar el porcentaje de riesgo. De manera “normal” una familia que presenta una conocida EMG recesiva tiene un 25% de probabilidad de que uno de sus hijos la presente mientras que el 75% restante compete a un desarrollo sano (25% de homocigosis normal + 50% de ser portadores heterocigóticos). Es importante denotar que probablemente todos los individuos presentes, y por existir, sean portadores de un gran número de alelos correspondientes a EMGs recesivas como resultado de la gran diversidad genética de la creciente población humana (Kennedy MA., 2005; Stankiewicz P, Lupski J., 2002).

Como ya se mencionó previamente, entre la gran variedad de EMGs existen ciertas patologías que se heredan de acuerdo con el sexo biológico afectando o no a los portadores. Las enfermedades ligadas al cromosoma X mayoritariamente se manifiestan en un patrón recesivo que generalmente dañan al sexo biológico masculino, mientras las mujeres son portadoras sanas debido a que su segundo cromosoma X provee del alelo sano. En contraste, los hombres al poseer un solo cromosoma X en el cual se encuentra el alelo dañado irremediablemente presentarán la enfermedad y transmitirán este mismo gen a todas sus hijas las cuales serán portadoras sanas. Las portadoras de este gen lo transmitirán a la mitad de sus hijos y a la mitad de sus hijas formando así una genealogía familiar rastreable. Sin embargo, de manera ocasional las mujeres también presentaran algún grado de afectación. Esto en consecuencia de una inactivación aleatoria del cromosoma X materno, mas inexplicablemente la afectación de la paciente es en un grado menor (Kennedy MA, 2005).

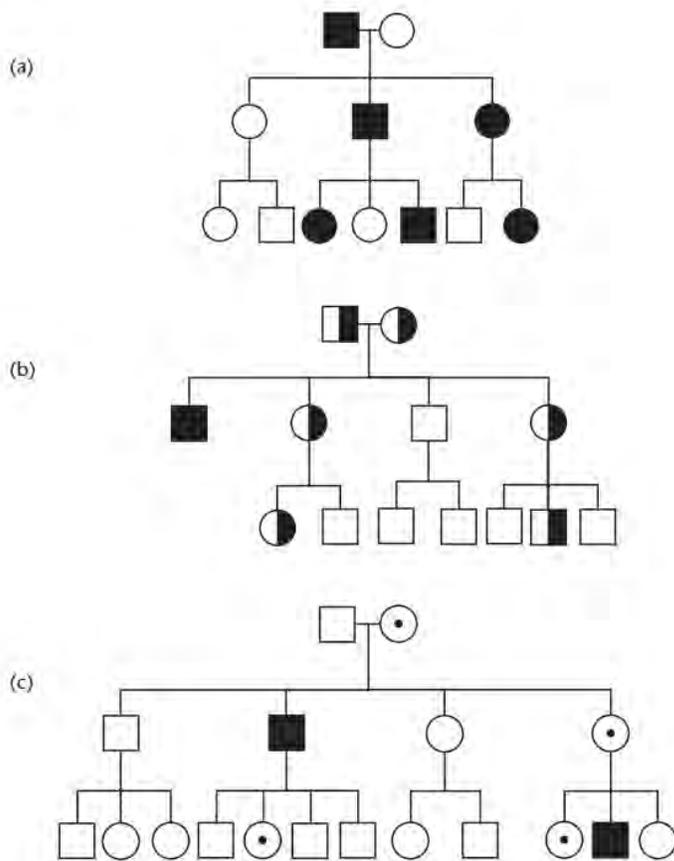


Figura 2.2.- Esquema representativo de diferentes patrones de herencia mendelianos. a) Autosómico dominante, b) Autosómico recesivo y c) Recesivo ligado al X. (Tomado de Kennedy MA, 2005)

Otra opción ligada a las EMGs del cromosoma X es un comportamiento poco común de carácter dominante en el cual sin importar el sexo biológico del portador se manifestará la patología; sin embargo, en un análisis de genealogía familiar siempre se verán más mujeres afectadas que hombres. En si, estas patologías se manifestarán tanto en hombres hemicigotos (el gen funcional únicamente se encuentra en un cromosoma sexual X o Y) como en mujeres heterocigotas para el cromosoma X. La inactivación aleatoria de un cromosoma X al que están sujetas las mujeres usualmente significa que ellas tienen una posibilidad menor de presentar la enfermedad en comparación con los hombres hemicigóticos salvo que sean homocigotas para el alelo causante. La descendencia proveniente de una madre afectada tiene un 50% de probabilidad de heredar la patología; esta situación cambia si el afectado inicial es un varón y de ser el caso, todas las hijas de éste heredarán el gen patológico y sus hijos no.

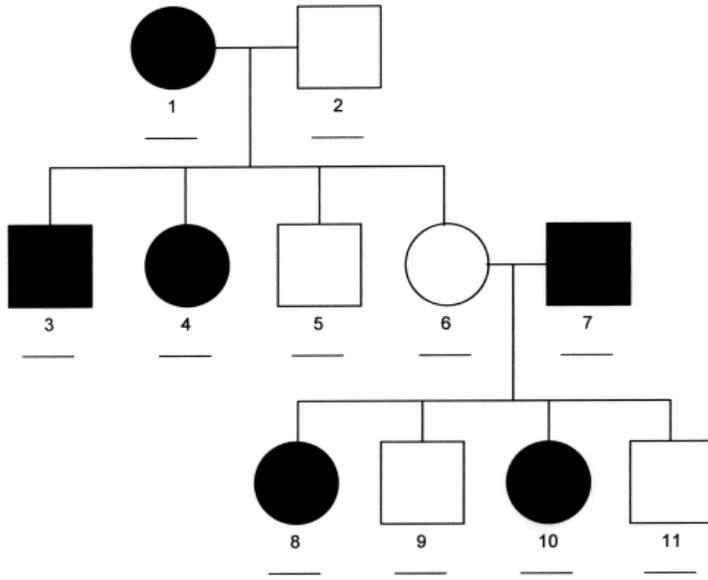


Figura 2.3.- Esquema representativo para el patrón de herencia ligado al $-X$ -dominante. (Tomado de Michigan State University, 2017)

Finalmente, más no menos importante, se encuentran los pocos desórdenes genéticos hereditarios ligados al cromosoma Y. La particularidad que presentan al ser únicamente heredados de padre a hijo los hacen relativamente fáciles de rastrear en una genealogía familiar. Además, no existe un carácter dominante o recesivo debido a que el hombre al solo contar con un cromosoma Y la enfermedad siempre se presentará debido a la hemicigosis del cromosoma Y (Kennedy MA., 2005; Stankiewicz P, Lupski., 2002; Lam WWK, Mueller RF., 2002).

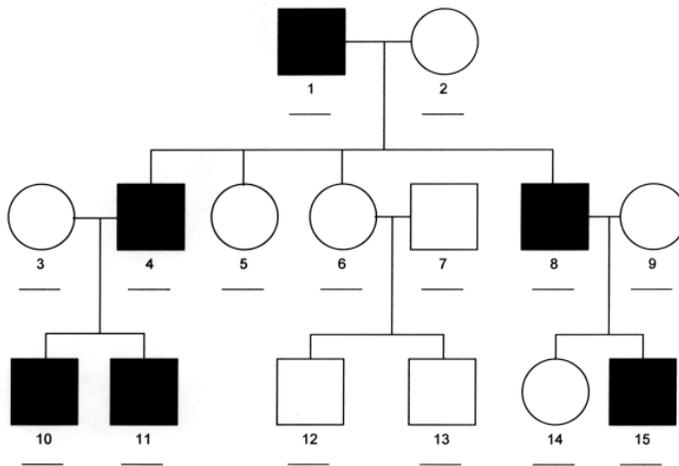


Figura 2.4.- Esquema representativo de la herencia ligada al cromosoma $-Y-$. (Tomado de Michigan State University, 2017)

Clínicamente varias condiciones médicas de origen mendeliano son genéticamente heterogéneas, esto es, que poseen manifestaciones clínicas similares a pesar de tener una causa genética completamente distinta. Esto se traduce en una dificultad práctica para realizar un diagnóstico de manera certera y muchas veces el patrón de herencia en una familia no es inmediatamente discernido. Complejidad adicional deriva de la expresividad variable (severidad) de muchas características genéticas, y una penetrancia incompleta (falla de un gen mutante de causar un fenotipo patológico). Una porción de las EMGs no se manifiesta hasta que el paciente alcanza cierta edad y ésta suele ser variable, lo que complica más tanto el diagnóstico clínico como determinar un patrón hereditario. De manera ocasional, mutaciones *de novo* pueden ocurrir dando como resultado un fenotipo patológico. Estas mutaciones *de novo* son causantes de patologías esporádicas y a pesar de que el riesgo de heredar la mutación a futuros miembros de una familia es despreciable puede darse el caso en que el mismo afectado la herede a su descendencia y presenten la misma condición.

Debido a lo anterior es que al tratarse de las EMGs es menester una adecuada y clara investigación clínica junto con una descripción completa de los signos y síntomas que han afectado a los miembros de la familia, con el objetivo de poder encontrar el origen de la patología y dar el mejor asesoramiento genético con el objetivo de disminuir o eliminar la patología en una familia. La valoración de la posible recurrencia para aquellas parejas que ya han dado vida a un hijo afectado con una EMG, que han presentado múltiples abortos espontáneos, o para aquellos pacientes que no encuentran un diagnóstico adecuado de su enfermedad, se han apoyado en el creciente uso de herramientas de biología molecular para detectar de manera concisa el gen involucrado en la patología y dar opciones reproductivas o terapéuticas a los afectados (Brinkman R, et al., 2006; Badano JL, Katsanis N., 2002).

Una gran cantidad de EMGs conllevan a una muerte temprana o periodos alargados de sufrimiento tanto para el paciente como su familia. El motivo de ello es que las EMGs afectan genes esenciales. Por definición los genes esenciales son aquellos requeridos por un organismo para complementar un desarrollo embrionario y sobrevivir al nacimiento. Se ha determinado que los genes esenciales pueden tener ciertas mutaciones que pueden ya sea limitar o alterar su función de manera que se permita al individuo sobrevivir; sin embargo, estas mutaciones no-letales en un inicio son patológicas lo que contribuye ampliamente a la presencia de una enfermedad en los humanos. Para identificar de manera precisa los genes asociados a enfermedades humanas, se debe evaluar

la probabilidad de que diferentes genes causen una patología. Por lo anterior se ha postulado que los genes relacionados a enfermedades humanas de manera normal están relacionados a importantes funciones celulares y fisiológicas, por lo que una disrupción de alguna de estas funciones resultaría en un estado patológico. Así este corolario indica que si una mutación afecta a un gen esencial el organismo ya no se desarrollaría embrionariamente y por lo tanto moriría y de manera natural se suprimiría aquella mutación; sin embargo, varias de las mutaciones en genes esenciales relacionadas a EMGs son de carácter hipomórfico mas no nulas; esto quiere decir que la proteína se expresa en una cantidad menor o parcialmente funcional El hipomorfismo genético es una condición de muchas mutaciones registradas tanto en enfermedades complejas como en EMGs que causan una reducción, pero no una total eliminación de la función de la proteína. Si esta mutación hipomórfica sucede en un gen esencial para el desarrollo, un individuo con esta mutación puede sobrevivir, aunque con un fenotipo anormal o patológico; empero, ciertas enfermedades que resultan en la muerte temprana del individuo están relacionadas a severas deleciones en genes esenciales mas no nulidad (Badano JL, Katsanis N., 2002; Hentges EK., 2013).

Aunado a los genes esenciales tenemos los genes mórbidos. Éstos son relacionados a causales de enfermedades en humanos tanto de carácter hereditario como multifactoriales, debido a que se encuentran evolutivamente más conservados que aquellos no-mórbidos, poseen patrones de expresión de proteínas funcionales más grandes y se encuentran ampliamente expresados en un organismo. El problema es que los genes esenciales también poseen estas mismas características llevando a la conclusión que tanto los genes esenciales como mórbidos están íntimamente relacionados. Resulta ser que los productos funcionales tanto de los genes esenciales como genes mórbidos poseen extensas e intrincadas redes de interacción proteica y la ausencia de alguno de ellos desde un inicio se relaciona a una patología, lo que sugiere que existe un *espectro* de interacción entre ambos grupos de genes y dependiendo del contexto patológico los genes esenciales pueden verse como mórbidos o viceversa. Así pues las afecciones causadas por las mutaciones relacionadas a EMGs pueden ser en ambos grupos de genes; sin embargo, en este contexto hereditario las mutaciones dominantes dañan secuencias de proteínas funcionales más conservadas e insustituibles que en comparación con las recesivas (Hentges EK., 2013; Stankiewicz P, Lupski J., 2002).

2.1.2.1.- Tratamientos disponibles para EMGs

Los desórdenes genéticos y en particular las EMGs son causadas por una mutación específica o serie de mutaciones en un solo gen; esta mutación subyacente tiene la particularidad de ser suficiente para causar una disrupción fisiológica importante que conlleva a una condición de salud anormal. Las EMGs pueden estar restringidas a un tejido en específico o ser de carácter multi-sistémico, lo que en consecuencia complica el manejo y tratamiento de cualquier enfermedad dentro de este rubro. La mayoría de las EMGs son intratables y en consecuencia incurables, siendo la única opción viable para mejorar tanto la calidad y esperanza de vida el uso de tratamientos paliativos diseñados para mitigar ciertos síntomas o reducir los problemas consecuentes de la enfermedad.

Por mencionar algunos ejemplos de la problemática anterior podemos traer a discusión a la patología recesiva de fibrosis quística, la cual afecta un canal iónico ampliamente distribuido en las células del sistema respiratorio, hígado, y páncreas. Entre sus manifestaciones clínicas más destacables se encuentra la acumulación anormal de moco espeso en los pulmones por lo que su tratamiento y manejo clínico abarca el uso de mucolíticos inhalados, antibióticos especiales, soluciones hipertónicas, y en ciertos casos se llega a considerar el trasplante de pulmón ponderando el inevitable riesgo al rechazo o infección recurrente (Yung-Wong GK, Chiu AT., 2010; Landfeldt E, et al., 2017).

Otro claro ejemplo son las distrofias musculares. Éstas son un grupo de condiciones médicas crónico-degenerativas, cuya mutación ligada al X resulta en la ausencia de la proteína distrofina lo que causa un desgaste progresivo y poco reversible en los músculos cardíacos, esqueléticos y pulmonares. Este tipo de patologías no son posibles de curar, y su tratamiento se basa en la administración de corticosteroides, medicamentos para mantener el ritmo cardíaco, y en ciertos casos se llega a recomendar una cirugía correctiva de la espalda para evitar la muerte por asfixia causada por una mala posición (Matthews E, et al., 2016).

Para finalizar la ejemplificación, los problemas relacionados a la baja oxigenación de los tejidos, la necrosis aséptica, y crisis agudas de dolor son características clínicas de la anemia falciforme, la cual es causada por una mutación en particular en el gen de la beta-globina y en consecuencia polimeriza a la hemoglobina desoxigenada; su tratamiento básico incluye: antibióticos, analgésicos, e hidroxycarbamida (Yung-Wong GK, Chiu AT., 2010; Stuart MJ, Nagel RL.,

2004). Existen casos de EMGs en donde la enfermedad puede ser parcialmente revertida, tanto por medio de la administración de la proteína afectada o el producto faltante de un desorden de síntesis, como suele suceder en los problemas de coagulación, ciertas formas de pancreatitis crónica, o defectos congénitos de la síntesis de ácidos biliares (Richard I., 2005; Forsmark CE.,2013).

Históricamente hablando, el tratamiento y manejo de EMGs ha evolucionado desde el primer reporte exitoso del control de fenilcetonuria mediante la eliminación del aminoácido causal de la dieta diaria. Se considera que los errores innatos del metabolismo comprenden más de 550 diferentes enfermedades y la fenilcetonuria pertenece a esta particular familia, la cual es causada por una deficiencia enzimática específica con un consecuente fenotipo clínico-metabólico característico (Fagioli S, et al., 2013; Leonard JV., 2006). Estas condiciones médicas dan lugar a una intoxicación aguda o crónica debido a la acumulación de moléculas complejas o pequeñas con un daño tisular sistémico o específico; sin embargo, permanecen asintomáticas hasta que el umbral fisiológicamente aceptable de las moléculas es alcanzado o sobrepasado lo que puede tomar días o años en suceder, por lo que las primeras manifestaciones clínicas pueden ser en la infancia temprana o adultez.

La mayoría de estos desórdenes son tratables, si se diagnostican a tiempo, mediante el uso de la denominada terapia nutricional en combinación con medicamentos depurantes, procedimientos extracorpóreos, o vitaminas (Saudubray JM, Walter JH., 2006) lo que en consecuencia revierte el estado clínico del paciente y le permite un desarrollo normal. La combinación de una prescripción dietética en combinación con ciertos fármacos permite al paciente recuperar un poco de la salud perdida, sin embargo, no todos los pacientes responden de manera satisfactoria al tratamiento (Weatherall DJ., 2003; Gropman AL., 2012). En los casos donde una enzima se encuentra dañada en mitocondrias, lisosomas, o peroxisomas se puede llegar a pensar que un reemplazo enzimático sería una opción viable, no obstante, las terapias de reemplazo enzimático sólo están disponibles para ciertas enfermedades lisosomales, lo que encadena al paciente a una infusión periódica de la enzima requerida por el resto de su vida. A pesar de recibir la terapia de reemplazo enzimático, la efectividad a largo plazo no es clara y se ha relacionado con el empobrecimiento de la calidad de vida del paciente, debido a la incapacidad de la enzima de atravesar la barrera hemato-encefálica y con ello aminorar los daños neurológicos (Aronovich EL, Hackett PB., 2015). Más recientemente algunos tratamientos para EMGs han venido de la reutilización de ciertos fármacos, e.j., la nitrisona y la combinación de gemfibrozil con ATRA para el

tratamiento para alcaptonuria y lipofuscinosis ceroida tardía infantil (LINCL) respectivamente; a pesar de haber demostrado en modelos animales y líneas celulares una efectividad clara en la remisión parcial de la enfermedad, estos fármacos sólo pueden ser empleados para su tratamiento primeramente indicado y no para otro designado *a posteriori* (Bloom BE., 2016).

Para acelerar el desarrollo de terapias más novedosas y específicas para la mayoría de las EMGs, y cuya causante genética es más que conocida, la terapia génica fue y es una opción viable y razonable para su tratamiento; no obstante, la terapia génica sólo es viable cuando el paciente se encuentra afectado en un tejido en particular o enzima específica. El objetivo principal de la terapia génica es reemplazar al “gen dañado” con una copia funcional del mismo mediante tres componentes principales: el gen terapéutico, el vector y el modo de administración, lo que designará en conjunto el éxito o fracaso de la terapia (Boudes PF., 2014). A pesar de que grandes avances se han realizado en este campo, el gen terapéutico debe ser apropiado para sustituir la mutación deseada y en algunos casos requiere de promotores específicos y/o reguladores para asegurar una precisa regulación espacio-temporal de la expresión génica (Jazwa A, et al., 2013). Por otro lado, la seguridad es el principal problema tanto para el gen terapéutico como para la vía de administración, lo cual varía dependiendo del tejido.

Los primeros intentos de integrar genes terapéuticos a un paciente fueron realizados en “desórdenes monogénicos de la sangre” en virtud de la sencillez con la cual es posible obtener el tejido, la posibilidad de modificación ex-vivo, y la consecuente re-administración al cuerpo del paciente (Boudes PF., 2014). En 1990, la FDA aprobó el primer ensayo clínico relacionado a terapia génica para la enfermedad denominada “deficiencia de la adenosina deaminasa” (ADA-SCID), pero los resultados obtenidos no fueron concluyentes del todo, debido a la administración simultánea de la terapia de reemplazo enzimático “polietilenglicol adenosina deaminasa” (PEG-ADA). A pesar de los dudosos resultados del primer ensayo clínico, se diseñaron y sometieron a escrutinio de la FDA otros ensayos clínicos para EMGs como: hipercolesterolemia familiar, distrofia muscular de Duchenne, y fibrosis quística (Boudes PF., 2014). En el año de 1995, esta floreciente rama de la investigación biomédica recibió un fuerte revés con la muerte del paciente Jesse Gelsinger, quien sufría de una deficiencia parcial de la enzima ornitina transcarbamilasa. Él murió cuatro días después de la administración del vector adenoviral empleado, en consecuencia, de una falla sistémica relacionada a una respuesta inmune exacerbada. (Wirth T, et al., 2013; Osorio JH., 2011).

Actualmente muchos de los obstáculos para lograr una eficiente y efectiva terapia génica han sido sorteados de manera exitosa, lo que ha logrado hacer un “boom” en la investigación dentro de esta área. Los ensayos clínicos para EMGs son la segunda área en importancia para la terapia génica, con poco más de 250 protocolos dados de alta a la fecha; problemas hematopoyéticos, degeneración ocular, desórdenes de la coagulación, problemas hepáticos, enfermedades del sistema nervioso central, y distrofias musculares son importantes objetivos bajo desarrollo estando la mayoría en fase I o II de desarrollo (Wiley and Sons.,2017). A pesar de los esfuerzos realizados a la fecha solo se ha aprobado y comercializado un solo biofármaco basado en terapia génica *in vivo* para la EMG llamada deficiencia de lipoproteínlipasa. El biofármaco, de nombre Glybera ® (alipogene tiparovec) solo ha sido empleado una sola vez debido a dos retractoros: el precio de un millón de euros y la negativa del gobierno alemán a permitir su uso. Aunque se han realizado múltiples avances en el campo de las EMGs, sólo unas pocas tienen un tratamiento disponible en el mercado, siendo la razón de esto los genes involucrados, como afectos estos al paciente y la factibilidad de “liberar” la terapia de manera adecuada en el tejido o tejidos afectados.

2.1.3.- Enfermedades genéticas multifactoriales

Las enfermedades genéticas multifactoriales son patologías que se presentan en más de un miembro de la familia, pero no sigue un patrón de herencia clásico o mendeliano. Se ha propuesto que son originadas por una serie de interacciones entre grupos de genes (carácter poligénico) con una mayor predisposición a ser afectados por factores ambientales o modos de vida. Así pues, es complicado conocer con exactitud qué fue lo que ocasionó el daño y muchas de las veces es solo posible conocer la presencia de una enfermedad hasta que ya se encuentra establecida. Por citar un ejemplo, la malformación congénita conocida como gastrosquisis se presenta en embriones de mujeres jóvenes que fuman y beben cantidades moderadas de alcohol durante su primer y segundo trimestre del embarazo dañando (de manera aún desconocida) un grupo de genes que se expresa abundantemente en la zona abdominal relacionados a la producción de proteínas de anclaje a la matriz extracelular y colágeno. En el caso de los adultos, los diferentes tipos de cánceres, diabetes tipo II, e incluso esquizofrenia engloban múltiples genes relacionados que el efecto final de la enfermedad: avance, opciones de tratamiento y pronóstico de vida, lo que complica grandemente las opciones disponibles para mejorar la calidad de vida del paciente (Henteges EK., 2013; Lam WWK, Mueller RF., 2002).

2.2.- Enfermedades huérfanas, raras, y olvidadas en un contexto monogénico

Las enfermedades huérfanas, raras o también llamadas olvidadas (EHRs), son un amplio grupo de patologías que afectan a 1 individuo de cada 2,000 pacientes. De manera general se ha empleado el término de huérfano, rara, u olvidada para denominar a todo el conjunto; y a pesar de estar ligeramente en lo correcto existen ciertas diferencias en cuanto a su terminología. Podemos ver a este grupo de patologías como un set de *matrushkas*, en dónde la primer y más grande *matrushka* corresponde a todas las enfermedades raras que tengan la tasa de prevalencia ya descrita y poseen un tratamiento farmacológico, las enfermedades huérfanas serían la segunda muñeca en dónde la baja prevalencia se mantiene mas no existe un tratamiento aprobado por la FDA o EMA pero están bajo investigación constante; y finalmente las olvidadas serían la última y más pequeña muñequita que tiene una baja prevalencia mas no están bajo desarrollo farmacológico importante por parte de la industria o universidades.

Las EHRs se clasifican por área terapéutica en: infecciosas, neurológicas, alimentarias-metabólicas, cáncer, hematológicas, inmunológicas, musculoesqueléticas, cardiovasculares, respiratorias, dermatológicas, hormonales, y genitourinarias. En total existen entre 5,000 a 8,000 patologías con diferente etiología lo que fácilmente explica el problema de desarrollar un tratamiento para cada una. A pesar de la posibilidad de diferentes etiologías la mayoría recaen en el carácter genético ya sea poligénico o monogénico, dónde éstas abarcan por lo menos más de 4,500 diferentes patologías donde aproximadamente 4,100 carecen de un tratamiento adecuado (Stephens J, Blazynski C., 2014).

Lo que dificulta enormemente los esfuerzos para poder desarrollar un tratamiento adecuado para los pacientes afectados es la idiosincrasia de las enfermedades monogénicas. De acuerdo al repositorio OMIM las enfermedades monogénicas, tanto huérfanas, raras y olvidadas, comprenden aproximadamente poco más de 1,500 genes lo que corresponde al 6% de los estimados 25,000 unidades transcripcionales codificantes de proteínas, más otras 1,000 patologías monogénicas cuyas bases moleculares no se han entendido del todo. Recientemente se ha sugerido que existen cerca de 3,000 “genes humanos como blanco farmacológico”, donde estos genes están relacionados al intercambio de moléculas pequeñas en la célula o cierta actividad enzimática específica. Proteínas relacionadas a la unión de nucleótidos de adenina, cinasas, fosfotransferasas, canales iónicos, receptores acoplados a proteína G, ligantes de calcio, endopeptidasas, peptidasas con actividad tipo serina, hidrolasas, ligantes de metal en transición, y receptores

transmembranales con actividad de cinasa, han sido relacionadas a patologías monogénicas; sin embargo únicamente 368 genes relacionados a estas patologías pueden ser candidatos para un tratamiento farmacológico, dejando a las demás sin opción alguna (Brinkman R, Dubé MP, Rouleau GA., 2006; Antonarakis SE, Beckmann JS., 2006).

Para acelerar el proceso de creación y aprobación de nuevos medicamentos para EHRs, cada país interesado ofrece ciertas concesiones a la industria farmacéutica y biofarmacéutica para el desarrollo de tratamientos clave. Estas concesiones son muy variadas, pero de manera general incluye el financiamiento económico para el proyecto, equipo de laboratorio, descuentos en los trámites y gestiones gubernamentales, exclusividad de mercado por lapsos definidos en cada país, y permisos de patente por 10 a 15 años, entre lo más destacable. De acuerdo a cifras oficiales gracias a la constante inversión por parte de los diferentes gobiernos la industria farmacéutica ha presentado un crecimiento como nunca antes visto en cuanto al desarrollo de nuevas moléculas y terapias específicas beneficiando a una población cada vez mayor de pacientes. Gracias a lo anterior actualmente existe un repertorio de 43 medicamentos para EMGs raras relacionadas a la necesidad de un reemplazo enzimático, siendo éstas la más solicitadas por los diferentes hospitales (Stephens J, Blazynski C., 2014) De esta manera cada país puede invertir y disponer de los medicamentos necesarios para las patologías monogénicas que lo requieran en base a las estadísticas nacionales de salud.

A pesar de los fuertes gastos de inversión por parte del sector gobernación no se ha podido solucionar el tiempo de investigación, desarrollo, acondicionamiento, y farmacovigilancia de un nuevo medicamento por lo que el tiempo de espera para poder ser liberado al mercado puede llegar a ser hasta de 15 años. Las agencias regulatorias más importantes de medicamentos y productos biológicos como la FDA, EMA o CFDA, han establecido criterios muy estrictos para aceptar o negar el permiso de producción, venta, o distribución de medicamentos con el propósito de brindar a los pacientes un producto seguro. Por lo anterior y en aras de disminuir el tiempo de espera entre investigación-mercadeo se ha optado por cambiar ligeramente la estructura primaria de un fármaco ya disponible para que tenga efecto sobre una EMG. Al hacer esto ya se tiene una base de partida sólida de qué camino tomar para evaluar el fármaco y al ya no entrar como “medicamento novedoso” sino como “modificado/adaptado” el tiempo de seguimiento y liberación al mercado es menor. Sin embargo, hasta la fecha no se ha autorizado el uso de ningún medicamento modificado para otro uso que no sea el inicial, debido a que estas adaptaciones han demostrado problemas en

modelos animales, lo que ha llevado a no poder probar la seguridad y viabilidad de los mismos (Bloom BE., 2016; Phillips MI., 2013).

A través de los años la investigación relacionada a las EMGs y su tratamiento ha presentado avances pausados. El poder develar las diferentes mutaciones que puede contener un gen y relacionarlas a un mecanismo de patogenicidad que se exprese en un fenotipo no ha sido fácil, pues existen mutaciones que al recrearlas en modelos animales no tienen el mismo daño que se vería en un humano o mutaciones que en un inicio pasaron por obvias por lo que no se tomaron en cuenta y al continuar investigando la relación patológica se obtiene un resultado positivo pero no completamente patológico (Henteges EK., 2013). Gracias a la constante investigación se ha podido comprender que las EMGs son más complejas de lo que se había propuesto en un inicio debido a la amplia red de interacción proteína-proteína que muchas de ellas presentan. Con los avances en las ciencias “ómicas” se ha logrado analizar y cartografiar las regiones que presentan una mayor tasa de mutagenicidad para mejorar el diagnóstico, así mismo los modelos matemáticos de predicción y análisis de posibles elementos genómicos funcionales e interacción proteína-proteína han abierto el camino a nuevos blancos moleculares para mejorar el tratamiento en un futuro cercano.

2.3.- Regulaciones internacionales para el desarrollo de medicamentos para EMGs

Como se ha mencionado, las EMGs son un grupo de condiciones médicas que amenazan de manera crónica la vida del paciente mediante un debilitamiento generalizado, complicaciones fisiológicas diversas y culmina con la muerte temprana del mismo (Michael M, Tuomi M., 2012). Las EMGs tienen una baja prevalencia a nivel mundial; sin embargo, se ha estimado que la tasa global de muertes relacionadas a las mismas es de \sim 350 millones de personas y son responsables del 35% de las muertes en la infancia dentro del primer año de vida (Fagnan DE, et al., 2015; The Global Genes Project, 2017). Debido a la baja prevalencia, raras en población general, y las complicaciones relacionadas al desarrollo de terapias adecuadas muchas de ellas se encuentran sin tratamiento disponible o “huérfanas”.

Las EMGs se han catalogado recientemente con este nombre, sin embargo, ya eran conocidas a principios del siglo XX. En 1901, el Dr. Archibald Garrod identificó a la -alcaptonuria- como la primera enfermedad de origen genético, y 7 años más tarde en su “Croonian Lectures” se refirió al albinismo, alcaptonuria, cistinuria, y pentosuria como “errores innatos del metabolismo”

(EIM) y así mismo las calificó de raras en la población inglesa del siglo XX (Porteus MH., 2015). En la actualidad, el Comité de Expertos en Enfermedades Raras de la Unión Europea (EUCERD) ha clasificado a las EHRs en seis categorías: genéticas, cánceres raros, malformaciones congénitas, padecimientos autoinmunes, e infecciosas y tóxicas. A la fecha, las ciencias biomédicas han identificado más de 6,000 EHRs, de las cuáles más de 4,000 se consideran como EMGs, que a pesar de su baja prevalencia en EUA viven un aproximado de 25 a 30 millones de pacientes diagnosticados y sin diagnosticar; mientras que en la UE se estima una cifra de 27 a 36 millones de pacientes, lo que corresponde al 68% de la población europea del año 2014 (EUCERD, 2014; Fagnan DE, et al., 2015).

Para prevenir más muertes relacionadas a EMGs y EHRs el congreso de los EUA promulgó en 1983 el Acta de Medicamentos Huérfanos (AMH), el cual provee de ciertos insumos económicos de recursos públicos y una vía rápida a la aprobación de un fármaco diseñado para una EHR en específico. Desde la aprobación del AMH, con datos ofrecidos por la FDA, se han aprobado y comercializado 579 terapias para EHRs, incluyendo para EMGs, (Fagnan DE, et al., 2015; FDA, 2013). Antes de 1983, las terapias disponibles para EHRs eran sólo 10, siendo que en poco más de 33 años las industrias farmacéuticas y biotecnológicas han desarrollado 569 nuevas terapias, lo que puede deducirse en 17 nuevos medicamentos aprobados y comercializados cada año. En el año 2000, el Parlamento Europeo aprobó la regulación (EC) No. 141/2000, también conocida como la Regulación Huérfana (RgH), la cual se basa en la AMH de los EUA. La RgH asegura un fondo económico de incentivos al sector privado y una aprobación rápida de los medicamentos huérfanos disponibles, siendo que los países pertenecientes de la UE disponen de 117 medicamentos huérfanos (European Commission, 2015).

Para tener acceso a los incentivos ofrecidos por ambas regulaciones, las empresas farmacéuticas y biotecnológicas deben probar que su producto en desarrollo corresponde a una EHR o EMG. Sin embargo, no hay en el sentido estricto de la palabra una definición para considerar a una patología como EHR, en vez de ello, se basa esta designación en la prevalencia estadística de la misma. Cabe denotar que, la prevalencia de una enfermedad es cambiante entre países y regiones económicas; en los EUA una EHR afecta a menos de 200,000 pacientes (Fagnan DE, et al., 2015; O'Neil DA., 2014), mientras que la UE define a las EHRs a aquellas que afectan a menos de 5 pacientes de cada 100,000 (EUCERD., 2014). Si bien, estas regulaciones han impulsado el desarrollo de nuevas y mejores moléculas terapéuticas, sólo ha sido en ciertas áreas y para ciertas enfermedades; siendo la gran mayoría tratamientos contra algún tipo de cáncer, seguido por

enfermedades infecciosas, y neurológicas (Michael M, Tuomi M., 2012). Se ha calculado que cada una de las enfermedades que corresponden a alguno de los grupos mencionados -ver línea superior- tienen más de 20 medicamentos en fase de desarrollo, dejando sin atender a más del 95% de las enfermedades (Stephens J, Blazynski C.,2014). Por lo tanto, debido a esta definición tan amplia, enfermedades que anteriormente eran consideradas como “normales” en países en vía de desarrollo son consideradas “raras” en los países desarrollados. Ejemplo de ello son los medicamentos contra la malaria y tuberculosis, que tienen cada uno de ellos 78 y 88 nuevos medicamentos, respectivamente, en vía de desarrollo. En países de América Latina o África Central son comunes en la población general (OMS., 2017) pero en países europeos ó de américa del norte (entendiéndose como Canadá y EUA) son casos aislados que requieren del desarrollo de un nuevo fármaco o biofármaco.

El problema para desarrollar fármacos o biofármacos nuevos se agrava más al referirse a las más de 4,000 EMGs. Esto subyace en la idiosincrasia de cada una de ellas, que las hace viables para un tratamiento adecuado ó simplemente se delegan a incurables. El entendimiento adecuado de las bases genéticas y su relación con el fenotipo del paciente afectado, en conjunto con un diagnóstico correcto deben tomarse en consideración, debido al alto grado de pleiotropismo o características específicas de cada EMG (Brinkman R, et al., 2006). Además de los problemas ya mencionados cabe añadir el pequeño mercado de individuos afectados por una EMG y la falta de ganancias inmediatas, lo anterior representa serios obstáculos para la industria farmacéutica, haciendo que el desarrollo de tratamientos nuevos sea exiguu. Un problema que se suscitó recientemente, fue el término de las exclusividades de ventas y liberación de las patentes para cierto grupo de fármacos considerados como huérfanos, a este fenómeno se le llamó “*blockbuster bubble burst*”, lo que significó una agresiva competencia de medicamentos genéricos en el mercado. Al verse en esos aprietos las farmacéuticas apuntaron al mercado de las EMGs, debido a los incentivos fiscales ofrecidos por los países y la cantidad limitada de medicamentos disponibles a la venta (Stephens J, Blazynski C., 2014). Sin embargo, a pesar del bajo volumen de ventas los precios son altos. Los medicamentos disponibles para EMGs son pocos y su investigación y desarrollo (I&D) toma mucho más tiempo que para un fármaco “común”, por lo que las farmacéuticas pueden poner libremente el precio a la venta, e.g. Soliris (Alexion Pharmaceuticals) tiene un costo de \$440,000 dólares paciente/año y funciona como tratamiento para la Hemoglobinuria nocturna paroxísitca o Síndrome de Marchiafava-Micheli; Elaprase (Shire) \$375,000 dólares paciente/año para el tratamiento del Síndrome de Hunter; Cerezyme (Genzyme) \$300,000 dólares paciente/año para el tratamiento de

la Enfermedad de Gaucher tipo I. La industria de las EMGs reporta una ganancia neta sobre el margen del 80% de la inversión total y un crecimiento anual del 5.7% basado en un estimado del mercado de \$100 billones de dólares (Phillips MI., 2013). Con estos números, más farmacéuticas, tanto grandes y pequeñas, buscan tomar ventaja de las iniciativas gubernamentales sobre incentivos fiscales y financiamiento para llevar a cabo la investigación ya que dicho financiamiento es dinero a pérdida otorgado por el gobierno, ya que solo un pequeño porcentaje de los medicamentos desarrollados llega al mercado, y esto es dependiente de las legislaciones imperantes en el país (Michael M, Tuomi M., 2012).

En la actualidad existen opiniones encontradas en cuanto a la viabilidad económica e impacto científico-calidad de vida ofrecido por este tipo de medicamentos lo que ha hecho que ciertos gobiernos reduzcan su inversión neta inicial. Se ha alegado que gracias a las inversiones realizadas el tiempo de I&D ha disminuido, que se ha logrado un mayor avance tecnológico en materia farmacéutica, y la complejidad biológica detrás de estas patologías se han ido entendiendo poco a poco; sin embargo, el tiempo de vida ofrecido por estos nuevos medicamentos no excede los 7 años, y de hacerlo, el paciente no presenta una calidad de vida dignificante o mejoría mayúscula (Fagnan DE, et al., 2015; Brinkman R, et al ., 2006; Landfeldt E, et al., 2017).

2.4.- Enfermedades Monogénicas en México

Al buscar información acerca de las diferentes EMGs, o EHRs en México sorprende la falta de resultados obtenidos por medio de cualquier buscador en línea convencional. Si pasamos nuestra búsqueda a los sitios de revistas científicas indexadas el resultado no es mucho mejor, ya que solo se muestran pocos artículos y el lapso entre publicaciones es muy amplio.

Pocos han sido los investigadores clínicos que han publicado sus resultados epidemiológicos, sin embargo, en la mayoría de los casos los datos publicados únicamente abarcan un hospital o si la enfermedad que se desea buscar está dentro de los objetivos de publicación del investigador principal. Los hospitales que reciben una mayor afluencia de pacientes son los pediátricos, con cerca de 7,000 revisiones anuales, mas, al indagar en los expedientes clínicos únicamente el 3.4% de los pacientes remitidos al hospital presentan una EMG. Lo anterior se repite en otras instituciones de salud en donde aproximadamente el 1.5% de todos los casos remitidos en un periodo de dos años son debidos a etiología de carácter monogénico; sin embargo, los datos

obtenidos cambian entre padecimiento y padecimiento y hospitales dependiendo su especialidad (Alonso ME, Gómez L, Otero E, Figueroa HH., 1989; Carnevale A, Hernández M, Reyes R, et al., 1985).

Esta baja prevalencia es común para este grupo de enfermedades y no sólo en México. Con el objetivo de ofrecer una mejor atención a los pacientes y familias afectadas por EMGs, involucrando también a las EHRs, diferentes gobiernos como el de EUA, Canadá, o la Unión Europea, han creado instancias de apoyo, tanto económico como psicológico, para ellos. Así mismo a estas dependencias llevan a cabo de manera independiente una contabilización y expresión de datos epidemiológicos para diferentes tipos de EMGs, pero más importante la distribución de medicamentos (European Commission., 2015).

Actualmente México no cuenta con un registro adecuado de los pacientes y respectivos familiares afectados por una patología de carácter monogénico, y de hecho estas patologías no figuran dentro de ninguna estadística nacional de salud como causantes de muerte prematura en infantes o en adultos. Debido a lo anterior y en la necesidad de hacer público los requerimientos especiales de vida para estos pacientes se fundaron diferentes organizaciones no gubernamentales (ONGs) que brindan apoyo a los pacientes y sus familiares. La mayor de todas estas ONGs se llama Federación Mexicana de Enfermedades Raras (FEMEXER) la cual cobija a más de 150 diferentes organizaciones que buscan una mejor calidad de vida para sus pacientes. Parte de las acciones tomadas por FEMEXER en el ámbito político al “concientizar” a una senadora por el Estado de Veracruz sobre la necesidad de crear un Registro Nacional de Enfermedades Raras, en dónde se contabilizará y se diera seguimiento a los pacientes y familiares; empero, sólo ha sido un conato de propuesta de legislación en la cámara baja del Estado de Veracruz de la cual no se ha sabido más (FEMEXER., 2017).

Otro grave problema al que se enfrentan varios médicos genetistas y pediatras en nuestro país ha sido el correcto diagnóstico de una patología. El esquema nacional de salud es deficiente, debido a que una consulta de primera vez de genética o pediatría toma aproximadamente 25 minutos, durante los cuales el médico debe revisar toda una serie de datos clínicos y reportes para lograr un diagnóstico y decidir si el paciente debe ser internado, se requieren de nuevos estudios o simplemente se reagenda una consulta de seguimiento, la cual dura 15 minutos. Uno de los mayores problemas al que se enfrentan los pacientes y sus familiares es el poder acceder a estudios de diagnóstico molecular para ciertas patologías debido al alto costo que éstos engloban, por lo que deben acudir a centros de diagnóstico especializado de carácter privado.

La manera más común de combatir a las EMGs en México es por medio del apoyo farmacológico para el paciente. Actualmente en el mundo están disponibles más de 400 medicamentos para el tratamiento de EMGs de los cuáles menos de 150 están disponibles en nuestro país. Solo una parte de ellos están cubiertos por el cuadro básico de medicamentos, siendo la mayor parte de éstos para enfermedades relacionadas a mucopolisacaridosis, mientras el resto debe ser comprado por el paciente. La Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios hizo pública su declaración de aumentar la disponibilidad de medicamentos para EMGs; sin embargo, a la fecha no han dado más información al respecto.

Capítulo 3 “Ética”

3.1.- Generalidades sobre la Ética

Dar una definición pragmática de ética y moral es un tanto complejo debido al carácter relativista al cual se encuentran sujetas, haciendo que estos conceptos y su interpretación respectiva cambien a lo largo de la historia. Así pues, las escuelas helénicas tenían una concepción diferente en comparación con el movimiento existencialista o nihilista, empero, la concepción de la mayoría de las escuelas proviene de la palabra griega “*éthos*”.

Éthos se opone a *páthos*, entendiendo a este último como todo lo que se nos ha dado por naturaleza, sin que hubiera un esfuerzo de por medio o una contribución de nuestra parte para obtenerlo. Esto es, todo lo recibido de manera pasiva partiendo de nuestra condición humana; es decir, el resultado de la lotería biológica y lotería social (Ferrer JJ, Álvarez JC., 2003). Al contrario, el *éthos* es la manera activa y dinámica de la persona consciente para esculpirse a sí misma a partir del *páthos* la propia identidad humana. En estos términos, entramos en el reino de la libertad y no de la necesidad o lo “dado y quedado” (*Idem*). Es por ello que la ética en su sentido estrictamente moral es la disposición fundamental de una persona ante la vida, su modo de ser estable ante sus disposiciones, actitudes, virtudes y vicios; esto es, los actos concretos y particulares a través de los cuales la persona realiza su proyecto de vida.

El campo de la ética involucra sistematizar, defender, y hacer recomendaciones sobre los conceptos del actuar correctamente e incorrectamente; así pues es posible entender a la ética como el estudio filosófico del actuar humano, así como sus causas y consecuencias. Por otro lado, la moral

son los usos y costumbres tanto individuales como sociales influenciadas por diferentes aspectos políticos, económicos, religiosos, etcétera. De esta manera la ética evalúa crítica y racionalmente la moral imperante en un individuo o sociedad mediante un desarrollo teórico que busca establecer criterios no absolutos, mas racionales, para dicha evaluación.

La ética para su estudio se divide en tres áreas: metaética, ética normativa, y ética aplicada. El término “meta” significa *después o más allá*. Podemos definir a la metaética como el estudio del origen y significado de los conceptos éticos, por lo que involucra un componente metafísico en donde se plantea la existencia de los valores morales como verdades eternas y no como simples convenciones humanas. Exponentes como Platón, Aristóteles, o Samuel Clarke sostenían que los valores morales son objetivos, y en este sentido, existen en un sentido *espiritual* que va más allá de una subjetiva convención humana. Así mismo sostenían que eran absolutos o eternos, siendo que nunca cambian y pueden ser aplicados a todas las creaturas racionales a través de los tiempos. Otra visión metafísica objetiva consiste en la teoría del mandato divino (voluntarismo), en la cual Dios al ser todo poderoso y crear el mundo físico imprime en el hombre los principios morales que él considera como correctos y los comparte por medio de los 10 mandamientos (Sayre-McCord G., 2007; Fieser J., 2017).

Al contrario, tenemos a los exponentes de la metafísica relativista. En ella se niega el estatus objetivo de los valores; ello no significa que se rechace la existencia de los mismos. Técnicamente el relativismo rechaza el hecho clarividente de los valores morales a manera de “materia espiritual” o de invenciones en la mente de Dios, y argumenta que son estrictamente invenciones humanas debido a que los valores morales cambian drásticamente de sociedad a sociedad en un determinado tiempo histórico y geográfico (Sayre-McCord G., 2014). Es así que el relativismo se explica de una manera individual y otra colectiva-cultural-social. En el relativismo individual cada persona es capaz de crear estándares morales para sí mismo, como Friedrich Nietzsche lo explica con la teoría del superhombre; mientras que el relativismo colectivo-cultural-social se explica a través de una “estandarización” tácita de los mismos en un “contrato social” en palabras de Rousseau.

La segunda área de conocimiento ético es la ética normativa. Ésta involucra el llegar a un acuerdo “estándar” que regule toda conducta humana, ya sea buena o mala. El ejemplo más claro para esta regla es la frase-ley de muchos hogares -*Hacer a los demás lo que nos gustaría que hiciesen con nosotros*-, claro está con sus diferentes versiones. Esta frase establece un solo principio con el cual es posible juzgar toda acción humana, estableciendo como base para su razonamiento al

individuo por si mismo. Una presunción clave en la ética normativa es que solo puede existir un solo criterio de conducta moral, ya sea a manera de una ley o un set de principios. Para llegar a ello se emplean tres estrategias de pensamiento: 1) la teoría de las virtudes, 2) la teoría del deber, y 3) la teoría consecuencialista (Fieser J., 2017).

Históricamente la teoría de la virtud es la primera ética normativa desarrollada por la filosofía occidental. De manera general los eticistas clásicos conciben a la moralidad como una serie de reglas establecidas de conducta y un individuo debe *aprenderlas* para poder vivir de manera plena; sin embargo, en la teoría de la virtud no se hace énfasis en *aprender* estas reglas, más bien lo que se busca es que se desarrollen *buenos hábitos del carácter* (Fieser J., 2017; Balmes J., 1872). Platón enfatiza cuatro virtudes en particular: sabiduría, coraje, templanza y justicia, las cuales conllevan al desarrollo de todas las demás virtudes del ser humano en su vida; mas es necesario mantener una fortaleza ante los vicios del ser humano. Por otro lado, Aristóteles sostenía que las virtudes son buenos hábitos que adquirimos a lo largo de nuestra vida para regular nuestras emociones, el problema es llegar a un equilibrio completo en la sensibilidad del individuo y su forma de actuar (Gutiérrez-Sáenz R., 2006).

La teoría del deber o deontología, del griego *deon=deber*, basa la moralidad en principios fundamentales de obligaciones claras que tenemos como seres humanos. Así mismo son vistas como obligaciones no-consecuencialistas irrespectivamente de sus consecuencias que sigan a nuestra acción dado que todas ellas son de carácter positivo.

Dentro de la teoría del deber encontramos cuatro sub-teorías, cada una con una exponente principal. La primer teoría proviene del filósofo Samuel Pufendorf, en la cual nuestros deberes deben ser para con Dios, para con nosotros y para con los otros; en ésta destacan tres deberes universales que son capaces de unir a las personas a través de un condicionante de mantener nuestra "palabra": evitar dañar a los otros, tratar a los demás como iguales y finalmente promover el bien a otros. La segunda aproximación deontológica se centra en la teoría del derecho al *justo reclamo contra el comportamiento de un tercero*, la cual fue basada en los argumentos de John Locke. Sus disertaciones se basaban en que las *leyes naturales* (otorgadas por Dios y por lo tanto son derechos divinos) nos mandan a no dañar la vida, la salud, la libertad o sus posesiones, lo que en consecuencia correlaciona los derechos y deberes debido a que el derecho de uno implica el deber de otro. La tercer teoría fue desarrollada por Immanuel Kant mediante el imperativo categórico. Kant estaba de acuerdo en que tenemos deberes morales para con nosotros mismos y

con los otros; empero, argumenta la existencia de un principio del deber que comprenda los deberes particulares de uno independientes a nuestros deseos y vicios, destacando el *-trato a los demás a manera de un fin, y nunca como medio a un fin-*. Lo anterior implica tratar a las personas con dignidad y no como mero instrumento. La cuarta y más reciente teoría se le atribuye al filósofo inglés William David Ross. En su disertación él argumenta que nuestros deberes son un parte de la naturaleza fundamental del mismo universo; mas, esta lista de deberes es muy corta y refleja nuestras convicciones morales: fidelidad, gratitud, justicia, beneficencia, auto-mejoramiento, no maleficencia y responsabilidad al daño ocasionado por nosotros mismos hacia otros. A denotar es que él estipula que no existe una escala en estos deberes y son aplicables dependiendo la situación suscitada entre las personas (Ferrer JJ, Álvarez JC., 2003; Gutiérrez-Sáenz R., 2006).

La última teoría relacionada a la ética normativa es la consecuencialista. Ésta se basa en una ponderación a conciencia de nuestras acciones, siendo que la acción moralmente correcta es aquella que su consecuencia, al ser tomada y llevada a cabo, sea más favorable que desfavorable. Los principios normativos consecuencialistas requieren que se analicen a plenitud tanto consecuencias buenas y malas de nuestra acción; en segundo término debemos decidir si el total de nuestras consecuencias buenas tienen más peso que las malas (Ferrer JJ, Álvarez JC., 2003). Este tipo de teoría ética tuvo su auge en el siglo XVIII debido a que se apelaba más al uso de la razón práctica y la experiencia de vida, y no solamente a la iluminación divina o inspiración de fuerzas naturales del universo. Bajo la visión del consecuencialismo existen tres subdivisiones dependientes a la cantidad de personas beneficiadas o afectadas por nuestras acciones. El *egoísmo ético* se centra en la persona que toma la acción y debe beneficiarlo a él y no desfavorecerle. El *altruismo ético* es cuando la acción tomada es más favorable que desfavorable para todos dejando a un lado al individuo causal. Y finalmente el *utilitarismo* es cuando la consecuencia beneficia a todos por igual (Driver J., 2014).

La ética también posee una rama que se centra en sucesos más panorámicos y “actuales” por describirlos de alguna manera. La ética aplicada es la rama que estudia y analiza problemas, controversias y dilemas específicos que poseen dos características importantes. La primera de ellas es que el suceso es controversial en el sentido en que existen grupos a favor y en contra de su aplicación o desarrollo; la segunda característica es que distintivamente son problemas morales que muchas veces se encuentran en el limbo entre prácticas personales y políticas públicas. Muchos de los problemas relacionados a la ética aplicada, sino es que todos, no tienen una salida única y

muchas de las veces las “respuestas” no son del agrado de todos, por lo que se sume en un debate constante basándose en principios normativos tanto consecuencialistas como deontológicos y derechos morales (Dittmer J., 2017). Tanto el *beneficio personal y social* están catalogados como consecuencialistas dado que apelan a acción-consecuencia a un nivel social e individual. Los principios como benevolencia, paternalismo, no-dañar, honestidad, y obediencia a la ley están basados en principios deontológicos hacia terceros; mientras los principios de autonomía, justicia, y el resto de los derechos están basados en valores morales (Fieser J., 2017).

Parte del estudio de la ética aplicada se centra en la ética biomédica o bioética (existiendo autores que argumentan diferencia tajante y otros que argumentan su sinonimia), en dónde sucesos de importancia acontecen en el campo de la biomedicina desde aspectos clínicos como de investigación básica. Así pues, ambos términos pueden entenderse como una amalgama de prácticas, métodos y contenidos relacionados con el impacto de las tecnociencias en la vida y la salud humana. Sin importar cuál sea la aproximación o definición que se desee tomar ambas parten de cuatro principios fundamentales que toda persona, sin importar su ambiente moral (Engelhardt HT., 1995), pueden emplear al ser de utilidad secular: autonomía, no maleficencia, beneficencia, y justicia.

El principio de autonomía versa en cuanto a la independencia que posee un individuo respecto a controles externos y la capacidad de este de obrar de acuerdo con una elección propia. La autonomía se prueba en las opciones escogidas, aunque muchas veces se ve limitada o restringida por múltiples situaciones; sin embargo, no se debe oponer al respeto a la autoridad ni a la obediencia a las normas sociales imperantes, sino más bien exige el tomar la decisión más acorde a nuestra situación, pero respetando las normas de conducta. El segundo principio es no maleficencia, el cual se basa literalmente en no ocasionar un daño intencional, aunque el precepto *daño* es no absoluto ya que se debe considerar el contexto de la acción por tomar o que ya haya sido tomada. El principio de beneficencia alude a los actos de incitación positiva, en los cuales se debe (a merced de nuestras posibilidades) procurar proporcionar un beneficio y utilidad del mismo. Finalmente, el principio formal de justicia alude al trato igualitario, recibiendo de manera proporcional a lo que se es, a lo se merece o tienen “derecho a”. Entrando en materia de lo médico-biológico-legal consiste en el reparto equitativo de cargas y beneficios en el ámbito del bienestar de la salud, evitando la discriminación en el acceso a los recursos sanitarios. Este principio impone límites al de autonomía, ya que pretende que la autonomía de cada individuo no atente a la vida, libertad y demás derechos

básicos de las otras personas. En este principio se entra en el campo de la filosofía social y política; se trata de regular la distribución o la asignación de los recursos limitados, insuficientes para la satisfacción de todas las necesidades y solicitudes. Éste último principio es de los más debatidos en cuanto a la introducción de una nueva tecnología para la salud debido a que en la mayoría de los casos el costo es alto y son pocos los que pueden obtener un beneficio a largo plazo, dejando morir o en condiciones precarias a las personas de escasos recursos (Lolas F., 2001; Ferrer JJ, Álvarez JC., 2003).

3.2.- Ética de la Edición de la Línea Germinal

La evaluación ética de la edición de la línea germinal humana (ELGH) ha sido un tema ampliamente debatido desde mediados de 1950's, pero no fue hasta 1975 que durante la conferencia de Asilomar se llegó a un acuerdo internacional bajo palabra de no emplear ninguna tecnología de modificación genética en la línea germinal con fines terapéuticos (Recurso en línea de la Universidad de Navarra., 2017). Varios de los asistentes consideraron que la ELGH es una barrera que no debe ser cruzada al argumentar que no se tenía disponible una herramienta que permitiera seguridad, eficiencia y eficacia completa, otros argumentaron que la vida del embrión debe ser respetada, y otros más encontraron impedimento en la religión profesada; sin embargo, no se vetó su aplicación futura. Gracias a los constantes avances en la investigación científica las diferentes herramientas de edición genómica han permitido manipular el ADN genómico de diferentes organismos. En años recientes, se llevó a cabo la ELGH en embriones humanos inviables con el objetivo de eliminar de ellos una enfermedad monogénica (Huang J, Canquan Z, Ma W, et al, 2015). El estudio anterior fue diseñado para comprobar la viabilidad de la tecnología de edición genómica CCas y su capacidad de reconocimiento de secuencias patogénicas. Sí bien el anterior cumplió con todos los requerimientos impuestos por el comité de ética de las instituciones participantes, reavivó el debate de que tan deseable es la ELGH.

La ELG humana implica la manipulación y modificación genómica de células cuya finalidad es preservar la especie humana y con ello dar inicio a una nueva vida. Estas células son los espermatozoides, óvulos y el producto de su unión llamado cigoto. La ELG impacta directamente en todas las células que conformarían al nuevo ser, por lo tanto, su línea somática y germinal serían modificadas. De esta manera la modificación inicial sería, teóricamente, heredable, lo que

impactaría indirectamente a su probable descendencia (Araki M, Ishii T., 2014; Ishii T., 2015). Lo que se teme es que la modificación realizada posea un efecto imprevisto inmediato que dañe la vida de la persona o un efecto mediato que dañe a generaciones posteriores. Debido a que la ELG humana puede tanto beneficiar como perjudicar al individuo inicial como a generaciones subsecuentes, su ponderación ética y deseabilidad es debatible.

Actualmente la evaluación ética de la ELG se divide en analizar las causas y consecuencias, tanto beneficiosas como perjudiciales, del éxito y fracaso de su aplicación futura. Es importante mencionar que gran parte de los debates analizados se han basado en especulaciones sustentadas en la ética filosófica y no en hechos y evidencias biológicas.

La ELGH tiene como justificación primera ser empleada como tratamiento opcional contra enfermedades monogénicas. Bajo ésta se han planteado diferentes escenarios en los cuales los individuos nacidos bajo este tipo de procedimientos clínicos experimentarían una mejoría en su calidad de vida y así mismo sus familias, lo que se vería reflejado posteriormente en la sociedad en la cual se desarrollan.

Al tomar un punto de vista consecuencialista, siendo éste el mayormente empleado por los bioeticistas que argumentan los beneficios de la ELG, por medio de la ELGH podemos mejorar la condición humana mediante la eliminación de mutaciones perniciosas. Esto permitiría que personas afectadas con alguna patología monogénica pudiera tener hijos genéticamente relacionados sin la posibilidad de que el prospecto padre o madre dé en herencia su enfermedad. De esta manera, el beneficio se extiende no solo a la descendencia en primera generación sino también a las posteriores. Cabe añadir que este argumento está basado bajo un supuesto en el cual las tecnologías de ELG ya han avanzado hasta el punto en que son completamente seguras y no hay problemas relacionados a su aplicación.

Este argumento consecuencialista al ser analizado bajo los cuatro principios de la bioética argumenta fácilmente la introducción de la ELGH como herramienta terapéutica. Julian Savulescu, uno de los principales bioeticistas del Reino Unido, argumenta que los científicos y la sociedad están moralmente obligados a perseguir la ELGH para combatir las enfermedades monogénicas ya que ello cumple perfectamente con los principios éticos de beneficencia y no-maleficencia, debido a que ofrecería un beneficio directo a una persona y en extensión a su familia y a la sociedad en general. El beneficio obtenido por estas personas es prevenirles de una muerte prematura, principalmente,

y en secundario evitar el sufrimiento de ellos y sus familias lo que trae consigo cierta paz social al saber que la ciencia ha contribuido en gran manera a ello (Gyngell C, et al., 2016). Otra prominente opinión es la James Glover, quien fundamenta su argumentación en una *vida floreciente*, entendiendo a esta como una vida dignificante en la cual las personas como seres pueden desarrollarse completamente alcanzando así su máximo potencial, siendo uno de los principales detractores para alcanzarla las discapacidades y salud precaria de las personas cuya vida depende de portar una enfermedad monogénica (Glover J., 2006). De esta manera, la ELGH ayudaría a estas personas a alcanzar metas más allá de lo que su corta vida les permitirá de estar enfermos. Finalmente, la ELG humana otorga el beneficio de la genotipificación preventiva, al eliminar de manera selectiva genotipos perniciosos en el *pool* genético poblacional ayudando a mejorar la especie humana (Juengst E., 1995). Si bien este último puede ser entendido como eugenesia no debe confundirse como con ella, ya que la ELG humana es con motivos terapéuticos y no de mejora o capricho.

El debate de la ELG en cuanto al principio ético de autonomía normalmente versa en torno a los prospectos padres y el respeto a su libertad de autonomía reproductiva. El principio de autonomía es particularmente importante en materia reproductiva y demanda un nivel de libertad mayor para tomar las decisiones pertinentes de manera proactiva. La libertad reproductiva y la autonomía otorgada a los prospectos padres deben permitirles tener libre opción, dentro de razón, de poder emplear cualquier tipo de ayuda en tecnologías de asistencia reproductiva (TAR). Así mismo existe cierta controversia con el uso de las diferentes TARs dado que la autonomía concedida a los prospectos padres involucra el hecho de que tipo de hijo tener. Claro está, que gracias al constante avance en el conocimiento de genética humana y el desarrollo de mejores TARs se ha logrado que los prospectos padres puedan controlar y decidir la naturaleza de sus hijos. El respeto a la autonomía debe incluir y comprender el hecho de que las ciencias biomédicas pueden mejorar la salud desde la concepción de un nuevo ser y que una concepción artificial no debe ser satanizada (Buchanan A, et al., 2001). Es importante mencionar que gran parte de los avances científicos y sus aplicaciones clínicas han sido detenidos por la opinión pública en especial los relacionados a las diferentes TARs y ahora con la ELG. Wivel y Walters remarcan que varios de los argumentos éticos que se tienen en contra de la ELG humana están fuertemente influenciadas por la moral social subyacente de quienes se oponen, lo que es debido a que en nuestra sociedad pluralista posee un fuerte interés en los derechos individuales (Wivel NA, Walters L., 1993) incluido en ello los embriones a modificar por ELG. Es importante recalcar que en el ámbito ético-legal los padres son

los más apropiados para tomar decisiones en nombre de sus hijos hasta que éstos alcancen la mayoría de edad y con ello formen un juicio razonado. Así mismo, la autonomía de los padres es un factor importante a considerar por ellos mismos ya que, dependiendo las circunstancias, tienen todo que perder o ganar en especial cuando se expone al hijo a situaciones que arriesguen la vida (Ormond KE, Mortlock DP, et al., 2017).

Las objeciones en contra de la aplicación clínica de la ELG humana no son novedosas, de hecho muchas de ellas han sido previamente empleadas y analizadas con cualquier otra tecnología que pudiera ser empleada para modificar la vida humana, por ejemplo se planteó que la técnica de biología molecular PCR pudiera ser empleada para modificarnos *ad vivitum*.

De las primeras objeciones que se plantean es la desfiguración de la identidad personal, ya que existe una relación directa entre nuestro arreglo genómico y nuestra propia percepción de quienes somos y como somos. Algunos bioeticistas argumentan que la remoción de una enfermedad vía ELG o cualquier otra modificación deseada en un individuo altera la concepción individual (Boardman F., 2016; Bourne H, et al., 2012); en otras palabras, el cambiar el genoma vía ELG cambiaría la identidad del futuro ser y esto es considerado como dañino desde un punto de vista filosófico personalista. Por otro lado, uno de los argumentos de mayor peso para prohibir la aplicación e investigación de la ELGH es sobre el consentimiento de las generaciones futuras; ya que se considera como *dañino* el hecho de haber modificado el cuerpo de un futuro ser sin que éste haya consentido (Collins FS., 2015); sin importar que el resultado de la ELGH tenga efectos beneficiosos en la salud de la persona o que en consecuencia genere un daño biológico real. De hecho, el NIH empleó este argumento para prohibir la investigación en ELGH en cualquiera de sus institutos (Ver Collins FS., 2015).

Pragmáticamente es imposible que los embriones y generaciones futuras sean capaces de dar su consentimiento por lo que la ELGH no debería ser considerada como algo negativo para ellos si se busca un beneficio al ser llevada a la práctica. Al ponderar el argumento es fácil notar que carece de significancia moral real ya que solo se basa en un supuesto metafísico-personalista sin aplicación real. Por otro lado, la decisión de llevar a cabo una ELGH recae completamente en los padres y progenitores de las futuras generaciones ya que ellos son quienes deben ver por las necesidades, incluidas una salud y vida dignificantes para el menor; por lo que toda decisión subrogada debe ser tomada considerando un beneficio neto entre todas las opciones disponibles,

asignando juicios de valor a los intereses del futuro menor, riesgos posibles y carga emocional o económica para el mismo (Beauchamp TL, Childress JF., 2013).

Otra de las objeciones en contra de la ELG es en el ámbito de la justicia. Ésta se basa en el argumento de que en un inicio el precio a pagar por tener acceso a la salud promisorio de la ELG sería alto, considerando los precios actuales de las TARs disponibles. Esto da a preocupar a los bioeticistas dado que solo los hijos de familias con altos ingresos podrían tener acceso a la salud, lo que abriría todavía más la amplia brecha de la inequidad salarial vivida por varios países (Smith KR, Chan S, et al., 2012). Como con cualquier nueva tecnología, lo ideal sería que toda la población que lo deseara pudiera acceder al tratamiento para evitar un daño en la salud de sus futuros hijos; empero, el hecho de que existan inequidades substanciales en la distribución de la salud mundial no debería de ser una razón de peso para evitar el desarrollo y aplicación de la ELG humana. Si los nuevos tratamientos no son puestos en práctica clínica entonces jamás se llegaría a ampliar el acceso que podría tener en un momento inicial (Harris J., 2015). Para poder crear justicia distributiva y social es importante recalcar que varias de las instituciones de investigación a nivel global reciben recursos públicos para llevar a cabo sus investigaciones, por lo que al final esa misma cantidad puede ser reinvertida para fomentar seguros gubernamentales que compartan los gastos con los derechohabientes, y así buscar una manera de asegurar un acceso a la salud para todos por igual (Chapman AR, Frankel MS., 2003). Finalmente, uno de los detractores principales en contra del uso de la ELG humana es la eugenesia. La eugenesia hace referencia tanto a la selección de características positivas como remoción de aquellas que son vistas como erróneas. La eugenesia en cualquiera de sus formas es concerniente debido a que pudiera ser empleada como reforzador de prejuicios y acotar la definición de normalidad y deseabilidad. Esto es particularmente verdadero cuando exista, en potencia, realizar *enhancement*, también llamadas potenciaciones o mejoramientos a capricho, que van más allá de aplicaciones clínicas terapéuticas para una enfermedad monogénica. Históricamente, la eugenesia ha sido asociada con nociones exageradas del determinismo genético y aseveraciones pseudocientíficas, que con ayuda de la fuerza del estado resultaron en consecuencias fatídicas en más de una ocasión. Por otro lado, es importante hacer mención que todavía en nuestros días persiste la noción de crear “progenie perfecta” que permitiría a los padres seleccionar y controlar ciertos aspectos biológicos de sus hijos (Carroll D, Charo A., 2015; Ormond KE, Mortlock DP, et al., 2017). Dentro de estas modificaciones *deseables* existen grupos de bioeticistas que argumentan que la ELG sería beneficiosa si se logra alterar el sentido de justicia, responsabilidad o aumentar la moralidad en cada persona (Juengst E, Moseley D., 2016).

Actualmente varias de las discusiones sostenidas sobre la ELG han tomado como base las técnicas de reproducción asistida, las leyes que las han regulado en cada país, precios, y lo más importante el estatuto que adquiere el embrión humano desde su concepción hasta término del embarazo. Ciertas legislaciones conciben al embrión humano como un ser con derechos y garantías constitucionales otorgables desde el momento de su concepción, mientras otras toman al embrión como un conjunto de células que en potencia darán vida a un nuevo ser a los embriones. Parte de este debate tienen sustento en las condiciones históricas y sociales que formaron a un país determinado. (Steinbock B., 2007).

Capítulo 4 “Panorama Internacional sobre la edición de la línea germinal humana”

4.1.- Políticas para la aplicación de la edición de embriones y línea germinal humana en diferentes países

Existen tanto políticas nacionales e internacionales que expresamente regulan la investigación con embriones humanos, así como las intervenciones terapéuticas posibles a realizar en ellos durante alguna etapa de su desarrollo. Los cuadros normativos subyacentes típicamente involucran un amplio espectro ético y de moral social basado esencialmente en los principios de beneficencia y no-maleficencia. La aplicación de la ELG humana como opción terapéutica podría encontrarse legislada o regulada bajo éstas debido a que se involucra la modificación de un estado embrionario primitivo.

Los actuales marcos ético-normativos y su aplicabilidad comparten ciertas similitudes o presentan diferencias principalmente en cuanto a la definición de lo que es la línea germinal, una célula reproductiva o un embrión y su estatuto legal y biológico; por otra parte, éstas mismas cambian en cuanto a la herramienta legal a emplear como puede ser una legislación, regulación, normativa, o ética profesional. Entre las diferentes jurisdicciones, la regulación del embrión humano y/o de la manipulación de la línea germinal puede ser categorizada en prohibitivo, restrictivo, medianamente restrictivo, o permisivo. Cuando una política toma una aproximación restrictiva existe una amplia variedad de prohibiciones a adoptar antes de considerar manipular al embrión o la línea germinal. En contraste, las políticas medianamente restrictivas o permisivas permiten cierto grado de libertad de investigación, aunque con ciertas limitaciones enfocadas a la implantación del embrión modificado (Ormond KE, Mortlock DP, et al., 2017).

A pesar de las diferencias y similitudes entre jurisdicciones existe un conceso internacional que permite la investigación básica con embriones humanos viables creados *expresos* para ésta, siempre que se tenga aprobado el protocolo por parte del comité de ética de la institución o instituciones participantes, así como el consentimiento informado por parte de los donadores. Es de importancia destacar que estos embriones deben ser destruidos antes del décimo cuarto día tras su *creación*, ya que este mismo conceso considera como *embrión vivo* al que desarrolle el tubo neural y por lo tanto se le concede el estatuto de *humano* y ya no de objeto de investigación (Ishii T., 2015).

En países como Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Francia, Alemania, Israel, Holanda y el Reino Unido, han adoptado legislaciones tanto prohibitorias como restrictivas en la investigación y la ELG humana, incluyendo al embrión, que involucran sanciones carcelarias y multas; sin embargo, para que pueda haber un proceso legal en contra de un individuo debe mostrarse la intencionalidad de la *creación* de los embriones y posterior evaluación en corte. Australia, Holanda, y Francia designan que no es posible modificar el genoma de una célula humana, la cual pueda ser empleada para dar continuidad a la especie humana. Lo anterior también hace referencia a cualquier modificación realizada en etapas primitivas embrionarias, cabe añadir, que la legislación australiana prohíbe explícitamente la implantación de un embrión creado para la investigación básica, ya que se considera a este tipo de embriones como *prohibidos e inviábiles* (Isasi R, Kleiderman E, et al., 2016). Usualmente las políticas restrictivas incluyen limitaciones posteriores a la creación del embrión sin importar cuál sea el propósito de esta; gracias a ello Canadá y Alemania han logrado prohibir el uso de ciertas TARs que dañen al embrión. Por otro lado, bajo el tema de prohibición de TARs, ciertas legislaciones pueden resultar ineficientes o inadecuadas en la *praxis* ya que únicamente regulan uno u otro procedimiento o tecnología en particular y al continuar el desarrollo científico, éstas quedan completamente obsoletas (Isasi RM, et al., 2006).

Entre las legislaciones existen políticas prohibitorias que adoptan más un carácter restrictivo. En Bélgica, Alemania y Francia existe la prohibición, tanto tácita como expresa, de no modificar la línea germinal humana o al embrión; sin embargo, es posible obtener un permiso de la corte si se alega la aplicación de la modificación del embrión y la línea germinal humana traerá consigo un beneficio terapéutico requerido para preservar la vida de éste o lograr un embarazo saludable y sin riesgos tanto para la madre gestante como para el embrión. Las prohibiciones son limitadas por las excepciones. Un problema que debe ser resuelto es el sentido amplio y poco

específico con el cual están redactados muchas de las legislaciones, ya que pocas veces éstas se actualizan conforme el lenguaje científico avanza. Las legislaciones que adoptan una aproximación de políticas restrictivas toman una actitud muy estricta y poco favorable para el desarrollo científico, optando por que las cámaras altas de legisladores realicen las regulaciones y leyes en vez que sean elaboradas en conjunto por expertos en la materia (Isasi R, et al., 2016; Gyngell C, et al., 2016; Carroll D, Charo A., 2015).

Las políticas que adoptan una aproximación intermedia son las más frecuentes. De esta manera la aplicación de tecnologías genómicas al embrión y a la línea germinal humana son permitidas mas se encuentran bajo una fuerte monitorización gubernamental, con el objetivo de proveer de mecanismos eficientes y seguros para continuar la investigación científica. Así mismo, esta aproximación no veta a las TARs o su aplicación clínica o alguna tecnología en particular; empero, lo que prohíben es el posterior uso del embrión modificado para llevar a término un embarazo (Isasi R, et al., 2016; Isasi RM, Knoppers BM., 2006 (2)).

Son pocos los países que han adoptado una aproximación permisiva, en aras de promover el progreso científico so creencia de ser un beneficio para la humanidad. Países como el Reino Unido, China, Suecia, o ciertos estados de EUA, permiten una amplia variedad de actividades a realizar en un embrión en desarrollo. Estas legislaciones actúan mediante una evaluación caso por caso para conceder el permiso de investigación a las instituciones y responsables participantes; empero, el permiso queda bajo un riguroso escrutinio gubernamental para dar seguimiento a la investigación realizada (Cavaliere G., 2017). En el Reino Unido o China es posible llevar a cabo investigación básica para posteriormente ser empleada con propósitos reproductivos, es decir, llevar a término un embarazo; a pesar de ello, no se ha llevado a cabo por temas de seguridad y ética profesional (Isasi R, et al., 2016; Ishii T., 2015).

El mayor problema con el cual se enfrentan las legislaciones para ser aplicadas de manera correcta es la gran ambigüedad que se presenta al ser escritas, ya que, sin importar la aproximación legal empleada, se dejan ciertos vacíos legales debido a que las definiciones básicas entre embrión, línea germinal o célula reproductiva no se encuentran actualizadas o ni siquiera mencionadas. Por otro lado, varias legislaciones no hacen distinción entre aplicación terapéutica, reproductiva o investigación básica. Cabe mencionar, que varias de las legislaciones poseen un apartado en contra de la eugenesia; mas el mismo problema se suscita, ya que en muchos casos no se hace una distinción entre las diferentes prácticas eugenésicas. Por lo anterior es de suma importancia

consolidar un adecuado lenguaje entre lo biológico y legal para evitar prácticas perniciosas en algún futuro.

4.2.- ELG humana vía CRISPR/Cas o diagnóstico molecular preventivo como opción para evitar EMGs en la población

Una de las principales características de las EMGs versa en que la mutación causal se encuentra en cada una de las células del paciente, incluyendo sus células germinales, por lo que esta misma puede ser heredada a su descendencia. En la mayoría de los casos las patologías de esta índole involucran daños silentes relacionados a las primeras manifestaciones clínicas o daños crónico-degenerativos presentes desde el desarrollo fetal, los cuales son irremediables. Aunque se encuentren bajo I&D mejores terapias génicas ó biofarmacéuticas, hay EMGs en las cuales se requiere de una intervención terapéutica temprana y cualquiera de las ya mencionadas pudieran no ser suficientes para recuperar la salud perdida debido a su naturaleza innata.

En un inicio, la terapia fetal fue vista como una opción para proveer las herramientas terapéuticas para una amplia variedad de anormalidades congénitas, ya sea por medio de la terapia con células madre o terapia génica; sin embargo ambas requieren de ser inyectadas de manera directa en el tejido afectado para lograr una expresión localizada o ser administradas de manera peritoneal o en la cavidad amniótica. Incluso tras demostrarse en modelos animales mayores que tras la terapia fetal se lograba prevenir el comienzo de enfermedades genéticas heredadas, este procedimiento jamás fue considerado como opción en humanos debido al inherente riesgo de muerte intrauterina como fue demostrado en los modelos estudiados (Pearson EG, Flake AW; 2013). Debido a la condición innata de las EMGs, la terapia debe realizarse en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario, cuando las células no están completamente comprometidas a formar parte de un tejido en específico, y con la “edición” de unas cuantas células todas las venideras expresen en genotipo deseado. Con la llegada de la tecnología CRISPR/Cas lo que se pretendía lograr con la terapia génica ahora se puede realizar de manera más sencilla y efectiva, pero sobre todo con especificidad (Heidari R, et al., 2016).

La simplicidad con la cual CRISPR/Cas permite modificar el genoma eucarionte mediante la introducción deseada de una secuencia de ADN en una posición específica dentro de un gen la ha obligado a convertirse en una opción para la investigación básica (Yamamoto KR, et al., 2015). Esta característica llevó a una serie de investigaciones para pruebas de concepto en modelos de ratones

y primates no-humanos, en donde el gen mutante diseñado *a priori* recuperó su función inicial sin registrar una mutagénesis fuera de lugar. De manera sorprendente el estudio previamente mencionado en primates no-humanos fue realizado con un embrión en primer etapa de desarrollo, en el cual modificaron dos genes en un solo paso (Heidari R, et al., 2016; Niu Y, et al., 2014). Con ventajas a su favor, múltiples líderes de opinión propusieron usar CRISPR/Cas para desarrollar nuevas y más eficientes terapias contra las EMGs mediante la edición de la línea germinal debido al impacto directo sobre todas las células de un organismo por formar (Araki M, Ishii T., 2014). Fue en el mes de abril del 2015 cuando el primer intento de modificar embriones humanos mediante CCas ocurrió. Un grupo de investigación chino dirigidos por el Dr. Huang, modificaron cigotos trinucleares (embriones humanos no viables) para editar el gen responsable de la EMG de β -talasemia. 86 embriones fueron “editados” y como resultado se obtuvieron 71 embriones sobrevivientes con una alta proporción de mutagénesis fuera de lugar tras un análisis de exoma completo (Huang J, et al., 2015), sin embargo no es posible llegar a conclusiones adecuadas relacionadas a la factibilidad y seguridad de la edición genómica de la línea germinal humana (Baumann M., 2016).

La investigación previamente mencionada encendió un debate público y científico sobre las implicaciones éticas de la modificación genómica de la línea germinal, mucho de lo cual consistió en las metas y objetivos del procedimiento, pero más importante el posible resurgimiento de la eugenesia (Pollack R., 2015; Scharenberg AM, et al., 2016). La eugenesia solo forma parte de los problemas que rodean la edición germinal genómica con CCas; seguridad del procedimiento, eficacia, problemas económicos, dificultades técnicas en la aplicación clínica, el acceso justo para la mayor parte de la población, mejoramiento del neonato, y marcos regulatorios nacionales e internacionales, entre otros, son sus principales detractores (Evitt NH, et al., 2015; Baumann, 2016; Motoko & Ishii, 2014; Ishii., 2015). Esto conllevó a una moratoria internacional en el cual los investigadores de diferentes áreas llamaron a una prohibición total de la edición genómica de la línea germinal, inclusive si esta misma tiene como objetivo una EMG (Miller HI., 2015). A pesar de los inconvenientes ya mencionados, países como Suecia, China, y el Reino Unido han aprobado la experimentación biomédica básica que involucra embriones humanos y su modificación vía CCas puede realizarse si el embrión es destruido antes de los 14 días posteriores a su creación (Callaway E., 2016).

El Comité Internacional de Bioética de la UNESCO ha declarado que las modificaciones genéticas realizadas en humanos pueden ser únicamente para propósitos de prevención,

tratamiento o diagnóstico; sin embargo dichas modificaciones no pueden ser heredadas a las siguientes generaciones (Heidari R, et al., 2016). Sabiendo que la aplicación biomédica de esta novedosa terapia puede cambiar el efecto de las EMG, la anterior declaración del comité está limitando tanto las opciones terapéuticas disponibles como negando la salud a las generaciones futuras, debido a que no todas las EMGs pueden ser tratadas vía terapia génica o celular. Un punto clave de la discusión es para cuales EMGs y circunstancias especiales las personas tendrían acceso a CRISPR/Cas para la edición genómica de la línea germinal; así mismo, es importante determinar si el acceso a la misma tecnología será por un sistema de salud público o privado, debido a la impracticabilidad de destinar recursos sin un análisis socio-económico y costo-beneficio debidamente ponderado si lo que se busca es su implementación real en un sistema de salud.

Aquellas condiciones que carecen de un tratamiento aprobado o ineficiente comprenden graves daños multi-sistémicos, o requieren de tratamientos en exceso caros por el resto de la vida del paciente son claros objetivos para CRISPR/Cas. Como ejemplos es posible citar patologías como: el síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford, Neuropatía de Axones Gigantes, Epidermolisis Ampollosa, Ictiosis Arlequín, y todos los errores innatos del metabolismo, quienes comparten una o todas las características ya mencionadas al inicio de este párrafo (Gorell E, et al., 2014; Kamate M, et al., 2014; Gonzalo S, et al., 2017).

Ha sido propuesto y asumido que las clínicas de fertilidad (CsF) serán las primeras en ofrecer tal servicio al público, en caso de que CCas sea aceptado en un modelo de salud (Evitt NH, et al., 2015; Baumann M., 2016), pero esto no significa que el problema de las EMGs mejore notablemente. Las parejas que buscan la ayuda en las CsF es debido a problemas al concebir, el nacimiento de un bebé con una EMG, serie de abortos previos, conocimiento de la historia familiar, o en el mejor de los casos uno de los progenitores conoce en primera instancia que es portador sano de la enfermedad o inclusive la padece. Aunque la prevención de EMGs es posible, existen pocos métodos y procedimientos para poder realizarlo en la clínica, e.g. diagnóstico genético preimplantacional (DGP), asesoramiento genético, y diagnóstico prenatal. Sin embargo, aquellos métodos y procedimientos son destinados solamente con un propósito de diagnóstico más no “curan” o tratan la condición encontrada en el embrión o feto, por lo que la decisión de continuar el embarazo o terminarlo recae en los progenitores, lo que abre un debate ético y problemas psico-emocionales en la familia. Para reducir la incidencia de las EMGs en las familias un adecuado diagnóstico genético debe ser considerado por los futuros padres y es por medio del DGP que es

posible seleccionar y eliminar los embriones enfermos que poseen ya sea una enfermedad autosómica dominante o recesiva, e implantar únicamente los sanos; empero, este método está limitado a diagnosticar la misma enfermedad que uno o ambos progenitores tiene mediante diferentes herramientas de biología molecular (Lander ES., 2015; Baumann M., 2016; Ishii T., 2015).

El objetivo final tanto de CCas y DGP es reducir la incidencia de las EMGs, una por medio de la “edición de genes” y la otra vía “selección de embriones sanos”, aunque un primer paso más prudente antes de ofrecer cualquiera de ambos métodos es prevenir y concientizar a los progenitores si uno o ambos son portadores de alguna EMG y el patrón de herencia ligado a esta, debido a que se ha estimado que el 90% de los individuos dentro de una población son portadores sanos de al menos una EMG recesiva y entre dos a cuatro variantes de la misma condición (Krier J, et al., 2016). Uno pudiera argumentar que la posibilidad de que ambos padres presenten la misma mutación en la línea germinal dentro del mismo alelo y *loci* para una enfermedad autosómica recesiva son prácticamente cero y aun así sucede, incluso aunque no haya una relación de consanguinidad entre ambos. Cabe añadir las mutaciones en la línea germinal a lo largo de la vida de los progenitores, siendo siete veces más alta la tasa de mutaciones en hombres que en mujeres, dando lugar tanto a mutaciones *de novo* dominantes como recesivas que pueden ser heredadas a sus futuros hijos en forma de una EMG ya conocida o nueva (Sally A., 2016; Campbell CD, Eichler EE., 2013; Girard SL, et al., 2016). Aquellas mutaciones causantes de EMGs pueden ser reveladas a través de un diagnóstico de línea germinal por medio de una secuenciación genómica (Krier J, et al., 2016), debido a que los progenitores en la mayoría de las veces no presentan alteraciones clínicas que pudieran ser relacionadas a una EMG. Con esta información a la mano, los posibles progenitores pueden tomar la mejor decisión antes de empezar una familia; aunque algunos progenitores podrían no gustar de la información obtenida. Aunque existan alternativas legales para evitar el nacimiento de un paciente con una EMG, muchos posibles progenitores por razones varias, creencias y convicciones, están deseosos de experimentar el embarazo y tener un hijo propio. Casos así son comunes e incluso han sido documentados por cadenas televisivas como *Discovery Channel*. A principios del año 2000 una pareja recién casada decidió embarazarse y con el nacimiento de su primera hija descubrieron que eran portadores de la enfermedad genética llamada ictiosis arlequín; tras acudir al asesoramiento genético se les explicó y recomendó que ya no buscaran tener otro hijo debido a que las posibilidades de otro nacimiento igual eran prácticamente del 100%. A pesar de las recomendaciones médicas y de su misma familia decidieron tener otro hijo y el resultado fue exactamente el mismo, otra bebé con la misma dolorosa condición médica. Dado que no existe

alguna ley que prohíba a los pacientes o portadores sanos de alguna EMG ser padres, y de existir sería considerada como no-ética por la opinión pública, CRISPR/Cas sería una opción para cumplir sus deseos. Empero, debe ser ponderado si el ayudar a los futuros padres a cumplir un deseo o capricho de tener un hijo propio y así iniciar una familia es suficiente razón para permitir la introducción de esta tecnología, sabiendo que existen vías legales para adoptar un niño (Baumann M., 2016).

Discusión

El gobierno mexicano a través de la Secretaría de Salud (SSA) destina aproximadamente el 3.3% de su producto interno bruto, o 6.3% en combinación con capital privado (OPS/WHO., 2016), para gastos relacionados a: (i) la promoción y desarrollo de programas públicos de salud; (ii) mantenimiento y construcción de infraestructura hospitalaria; (iii) y para la compra de insumos y equipo médico para los diferentes hospitales e institutos nacionales de salud dependientes de SSA (Plan Nacional de Desarrollo/ Programa Sectorial de Salud/ Logros 2015). Entre los programas públicos de salud podemos encontrar dos encuestas nacionales importantes, el Censo Nacional y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Ambas encuestas están diseñadas para indagar las necesidades sociales y problemas relacionados a la salud y nutrición en la población mexicana, y con los resultados obtenidos es posible establecer tendencias de mortalidad y morbilidad para diferentes enfermedades. Obesidad, diabetes mellitus I y II, cánceres, males cardíacos, accidentes cerebrovasculares, y enfermedades infecciosas, son tanto los problemas principales en salud pública como las principales causas de muerte en la población mexicana sin considerar edad ó sexo.

En el último Censo Nacional del 2010, el INEGI expuso las principales causas de muerte pediátrica en menores de cinco años, siendo enfermedades infecciosas, malnutrición, y malformaciones congénitas las causas principales (Fernández Cantón SB, et al., 2012). Para mitigar las tres causales, la SSA comenzaron programas públicos de salud, los cuales continúan activos, que consisten en mejorar las condiciones sanitarias en los hospitales, ayudar con vales de despensa para las familias de escasos recursos, y recomendar y dar a la población femenil ácido fólico durante el periodo de embarazo. Con las acciones tomadas se ha visto una clara tendencia a la baja en las muertes infantiles; pero a pesar de las acciones tomadas y ejecutadas, las muertes infantiles en México todavía suceden por causas prevenibles (UNICEF., 2017).

La gran mayoría de las estrategias dirigidas a los programas de salud pública están enfocadas en disminuir la prevalencia y las muertes causadas por obesidad, diabetes, y enfermedades infecciosas tanto en pacientes adultos como en menores de edad. Vale la pena mencionar el gasto público nacional de 23,000 millones de pesos, destinados anualmente desde el año 2011, los cuáles son gastados únicamente en el tratamiento y manejo de las complicaciones que rodean la diabetes y obesidad; sin embargo, con el número siempre creciente de la población afectada por alguna de estas dos condiciones, se ha estimado que se requeriría más de 150,000 millones de pesos para

atender a los obesos y diabéticos, este costo es básicamente la cantidad destinada al sector salud año tras año.

Dado que un gran porcentaje del gasto anual en salud se destina a atender las tres principales causas de muerte en la población mexicana general, las EMGs se encuentran descuidadas dentro del sistema nacional de salud, hasta el punto en que no figuran en ninguna estadística a nivel nacional. La FEMEXER ha estimado que la inmensa mayoría de los pacientes con alguna EMG muere sin tener un diagnóstico. En los datos recabados por el INEGI, existe una categoría denominada “causa de muerte desconocida” en la cual es válido suponer que se engloban varias de las EMGs. Uno de los obstáculos más grandes para evitar complicaciones desastrosas más adelante en la vida del paciente nacido con una EMG es el ser diagnosticado y en consecuencia recibir un tratamiento oportuno. Desde la década de 1960’s varios gobiernos del mundo han adoptado una serie de exámenes que de manera conjunta se les denomina diagnóstico neonatal (DxN), los cuales pueden detectar condiciones específicas a partir de pocas horas después del nacimiento o días. Gracias a los avances tecnológicos, el DxN ha evolucionado de un análisis básico en sangre y orina que únicamente podía diagnosticar una sola EMG, a una serie de exámenes más exhaustivos, complejos y específicos capaces de reconocer más de 50 EMGs de carácter metabólico (Therrell BL, et al., 2015; Berg JS, Powell CM., 2015). Con los años, los programas de DxN han probado ser un éxito en la salud pública de todos los países que lo han adoptado, tras haber salvado la vida de millones de neonatos inclusive cuando los síntomas de la patología eran confundidos con otras enfermedades (Shawky RM, et al., 2015).

La lista de enfermedades diagnosticadas por el programa varía de país en país tomando en consideración la prevalencia para cada condición, costo del tratamiento, factibilidad para el diagnóstico con la muestra requerida, y los fondos destinados a este programa en particular (Therrell BL, David Padilla C, Loeber JG, Kneisser I, et al., 2015; Mussap M, et al., 2013). En México, desde 1995, el DxN adquirió el estatuto de programa nacional de salud, en el cual todos los neonatos eran diagnosticados para fenilcetonuria entre el segundo y quinto día de nacimiento. En estos días, la Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de Defectos del Nacimiento (NOM-034-SSA2-2013.,2013) incluye 5 enfermedades: hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria, galactosemia, hiperplasia adrenal congénita, y deficiencia de biotinidasa; sin embargo, en el artículo 61 de la LGS en materia de “Atención Materno-Infantil” se estipula un diagnóstico extendido en el programa de DxN. Este diagnóstico extendido es meramente enunciativo, dado que no contiene el nombre de

ninguna enfermedad que requiera ser cubierta por la ley. Estados como Tabasco, Yucatán, y Chiapas iniciaron un programa piloto para el diagnóstico extendido en el DxN que incluye: fibrosis quística, ciertas hemoglobinopatías, y condiciones metabólicas detectables por un análisis MS/MS (Therrell BL, et al., 2015). En el estado de Nuevo León, su programa piloto de diagnóstico extendido abarca 38 enfermedades; por otro lado, el departamento de Salud de la SEMAR ofrece un diagnóstico extendido de 67 enfermedades. A la fecha, solo los estados mencionados tienen un programa piloto para mejorar el DxN, empero, no hay información disponible para saber los resultados, continuación o posible introducción de dichos programas piloto a los programas de salud pública estatales.

A pesar de la falta de información sobre la prevalencia del resto de las enfermedades que no son diagnosticadas y su mortalidad relacionada en la población mexicana, se otorgan de manera justa, gratuita y completa el acceso a los medicamentos huérfanos bajo el artículo 224 Bis y 224 Bis 1 de la LGS, así mismo toma como referencia el esquema de prevalencia europeo para enfermedades huérfanas y raras -< 5 pacientes de cada 10,000 habitantes- (Ley General de Salud, 2017). A pesar de que estos medicamentos se otorguen de manera -justa, gratuita y completa- se limita a aquellos que estén incluidos en el Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos (CBCM). Al corte de fecha de investigación bibliográfica, en México existían registrados 60 medicamentos para enfermedades huérfanas y raras, de los cuales solo 19 corresponden a alguna EMG y de éstos sólo 10 están incluidos en el Grupo No. 5 “Endocrinología y Metabolismo” del CBCM (CSG., 2016). Este grupo cubre mayoritariamente enfermedades lisosomales, dejando sin tratamiento el resto de las EMGs en el país, lo que obliga a las familias y pacientes afectados a buscar permisos de importación especiales y pagar por tener aquel medicamento a menester, el cual debe ser solicitado a COFEPRIS y probar que el medicamento ha sido ya previamente aprobado por alguna de las dos agencias reguladoras internacionales: FDA ó EMA.

Distribución por patología de los medicamentos disponibles en el Cuadro Básico de Medicamentos de SSA. 2016

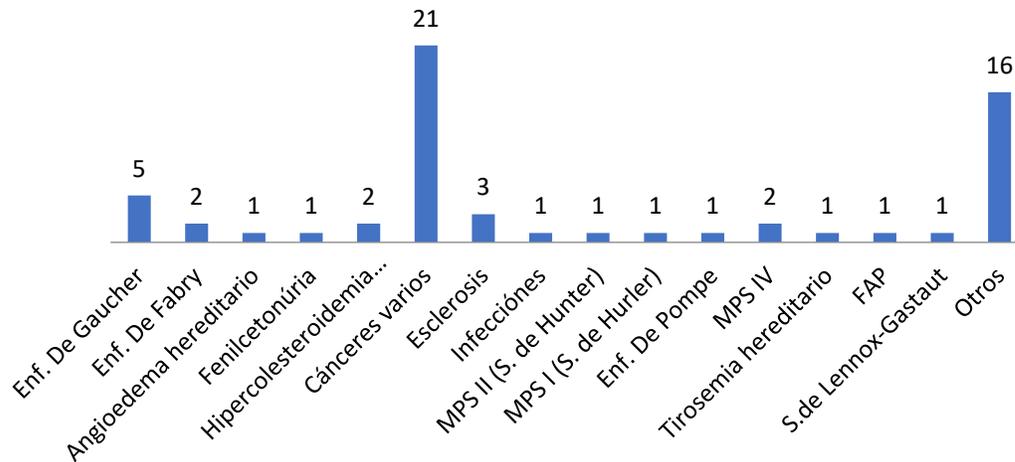


Tabla 3.- Distribución por patología de los medicamentos disponibles en el Cuadro Básico de Medicamentos de la SSA, año 2016. Se muestran los rubros cubiertos por el CBM de SSA en el año 2016. De los 60 medicamentos disponibles 19 cubren la misma EMG.

México carece de un adecuado registro de las EMGs, por lo que los datos epidemiológicos son desconocidos incluso para aquellas enfermedades que tienen una alta prevalencia a nivel mundial. Hay claras excepciones como es el caso de fenilcetonuria gracias a que esta fue la condición inaugural del programa nacional de DxN, se tienen registros adecuados de su prevalencia (Borrajó GJC., 2012). Debido que SSA no tiene datos adecuados, las organizaciones civiles (en inglés se denominan *advocacy associations*, el cual es un término más adecuado) se han visto en la necesidad de tener un registro propio de los pacientes y sus familias a quienes ayudan. Muchos de los datos publicados acerca de la prevalencia de EMGs es en base a los artículos de investigación científica que involucran a pacientes mexicanos y datos obtenidos de *advocacy associations* foráneas; no obstante, estos datos sólo reflejan parcialmente el verdadero número de pacientes que se ha estimado en más de 10 millones (FEMEXER., 2017). A pesar de estos datos aproximados, las *advocacy associations* cuentan tanto a los pacientes con EMGs y otras enfermedades huérfanas o raras, como: diferentes cánceres, esclerosis múltiple, o ciertas infecciones entre otras. Vale la pena mencionar el hecho de que la única bien establecida epidemiología en México es la fenilcetonuria, y a pesar de ello su tratamiento no está disponible en el CBCM.

La región de América Latina se caracteriza, tristemente, por una alta inequidad social como producto de dos elementos principales: sobrepoblación y pobreza creciente. En el último reporte del 2014, el Consejo Nacional para la Evaluación de Políticas de Desarrollo Social (CONEVAL) estimó en 53.3 millones de personas pobres en México, lo que representa el 46.2% de la población total, y de ellos 11.4 millones viven en la pobreza extrema; siendo los grupos indígenas los más afectados. Lo anterior se ve reflejado a nivel país al considerar que el nivel de salud de la población no depende de manera directa de los servicios sanitarios ofrecidos tanto por el gobierno como instituciones privadas; sino que los factores socioeconómicos, clase social, condiciones laborales, factores ambientales, pobreza, pertenecer a un grupo étnico, y la falta de los servicios mínimos sanitarios son los principales determinantes de la salud. Por estas razones, los grupos en desventaja social sufren una mayor carga cuando uno de sus familiares enferma y en consecuencia tienen menos oportunidades de sobrevivir al ser comparados con pacientes mejor posicionados en la escala social (Marmont Review Team., 2010). De hecho, los determinantes sociales de la salud (DSS) aún no son tomados en consideración al diseñar e implementar programas y políticas públicas de salud.

Los DSS limitan y exceden la capacidad de respuesta de los servicios sanitarios de salud, para mantener y rehabilitar tanto una salud individual como colectiva, lo cual abre la brecha en mortalidad y morbilidad entre las poblaciones indígenas, rurales, y urbanas (Marmont Review Team, 2010; WHO, 2011). Aunque la LGS bajo el artículo 77 Bis 1 en materia de protección social en la salud, garantiza el acceso los servicios médicos de atención primarios y secundarios, consisten en manera general en consultas médicas y especialidades básicas. En contraste tenemos a las poblaciones rurales e indígenas (PRIs), cuyos servicios médicos son desastrosos, debido a la falta de medicamentos, laboratorios clínicos, e inaccesibilidad geográfica (Montero-Mendoza., 2011), así como la incapacidad de los médicos generales de poder diagnosticar condiciones genéticas, deja a la mayoría de la población sin un diagnóstico y tratamiento, y no solo para las condiciones ya mencionadas, sino para muchas más.

El sistema de salud de México está ampliamente polarizado por los DSS, siendo el mejor escenario para un niño con una EMG, el nacer en algún centro urbano de importancia, en donde él o ella pueda ser debidamente diagnosticado y en consecuencia pudiera haber un adecuado seguimiento tanto para el paciente como para su familia; y así mismo su familia pudiera buscar ayuda y guía con las diversas *advocacy associations*, e incluso recaudar fondos para los medicamentos requeridos. No obstante, los casos que se presentan en las ciudades son pocos y

dispersos a lo largo de los años, como se demostró al estudiar los registros de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) y dos hospitales generales de segundo nivel en Veracruz (no especifican nombres). A lo largo de un periodo de 50 años solo 38 pacientes con mucopolisacaridosis fueron atendidos en el HIMFG, mientras que en Veracruz solo 21 pacientes fueron detectados en 7 años (Fuentes-Fuentes G, et al., 2012). Por el contrario, ciertas regiones indígenas son proclives a una mayor prevalencia de EMGs debido a un efecto fundador, causado ya sea de origen europeo o un alto índice endogámico, lo que genéticamente aísla a la comunidad incrementando la probabilidad y frecuencia de las condiciones letales de carácter hereditario (Little BS, Malina RM., 2005; García-Velázquez LE, et al., 2014). Cabe recalcar que a pesar de que las PRIs sean más proclives a presentar una EMG debido a ciertas costumbres y creencias, las poblaciones ciudadanas no se encuentran exentas de padecerlas por igual; ya que se ha estimado que mínimo el 90% de una población dada son portadores sanos de una EMG de carácter recesivo, así como de dos a cuatro variantes de la misma condición (Krier J, et al., 2016). Lo anterior hace hincapié en que las patologías monogénicas se encuentran ampliamente distribuidas en la población. Por lo tanto, el claro objetivo de permitir la ELG vía CCas en la población mexicana es buscar eliminar EMGs de la población de la cual se conozca un efecto fundador, así como tanto a las familias que previamente han sido diagnosticadas y desean un hijo *sano* o aquellas familias que lo desean realizar por precaución.

Con la introducción de CCas para la edición de la línea germinal (CCELG) como terapia opcional, tanto la población ciudadana como PRIs con EMGs localizadas pueden ser directamente beneficiadas para selectivamente retirar las enfermedades que solo afectan a un puñado de la población debido a que no tienen un acceso adecuado a un tratamiento. Aunque CCELG ofrece una alternativa tanto para los portadores sanos como los ya enfermos de poder tener un hijo o hija “sano”, involucra la manipulación *in vitro* del embrión. Bajo el Código Penal de la Ciudad de México, cualquier manipulación genética en humanos es prohibida si la intención es otra que no sea “eliminar enfermedades serias” (Isasi R, et al., 2016), bajo este canon CCELG cumple la intención de la ley y se puede argumentar su introducción, por lo menos en la capital de nuestro país. Es importante hacer mención que este nicho en la Ley de la Ciudad de México se basa en el principio de beneficencia y no-maleficencia. Beauchamp y Childress determinan que la moralidad requiere no solamente respetemos la autonomía de terceros o se les restrinja de hacer un daño, sino también de nosotros contribuir a su bien estar (Beauchamp TL, Childress JF., 2013). “Eliminar enfermedades serias” que causen una muerte prematura, dolor profuso, o que pongan en riesgo las capacidades

cognitivas y dinámicas del individuo son características de las EMGs, por lo que la CCELG podría contribuir ampliamente al bienestar del paciente desde antes que se presente la patología, ya que esta sería eliminada de la persona. Se ha elegido al sistema CCas como una opción aplicable a la ELG debido a la sencillez con la cual puede ser diseñado, así como su capacidad de poder ser modificado y adaptado para lograr mayor seguridad al reconocer y escindir las secuencias patológicas como fue demostrado en modelos murinos de Distrofia Muscular de Duchenne, logrando prevenir la aparición de la patología (Long C, et al., 2014). Debido a que una gran parte de la población es portadora de alguna u otra patología genética, que en consecuencia sea devastadora tanto para el futuro individuo como para su familia, está en la capacidad de la ciencia de prevenirlas y dar con ello un beneficio expreso. La legislación mexicana ha adoptado una política basada en la severidad de la patología; sin embargo, debido al sentido amplio de lo estipulado deja lugar a un modelo abierto al gusto del posible *consumidor*, en este caso los prospectos padres que deseen emplear CCELG como opción terapéutica.

Por otro lado, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (RLGSeMIS) en el Capítulo IV artículo 52 permite la investigación con fetos y embriones humanos siempre y cuando se asegure la viabilidad de este tras el procedimiento realizado; sin embargo, la modificación genética de un embrión no es un tema que sea mencionado en las leyes y reglamentos mexicanos, por lo que no queda claro lo que es posible hacer y lo que no. El artículo 45 de este mismo reglamento de manera textual señala – *Las investigaciones sin beneficio terapéutico en mujeres embarazadas, cuyo objetivo sea obtener conocimientos generalizables sobre el embarazo, no deberán representar un riesgo mayor a la mujer, embrión o feto-*; así mismo el artículo 55 de la LGS permite la investigación con embriones y fetos siempre y cuando haya un certificado de muerte fetal de por medio. En caso contrario, el artículo 330 de la misma ley prohíbe el uso de tejidos embrionarios o fetales para cualquier finalidad en el caso que éstos hayan sido obtenidos por medio de un aborto inducido. Por lo anterior al interpretar en conjunto la LGS y el RLGSeMIS se infiere que no está permitida la creación *ex profeso* de embriones para la investigación, ni la investigación que ponga en riesgo al producto de la concepción, mas es posible llevar a cabo la ELG con fines terapéuticos una vez que se haya probado su seguridad.

Durante el año 2016 se llevó a cabo un procedimiento de manipulación embrionaria para el reemplazo mitocondrial. Si bien el procedimiento fue exitoso y el bebé goza de perfecta salud, se desató una serie de polémicas en el país debido a la declaración realizada por parte de los

investigadores de la CF, al decir que –“México no regula la manipulación embrionaria y sus leyes son laxas, por eso decidimos realizar el protocolo aquí”-. En ese mismo año dos partidos políticos comenzaron una campaña para reformar la LGS en materia de “Procedimientos y Tecnologías para la Reproducción Asistida” para buscar prohibir la manipulación embrionaria. Empero, su prohibición propuesta es restrictiva para (i) usar embriones humanos en investigación, (ii) selección artificial del sexo biológico o cualquier característica fenotípica del futuro ser y (iii) cualquier modificación genética sin importar su fin. Así mismo, esta reforma contempla que el acceso a las tecnologías y procedimientos de reproducción asistida son “último recurso” para los futuros progenitores, y se promueve la adopción de infantes antes de intentar un procedimiento para lograr el embarazo (Secretaría de Gobernación., acceso en línea el 26-01-2017). Si bien el propósito de esta reforma es crear una ley nacional para la regulación y correcta aplicación de diferentes tecnologías y procedimientos de reproducción asistida aplicable a todas las CsF registradas en el país, con el objetivo de evitar el “turismo de fertilidad” y la investigación y modificación tanto de la línea germinal como del embrión; se estaría privando a las futuras generaciones de mejores tratamientos terapéuticos opcionales a las EMGs. Al terminar el presente trabajo no ha habido más declaraciones por parte de ninguna de las cámaras de gobierno.

Dentro de una posible reconsideración, la SSA debe tomar en cuenta el bajo poder adquisitivo de la gran mayoría de la población y así mismo, éticamente ponderar el justo acceso a la ELG mediante CCas teniendo como objetivo lograr un beneficio tangible para la mayoría de la población y no solo unos pocos grupos selectos. Un importante obstáculo que es necesario tener en cuenta antes de pensar si quiera introducir esta tecnología, es que el procedimiento como tal requiere el diagnóstico genético/genómico de ambos futuros padres y del mismo embrión, para localizar la posible mutación y corregirse. En el actual sistema de salud, las herramientas más innovadoras de diagnóstico por biología molecular son solamente ofrecidos en institutos médicos de tercer nivel, y muchas de las veces es debido a que el paciente decide participar en un estudio de investigación biomédica y la condición del paciente concierne a la investigación llevada a cabo por el grupo del investigador titular; otra opción es pagar por el servicio de diagnóstico en donde el precio es a partir de los \$20,000 pesos o más dependiendo de la herramienta de biología molecular empleada para el diagnóstico. A pesar de que por medio de un programa de salud pública la ELG mediante CCas pudiera beneficiar, en teoría, a la mayoría de la población, a la *praxis* estaría destinado a fallar o no llegar a toda la población debido a los requerimientos básicos de biología molecular para poder implementar este procedimiento. Como referencia de un programa nacional

que tenía como parte de sus objetivos el diagnóstico de EMGs es el programa nacional de DxN, en el cual los mejores resultados se obtuvieron de las familias que tenían un mayor poderío económico para pagar por los servicios de atención médica durante el embarazo y puerperio (Therrell BL, et al., 2015). Para que un programa de salud pública tenga éxito se requiere de una cantidad masiva de dinero para modificar y mejorar la actual infraestructura de los laboratorios y hospitales.

México es un país en vía de desarrollo, que tiene la combinación de tres principales problemas de salud que afectan a la población como un todo: falta de instituciones médicas bien equipadas, los DSS son los conductores de la salud, y el pobre acceso a ciertos medicamentos, hacen que el desvío de fondos sea para dar mantenimiento a la institución y los servicios y no para realizar mejoras en los mismos. Más importante denotar, es el hecho que ciertas leyes para garantizar el acceso a la salud se contraponen unas a otras. No es aventurado llegar a pensar que estos mismos problemas afectarían tanto la legalización como el acceso vía salud pública a CCELG; por lo que, antes de considerar su introducción hay problemas más graves que requieren la atención de la SSA para conceder a la toda la población una salud digna.

Para poder introducir en México este tipo de terapias alternativas de edición genómica en la línea germinal es requisito legislar, establecer y regular su aplicación tanto a nivel Federal como Constitucional. Entre los requisitos para poder legalizar su aplicación es menester adoptar en términos científicos y laicos lo que es posible hacer y lo que no. Parte de las modificaciones que se deben hacer a un nivel superior es en la Constitución de los Estados Unidos Mexicanos, ya que ésta no define lo que es un embrión humano ni expresamente defiende la vida humana a partir del momento de la concepción o fertilización. A pesar de lo anterior, los partidos conservadores argumentan bajo el artículo 1° Constitucional que el aborto, la destrucción de un embrión humano o la modificación de estos es una afronta directa a su derecho a la vida y dignidad humana; empero, la Suprema Corte de Justicia de la Nación dictaminó que al no contar a nivel Constitucional con una definición específica al derecho a la vida, al valor de la misma u otra expresión que se determinante a partir del momento de la concepción o fertilización el aborto es una práctica aceptable incluso para eliminar condiciones congénitas entre otras causas (Suprema Corte de Justicia de la Nación., 2016; Medina-Arellano MJ., 2011).

Partiendo del dictamen anterior es posible argumentar la introducción de CCELG, ya que de ésta forma se podría conciliar parte de la problemática entre los partidos liberales y conservadores, así como la opinión pública, ya que la edición de la línea germinal humana no atenta en contra de

la dignidad o la vida humana, dado que la intención con ello es dar un tratamiento a las personas que lo requieren y no lo tienen (Gyngell C, et al., 2016). Por otro lado, a nivel federativo cambios deben hacerse en la LGS. ya que únicamente en artículo 314 sección séptima y octava se limita a dar una definición legal de lo que es un embrión y un feto en base al tiempo ocurrido tras la concepción (Ley General de Salud., 2016)

Es razonable suponer que también en la LGS debería aparecer un apartado sobre las tecnologías de reproducción asistida, pero no es así. Por poco más de 10 años modificaciones a la LGS en este rubro se han discutido en el Congreso de la Unión, pero hasta ahora no se ha resuelto nada ya que entre las discusiones no ha habido un reconocimiento entre las partes interesadas, la académica y política de los límites y aplicaciones de las tecnologías de reproducción asistida (Palacios-González CP, Medina-Arellano MJ., 2017). Lo anterior a traído en consecuencia una falta de regulación en materia de reproducción asistida ya que no existe una autoridad que regule, evalúe y compile la información de todas las TARs disponibles en el país y quienes las están aplicado. Dado el caso, las diferentes partes interesadas se han organizado en asociaciones médicas para autorregular su proceder. COFEPRIS a pesar de ser el organismo encargado de regular sus actividades tiene un límite establecido por el mismo en el cual únicamente posee injerencia en cuanto a las instalaciones y lineamientos de funcionamiento de los centros en dónde se lleve a cabo el procedimiento (Medina-Arellano., 2010).

Ponderando los datos en conjunto México no posee una ley federal que regule la modificación del genoma humano, y en aquellos tratados internacionales en dónde México es partícipe no se expresa de manera directa la prohibición de realizarlo. De hecho, la Constitución de la CDMX lo permitiría en pos de la salud poblacional, y es a partir de ello que se podría iniciar una discusión para su introducción, mas hay que cambiar los esquemas legales que fungen en la protección y modificación de la línea germinal humana desde la etapa embrionaria.

Conclusiones

El análisis panorámico ofrecido por el presente trabajo ha denotado de manera resumida tanto los puntos a favor y en contra del uso de CCas como herramienta terapéutica para la ELG contra EMGs. De manera global es imposible diseñar tratamientos específicos para cada una de las EMGs diagnosticadas, o por diagnosticar, debido a la gran complejidad subyacente demostrada tanto en modelos animales y celulares de estas patologías. Es importante señalar que a pesar de que dos pacientes o más tengan la misma patología se ven afectados de manera igualitaria mas no idéntica, lo que limita o aumenta las opciones de tratamiento disponibles para cada uno de ellos, conllevando a mejorar o disminuir la calidad de vida del paciente y su familia.

Aunque las compañías farmacéuticas, biofarmacéuticas y los gobiernos alrededor del mundo han realizado importantes inversiones para mejorar y desarrollar nuevos medicamentos para las EMGs, el tiempo requerido por estándares internacionales para probar su seguridad, eficiencia y eficacia contra una de estas patologías es demasiado y si a esto se le añade el verdadero problema que los pacientes afectados mueren de manera repentina es difícil tomar una población a estudiar y probar en ellos un fármaco en vía de desarrollo. La ELG mediante CCas ofrece la opción perfecta para abordar estas enfermedades que están con tratamientos limitados, y hasta ineficientes, a pesar de la controversia a la cual está sujeta. Parte de esta controversia se debe tanto a cuestiones morales-sociales del valor de un embrión, así como fallas técnicas en el método a seguir bajo el argumento de que no es ético ofrecer una herramienta de salud que destruye a un embrión u ocasione daños no previstos y con los cuales su calidad de vida empeore posterior al nacimiento. Por otro lado, se ha argumentado la posibilidad de un *mejoramiento o potenciación* biológica para ciertas características físicas deseables en un bebé o la falta del consentimiento de estas futuras generaciones; sin embargo, ambos carecen de fuerza debido a que están basados mayoritariamente en especulaciones mas que en evidencia y hechos científicos, por lo que es importante separar la realidad de la ficción de lo que posible realizar y de lo que no. Si bien es posible que la eugenesia sea lo más criticable de la aplicación de CCas en la ELG, esta puede ser sorteada por medio de regulaciones internacionales en las cuales se limite el uso de esta herramienta únicamente al tratamiento de EMGs y no con otros fines terapéuticos o de mejora.

Actualmente hay varios grupos que versan por la introducción de CCas como opción terapéutica a EMGs so argumento consecuencialista, lo que ha permeado hasta la autorización parcial o completa de ciertas legislaciones para su uso en investigación básica, empero se sigue

prohibiendo su uso terapéutico hasta comprobar que sea segura en su totalidad. Es importante recalcar que en las legislaciones en las cuales se ha permitido la experimentación básica se limita ésta hasta el decimocuarto día tras concepción *exprofeso* de la investigación; empero, no es posible comprobar la seguridad biológica de CCas con un tiempo tan corto por lo que para permitir su aplicación se deberá aventurarse a llevar un embarazo a término para poder confirmar su segura aplicación en demás pacientes. Recientemente la CCELG tuvo un gran avance al haber eliminado el mosaicismo embrionario tras la edición genética; sin embargo, de los 125 embriones empleados únicamente uno cumple con todos los criterios para poder ser implantado (Ma, et al., 2017). La publicación citada concluye advirtiendo que la tecnología actual aún es inmadura y se requiere de una mayor profundización antes que esta llegue a una aplicación clínica, mas, enfatizan lo beneficioso que puede llegar a ser argumentado su futura introducción terapéutica.

En el panorama nacional se demostró con base a las legislaciones imperantes que no existe un mecanismo legal que impida la ELG con fines terapéuticos y de llevarse a cabo se justificaría bajo el argumento de beneficencia empleado por la misma ley. De hecho, solo es posible realizar una interpretación en conjunto e inferir que con base a las leyes mexicanas que no es posible editar la línea germinal humana o al embrión con fines de investigación básica. Cabe destacar que la misma LGS y el RLGSeMIS no hacen distinción entre aplicaciones de investigación básica o terapéutica, por lo que la prohibición es en base a lo dictaminado por los comités de ética de cada institución. Si bien la edición terapéutica de la línea germinal humana vía CCas es todavía distante (o que sea dejada a un lado por otra tecnología), es posible tomar la introducción de esta como un modelo para permitir la adopción de diferentes tecnologías de edición genómica en beneficio a la salud poblacional. Cabe añadir que las legislaciones mexicanas en materia de salud no han avanzado con forme al ritmo internacional y científico. Apenas en el año 2017 se dictaminó una ley para el registro y epidemiología del cáncer en México, cuando a inicios de 1990 una ley similar ya estaba aprobada y puesta en aplicación en EUA.

Las legislaciones mexicanas deben adoptar un carácter “dinámico” semejante al empleado por países como el Reino Unido o China; las cuales parten de generalidades y se van agregando cláusulas y modificaciones con forme las tecnologías aplicadas a la salud van mejorando. Cabe destacar que las legislaciones de estos países buscan mejorar la calidad y dignidad de la salud humana mediante el uso de diferentes tecnologías, por lo que la prohibición de éstas no es una opción viable para su objetivo. El 23 de octubre del 2000 se decretó en el Diario Oficial de la

Federación la creación del Consejo Nacional sobre Genoma Humano, con el fin de coordinar las políticas y acciones de las dependencias e instituciones educativas y de salud, relativas a la investigación, desarrollo tecnológico, enseñanza, atención médica y, en general a la aplicación del conocimiento sobre el genoma humano incluyendo la terapia génica y la edición de la línea germinal humana (Artículo 1°, Diario Oficial de la Federación., 23 de Octubre del año 2000). A pesar de ser la primer propuesta del gobierno mexicano para incorporar a nuestras legislaciones las implicaciones de los avances de la investigación genómica y con ello implementar políticas sobre el uso, manejo y proyección del alcance de las implicaciones de la investigación genómica aplicada a la salud. Este proyecto tenía la iniciativa de poder ser la herramienta de consolidación de la investigación genómica en México y crear las regulaciones dinámicas ya mencionadas; sin embargo, debido a la falta de seguimiento no se logró consolidar.

Por el momento no es factible el uso de la ELG para el tratamiento de EMGs, ya que existen varios vacíos legales y legislaciones que se oponen entre si, lo que obstaculiza la introducción de cualquier herramienta para lograrlo, incluyendo a CCas. Cabe mencionar, que es necesario dar seguimiento a los diferentes proyectos de ley y modificaciones a las mismas para poder consolidar en el país las diferentes tecnologías genómicas para mejorar la salud de la población como un todo.

Bibliografía

- Amitai G, Sorek R (2016) CRISPR-Cas adaption: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, Advance online publication 1-10.
- Alberts B, Johnson A, Bray D, Hopkin K, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, et al (2008) Cómo leen las células el genoma: del DNA a la proteína. *Biología Molecular de la Célula*. (5ta ed.) Ediciones *Omega*, España. 1602pp.
- Alonso ME, Gómez L, Otero E, Figueroa HH (1989) Importance of Hereditary Disease at a Neuropsychiatric Institute in Mexico City. *Genetic Epidemiology*, 6:589-595.
- Antonarakis SE, Beckmann JS (2006) Mendelian disorders deserve more attention. *Nature Reviews Genetics*, 7:277-282.
- Araki M, Ishii T (2014) International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:108-120.
- Aronovich EL, Hackett PB (2015) Lysosomal storage disease: Gene therapy on both sides of the blood-brain barrier. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114:83-93.
- Badano JL, Katsanis N (2002) Beyond Mendel: An Evolving View Of Human Genetic Disease Transmission. *Nature Reviews Genetics*, 3:779-788.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011) CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review Genetics*, 45:273-297.
- Balmes J (1872) Curso de Filosofía Elemental: lógica, metafísica y ética. Libro ya no disponible, se obtuvo pdf de <http://www.conevyt.org.mx/tareas/cd2/Libros/etica.pdf>. Accesado en línea el 22-08-2017.
- Barbas III CF, Gaj T, Gersbach CA (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Cell*, 31(7):397-405.
- Barrangou R, Marraffini LA (2014) CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 54:234-244.

Baumann M (2016) CRISPR/Cas9 genome editing – new and old ethical issues arising from a revolutionary technology. *NanoEthics*, 10(2):139-159.

Berg JS, Powell CM (2015) Potencial Uses and Inherited Challenges of Using Genome-Scale Sequencing to Augment Current Newborn Screening. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, on-line press*, 5:1-16, a023150.

Bernardi G (2008) Evolutionary History of the Human Genome. *Encyclopedia of Life Sciences*, s/v:1-4.

Beauchamp TL, Childress JF (2013) Principles of Biomedical Ethics. 7th ed. *Oxford University Press, New York*. 466pp.

Bird A (2013) Genome Biology: Not Drowning but Waving. *Cell*, 154(5)951-952.

Bird A, Jaenisch R (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33:245-256.

Bloom BE (2016) Recent successes and future predictions on drug repurposing for rare diseases. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 4(1):1-4.

Boardman F (2016) Identity, disability and the genome. *BioNews*. Revisado en línea 17 de Marzo 2017. http://www.bionews.org.uk/page.asp?obj_id=638169

Bolotin D, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151:2551-2561.

Borrajo GJC (2012) Panorama epidemiológico de la fenilcetonuria (PKU) en Latinoamérica. *Acta Pediátrica Mexicana*, 33:279-287.

Bourne A, Douglas T, Savulescu J (2012) Procreative beneficence and in vitro gametogenesis. *Monash bioethics review*. 30(2):29.

Boudes PF (2014) Gene therapy as a new treatment option for inherited monogenic diseases. *European Journal of Internal Medicine*, 25:31-36.

Buchanan A, Brock DW, Daniels N, Wikler D (2001) From chance to choice: Genetics and justice. *Cambridge University Press, UK*. 350pp

Brinkman R, Dubé MP, Rouleau GA, Orr AC, Samuels ME (2006) Human monogenic disorders- a source of novel drug targets. *Nature Reviews Genetics*, 7:249-282.

Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321:960-964.

Callaway E (2016) Gene-editing research in human embryos gains momentum. *Nature*, 532:289-290.

Campbell CD, Eichler EE (2013) Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends in Genetics*, 29(10):575-584.

Carnevale A, Hernández M, Reyes R, Paz F, Sosa C, Optiz JM, Reynolds JF (1985) The Frequency and Economic Burden of Genetic Disease in a Pediatric Hospital in Mexico City. *American Journal of Medical Genetics*, 20:665-675.

Chandrasegaran S, Carroll D (2015) Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of Molecular Biology*, 428:963-989.

Chapman AR, Frankel MS (2003) Designing our descendants: the promises and perils of genetic modifications. JHU Press. 254pp

Carroll D, Charo A (2015) The societal opportunities and challenges of genome editing. *Genome Biology*, 16:242-251.

Charpentier E, Doudna JA (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1077-1087.

Charpentier E, Doudna JA, Hauer M, Fonfara I, Chylinski K, Jinek M (2012) A Programmable Dual DNA-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337:816-821.

Cavaliere G (2017) Genome editing and assisted reproduction: curing embryos, society or prospective parents? *Medical Helath-Care and Philosophy*, ahead of publication.

Cavaliere G (2016) The Mexican mitochondrial case and moral supremacy. *Bio News*-872.

Chi KR (2017) The RNA Code comes into focus. *Nature*, 542:503-509.

Collins FS (2015) Statement on NIH funding of research using gene-editing technologies in human embryos. National Institutes of Health. Disponible en línea en <https://www.nih.gov/about-nih/who-we-are/hih-director/statements/statement-hih-funding-research-using-gene-editing-technologies-human-embryos>

Consejo de la Salubridad General (2016) Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos, Edición 2016.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339:819-823.

Dario Bergel S (2006) Genoma Humano. *Reflexiones en torno al derecho genómico*, 86:53-82.

Davis AJ, Chen DJ (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translation Cancer Research*, 2(3):130-143.

Dham R. (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2):274-288.

Dittmer J (2017) Applied Ethics. Internet Encyclopedia of Philosophy, accesado en línea el 23-08-2017. <http://www.iep.utm.edu/ap-ethic/>

Driver J (2014) The History of Utilitarianism. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*, accesado en línea el 23-08-2017 //plato.stanford.edu/entries/utilitarianism-history/

Engelhardt HT (1995) Los fundamentos de la bioética. *Ediciones Paidós*, España. 534pp.

European Commission (2015) Inventory of Union and Member State incentives to support research into, and the development and availability of, orphan medicinal products. *Health and Food Safety*, s/v:1-50.

European Union Committee of Experts on Rare Diseases-EUCERD (2014) 2014 Report on the State of Art of Rare Diseases Activities in Europe. Recurso en línea, acceso en el 24-08-2017 www.eucerd.eu/?page_id=163#StateArt

Evitt NH, Mascharak S, Altman R (2015) Human Germline CRISPR-Cas Modification: Toward a Regulatory Framework. *The American Journal of Bioethics*, 15(12):25-29.

Fatwa A, Williams N, Grutzner F, Hughes J, Thomas P (2017) Targeted Deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Cell Molecular Therapy*, 25(8):1736-1738.

Fagioli S, Daina E, D'Antiga L, Colledan M, Remuzzi G (2013) Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 59:595-612.

Fagnan DE, Yang NN, McKew JC, Lo AW (2015) Financing translation: Analysis of the NCATS rare-disease portfolio. *Science Translational Medicine*, 7(276):1-7.

Federación Mexicana de Enfermedades Raras-FEMEXER (2017) Recurso en línea accesado el 22-08-2017. <http://www.femexer.org/category/eerr/>.

Fernández Cantón SB, Gutiérrez Trujillo G, Viguri Uribe R (2012) Principales causas de mortalidad infantil en México: tendencias recientes. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 69(2):144-148.

Ferrer JJ, Álvarez JC (2003) Para fundamentar la bioética. *Editorial Desclée de Brouwer, España*. 567pp.

Fieser J (2017) Ethics. *Internet Encyclopedia of Philosophy*, accesado en línea el 22-08-2017. <http://www.iep.utm.edu/ethics/>

Food and Drug Administration- Department of Health and Human Services (2013) Orphan Drug Regulations. *Federal Register*, 78(113):35117-35135.

Forsmark CE (2013) Management of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*, 144:1282-1291.

Fuentes-Fuentes G, Abreu-González M, Gamboa-Marrufo JD, Consuelo-Sánchez A (2012) Frequency of mucopolysaccharidoses diseases at the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Revista de Investigación Clínica*, 64(5):495-496.

García-Velázquez LE, Canizales-Quinteros S, Romero-Hidalgo S, Ochoa-Morales A, Martínez-Ruano L, Márquez-Luna C, Acuña-Alonso V, Villareal-Molina MT, Alonso-Vilatela ME, Yescas-Gómez P (2014) Founder effect and ancestral origin of spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) mutation in Mexican families. *Neurogenetics*, 15:13-17.

Gersbach CA, Maeder ML (2016) Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Official Journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*, 24(3):430-446.

Gersen SL, Keagle MB Editores (2013) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. (3er ed.) *Springer*, New York. 560pp.

Girard SL, Bourassa CV, Perrenault L, Legault MA, Barhdadi A, Ambalavanan A, Brendgen M, Vitaro F, Noreau A, Dionne G, Tremblay RE, Dion PA, Bolvin M, Dubé MP, Rouleau GA (2016) Peternal Age Explains a Major Portion of De Novo Germline Mutation Rate Variability in Healthy Individuals, *PLoS One*: 11(10): e0164212. doi.org/10.1371/journal.pone.0164212.

Glover J (2006) *Choosing Children: genes, disability, and design*. *Oxford University Press*, UK. 320pp.

Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P (2017) Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature aging disease caused by *LMNA* gene mutations. *Ageing Research Reviews*, 33:18-29.

Gorell E, Nguyen N, Lane A, Siprashvili Z (2014) Gene Therapy for Skin Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4:1-16.

Green ED, Guyer MS, Manolio TA, Peterson JL (2011) Charting a course for genomic medicine from base pair to bedside. *Nature*, 470:204-213.

Gropman AL (2012) Patterns of Brain Injury in Inborn Errors of Metabolism. *Seminar of Pediatric Neurology*, 19:203-210.

Gutiérrez-Sáenz R (2006) *Historia de las doctrinas filosóficas*. (38 ed.) *Grupo Editorial Esfinge*, México. 217pp.

Gyngell C, Douglas T, Savulescu J (2016) The Ethics of Germline Editing. *Journal of Applied Philosophy*, 34(4):498-513.

Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE (2005) A guild of 45 Cas protein families and multiple CRISPR-Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 1:e60.

Harris J (2015) Germline manipulation and our future worlds. *The American Journal of Bioethics*, 15(12):30-34.

Heidari R, Shaw DM, Elger BS (2016) CRISPR and the Rebirth of Synthetic Biology. *Science Engineering Ethics*, 23(2):351-363.

Hentges KE (2013) Essential Genes and Human Genetic Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, s/v:1-6.

Hille F, Charpentier E (2016) CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions*, 371:1-12.

Hortelano A (1985) Problemas Actuales de Moral Tm. I. (2da ed) *Ediciones Sígueme, España*. 597pp.

Hotta A, Nakano T, Li HL (2014) Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Development, Growth & Differentiation*, 56:63-77.

Huang J, Canquan Z, Ma W, Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Zhou C (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploic zygotes. *Protein and Cell*, 6(5):363-372.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Molecular Cell*, 157:1262-1278.

Isasi R, Kleiderman E, Knoppers BM (2016) Editing policy to fit the genome? *Science*, 361(6271):337-339.

Isasi RM, Knoppers BM (2006) Beyond the permissibility of embryonic and stem cell research: substantive requirements and procedural safeguards. *Human Reproduction*, 10: 2474-2481.

Isasi RM, Knoppers BM (2006) (2) Mind the gap: policy approaches to embryonic stem cell and cloning research in 50 countries. *European Journal of Health and Law*, 13(1): 9-25.

Ishii T (2015) Germline genome-editing research and its socioethical implications. *Trends in Molecular Medicine*, 21(8):473-481.

Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43:1565-1575.

Jazwa A, Florczyk Urszula, Jozkowicz A, Dulak J (2013) Gene therapy on demand: Site specific regulation of gene therapy. *Gene*, 525:229-238.

Jiang W, Marraffini L (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annual Reviews Microbiology*, 69:209-228.

Jiang F, Doudna J (2017) CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review Biophysics*, 46:505-529.

Juengst E (1995) "Prevention" and the goal of genetic medicine. *Human Gene Therapy*, (6)12:1595-1605.

Juengst E, Moseley D (2016) Human Enhancement. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*, accesado en línea el 23-08-2017. plato.stanford.edu/entries/enhancement/.

Jürgen WS (2002) Human Dignity as a Regulative Instrument for Human Genome Research. *Reflexiones en torno al derecho genómico*, 86:121-133.

Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun 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.

Kamate M, Ramakrishna S, Kambali S, Mahadevan A (2014) Giant axonal neuropathy: a rare inherited neuropathy with simple clinical clues. *BMJ Case Report*, Published on-line: 26 August 2014. doi:10.1136/bcr-2014-204481

Kennedy MA (2005) Mendelian Genetic Disorders. *Encyclopedia of Life Sciences*, s/v:1-8.

Kin T, Tsui M, Li H (2015) Structure Principles of CRISPR-Cas Surveillance and Effector Complexes. *Annual Reviews Biophysics* 44:12.1-12.27.

Koonin EV, Makarova KS, Zhang F (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 37:67-78.

Knoppers, B (1999) *cit.*, en Blazquez Ruis F "Derechos Humanos y Eugenesia", en Romeo Casabona (ed), La Eugenesia hoy, cátedra universitaria de derecho y genoma humano, Bilbao, 1999, p. 275.

Krier J, Kalia SS, Green RC (2016) Genomic Sequencing in clinical practice: applications, challenges, and opportunities. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(3):300-309.

LaFontaine JS, Fathe K, Smyth H D.C. (2015) Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *International Journal of Pharmaceutics*, 494:180-194.

Lam WWK, Mueller RF (2002) Human Genetics: Principles. *Encyclopedia of Life Sciences*, s/v:1-6.

- Lander ES (2015) Brave New Genome. *The New England Journal of Medicine*, 373(1):5-7.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860-921.
- Landfeldt E, Alfredsson L, Straub V, Lochmüller H, Bushby K, Lindgren P (2017) Economic Evaluation in Duchenne Muscular Dystrophy: Model Framework for Cost-Effectiveness Analysis. *Pharmacoeconomics*, 35(2):249-258.
- Leonard JV (2006) Komrower lecture: Treatment of inborn errors of metabolism: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disorders*, 29:275-278.
- Ley General de Salud (2017) Última reforma publicada DOF 22-06-2017.
- Li J, Lin G, Peng R, (2015) Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *The FEBS Journal*, 283:1218-1231.
- Little BS, Malina RM (2005) Inbreeding Avoidance in an Isolated Indigenous Zapotec Community in the Valley of Oaxaca, Southern Mexico. *Human Biology*, 77(3):305-316.
- Lolas F (2001) Bioética, El dialogo moral en las ciencias de la vida. (2da ed.) *Mediterraneo*, Chile. 104pp.
- Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 345(6201): 1184-1188.
- Luthardt FW, Keitges E (2001) Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, s/v:1-11.
- Magaña JJ, Gómez R, Maldonado-Rodríguez M, Velázquez-Pérez L, Tapia-GuerreroYS, Leyva-García N, Hernández-Hernández O, Cisneros B (2013) Origin of the Spinocerebellar Ataxia Type 7 Gene Mutation in Mexican Population. *Cerebellum* 12:902-905.
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, Koski A, Ji D, Hayama T, Ahmed R, Darby H, Van Dyken C, Li Y, Kang E, et al (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548: 413-437.

Marian AJ (2015) Clinical applications of molecular genetics discoveries. *Translational Research*, 168:6-14.

Marmont Review Team (2010) Fair society, healthy lives: strategic review of health inequalities in England post-2010 London. *Marmont Review*, 15-233.

Marraffini LA (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526:55-61.

Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY (2016) Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Systematic Review*, 5(5):1-148.

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, et al (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9:467-477.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, et al (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13:1-15.

Medina-Arellano MJ (2010) The Need for Balancing the Reproductive Rights of Women and the Unborn in the Mexican Courtroom. *Legal Medicine Review*, 427-433.

Medina-Arellano MJ (2011) Stem Cell Regulation in Mexico: Current Debates and Future Challenges. *Legal Ethics and Technology*, 17: 1-33.

Michael M, Tuomi M (2012) Access to orphan drugs in Europe: current and future issues. *Experts Reviews in Pharmacoeconomics*, 12(1): 23-29.

Michigan State University (2017) Basic Genetics. Recurso en línea accesado el 21 de septiembre 2017.

Miller HI (2015) Germline gene therapy: We're ready. *Science*, 348(6241):1325.

Montero-Mendoza E (2011) Percepción de los habitantes indígenas de áreas rurales respecto al primer nivel de atención médica. El caso del sureste de Veracruz, México. *Salud Colectiva*, 7(1):73-86.

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, 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.

Morell SH (2014) Papel del elemento Line-1 en la patología humana de anemia de Fanconi. Tesis de Doctorado, Universidad de Granada.

Motoko A, Ishii T (2014) International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:108-120.

Mussap M, Antonucci R, Noto A, Fanos V (2013) The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, 426:127-138.

Naldini L (2015) Gene Therapy returns to centre stage. *Nature*, 526:351-364.

Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al (2014) Generation of gene-modified cynomolgus monkeys via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4):836-843.

Nishimasu H, Nuerki O (2017) Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current opinion in Structural Biology*, 43:68-78.

Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5), 935-949.

Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2013, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento. *Diario Oficial de la Federación* 24/06/2014.

O'Neil DA (2014) A better fit? Biotech versus Big Pharma in orphan/rare disease drug research. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2(4):317-319.

Olena A (2017) First In Vivo Human Genome Editing to be Tested in New Clinical Trial. *The Scientist-online pub.* Revisado en línea el 07-11-2017. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/49456/title/First-In-Vivo-Human-Genome-Editing-to-Be-Tested-in-New-Clinical-Trial/>

Olson MV. (1993) The human genome project. *Procedures of the Natural Academy of Science*, 90:4338-4344.

Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (2017) La Salud de México en Cifras. Recurso en línea de la OPS/OMS Oficina Regional para las Américas. Accesado en línea el 27-08-2017.

http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=780&Itemid=310

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura/ UNESCO (1997) Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos. Artículos 1°-25°.

Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, Bombard Y, Brody LC, Faucett WA, Garrison NA, Hercher L, Isasi R, Middleton A, Musunuru K, Shiner D, Virani A, Young CE (2017) Human Germline Genome Editing: ASHG Position Statement. *The American Journal of Human Genetics* 101:167-176.

Osorio JH (2011) Cuestionamientos Éticos Relacionados con la Terapia Génica para el tratamiento de las Enfermedades Hereditarias. *Revista Luna Azul*, 32:114-120.

Palacios-González C, Medina-Arellano MJ (2017) Mitochondrial replacement techniques and Mexico's rule of law: on legality of the first maternal spindle transfer case. *Journal of Law and the Bioscience*, 50-69.

Pellagatti A, Dolatshad H, Valletta S, Boultonwood J (2015) Application of CRISPR/Cas9 genome editing to study and treatment of disease. *Archives of Toxicology*, 89:1023-1034.

Pearson EG, Flake AW (2013) Stem cell and genetic therapies for the fetus. *Seminars in Pediatric Surgery*, 22:56-61.

Phillips MI (2012) Big Pharma's new model in orphan drugs and rare diseases. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(1):1-3.

Phillips MI (2013) Big Pharma's new model in orphan drugs and rare diseases. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(1):1-3.

Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018 (2015) Programa Sectorial de Salud 2013-2018.

Pollack R (2015) Eugenics lurk in the shadow of CRISPR. *Science*, 348(6237):871.

Porteus MH (2015) Genome Editing: A New Approach to Human Therapeutics. *Annual Reviews on Pharmacology and Toxicology*, 56:163-190.

Porteus MH. (2015) (2) Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biology*, 16:286-298.

Pourcel C, Salvignot G, Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersenia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151:653-663.

Richard I (2005) The genetic and molecular bases of monogenic disorders affecting proteolytic systems. *Journal of Medical Genetics*, 42:529-539.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117:119-128.

Riethoven JJ (2010) Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods in Molecular Biology*, 674:33-42.

Salzberg SL, Treagen TJ (2012) Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews: Genetics*, 13(1):36-46.

Saudubray JM, Walter JH (2006) Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disorders*, 29:261-274.

Sayre-McCord G (2014) Metaethics. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*, *accesado en línea el 22-08-2017* <https://plato.stanford.edu/archives/sum2014/entries/metaethics/>

Scally A (2016) Mutation rates and the evolution of germline structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biology*, 371(1699):1-10.

Scharenberg AM, Porteus MH, Kohn DB (2016) Ethical and regulatory aspects of genome editing. *Blood*, 127(21):2553-2560.

Shawky RM, Abd-Elkhalek HS, Elakhar SE (2015) Selective screening in neonates suspected to have inborn error of metabolism. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 16:165-171.

Smith KR, Chan S, Harris J (2012) Human germline genetic modification: scientific and bioethical perspectives. *Archives of medical research*, 43(7):491-513.

Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics*, 18(2):74-83.

Steinbock B (2007) Moral Status, Moral Value, and Human Embryos: Implications for Stem Cell Research. *The Oxford Handbook of Bioethics*, 1(1): 416-440.

Stephens J, Blazynski C (2014) Rare disease landscape: will the blockbuster model be replaced? *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2(8):797-806.

Steward CN Jr, Piatek A, Mahfouz MM (2014) Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12:1006-1014.

Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, 364:1343-1360.

Suprema Corte de Justicia de la Nación, Tesis Jurisprudencial (2002) accesado en línea el 20-05-2018, <http://suprema-corte.vlex.com.mx/vid/jurisprudencial-pleno-jurisprudencia-27193739>

The ENCODE Project Consortium (2013) An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature*, 489(7414):57-74.

The Global Genes Project (2017) recurso en línea de una de las mayores *advocacy associations* sobre enfermedades raras en el mundo, accesado en línea el 24-08-2017. globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/.

The modENCODE Consortium, Roy S, et al (2010) Identification of Functional Elements and Regulatory Circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science*, 330(6012):1787-1797.

Therrell BL, David Padilla C, Loeber JG, Kneisser I, et al (2015) Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Seminars in Perinatology*, 39:171-187.

Tolar J (2015) Translating Genome Engineering to Survival. *Translating Gene Therapy to the Clinic*, 1:1-10.

Trufts University (2017) CRISPR-Cas mechanisms and applications. Recurso en línea revisado el 8 de Enero 2017.

UNICEF México (2017) La Infancia: Los primeros años. Recurso en línea de la UNICEF, accesado el 27-08-2017. www.unicef.org/mexico/spanish/ninos.html

Universidad de Navarra (2017) Capítulo 19. Manipulación genética por transferencia de genes. Anexo: La Conferencia de Asilomar, accesado en línea el 23-08-2017.

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome Editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11:636-646.

Van Ness B (2015) Applications and limitations in translating genomics to clinical practice. *Translational Research*, 168:1-5.

Vassena R, Björn H, Peco R, Guido P, Raya A, Sermon K, Velga A (2016) Genome engineering through CRISPR/Cas technology in the human germline and pluripotent stem cells. *Human Reproduction Update*, 22(4): 411-419.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, et al (2002) The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291:1304-1351.

Weatherall DJ (2003) Pharmacological treatment of monogenic disease. *The Pharmacogenomics Journal*, 3:264-266.

Wade N (2015) Scientists Seek Moratorium on Edit to Human Genome That Could Be Inherited. The New York Times- on line pub. Accesado en línea el 06-11-2017.

Wang H, La Russa M, Qi LS (2016) CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review Biochemistry*, 85:227-264.

Wiley and sons (2017) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide: Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials. Recurso en línea accesado el 25-08-2017, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>

Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S (2013) History of gene therapy. *Gene*, 525(2):162-169.

Wivel NA, Walters L (1993) Germ-line genetic modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262(5133):533-538.

World Health Organization (2011) Closing the gap: policy into practice on social determinants of health, Discussion paper. 1-46.

World Health Organization (2016) International Classification of Diseases-10. Revisado en línea el 22-08-2017. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en>

World Health Organization (2017) World Health Statistics 2017: Monitoring health for the SDGs. *Global Observatory Data*. Recurso en línea, accesado el 24-08-2017. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/EN_WHS2017_Part2.pdf

Yamamoto KR, Weissman JS, Sternberg SH, Puck J, Martin GS, Jinek M, Fenner M, Doudna JA, Daley GQ, Corn JE, Church G, Charo RA, Carroll D, Botchan M, Berg P, Baltimore D (2015) A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 348(6230):36-38.

Yung-Wong GK, Chiu AT (2010) Gene Therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: Applications in monogenic disease treatment. *Biotechnology Advances*, 28:715-724.

Zhang F, Platt RJ, Turitz-Cox DB (2015) Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nature Medicine*, 21(2):121-131.