

***TRABAJO DE FIN DE
MÁSTER***

en

***Biología y Tecnología Aplicada
a la Reproducción Humana
Asistida***

**USO DE LA HERRAMIENTA CRISPR-
CAS9 EN EMBRIONES HUMANOS:
IMPLICACIONES TÉCNICAS Y ÉTICAS**

Autor: Paula Olmo Blanes

Tutor: Marga Esbert Algarni

Alcobendas, Septiembre 2024

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Abstract..... | 3 |
| 2. Objetivos..... | 4 |
| 3. Material y métodos | 4 |
| 4. Introducción a la técnica CRISPR-Cas9..... | 5 |
| 4.1. Historia y desarrollo de la técnica | 5 |
| 4.2. Principios y funcionamiento de CRISPR-Cas9 | 7 |
| 4.2.1. Elementos clave del sistema CRISPR-Cas9..... | 7 |
| 4.2.2. Reconocimiento del DNA | 8 |
| 4.2.3. Reparación del DNA y modificación genética..... | 8 |
| 4.2.4. Aplicaciones | 9 |
| 4.2.5. Funcionamiento de CRISPR-Cas9 | 10 |
| | 11 |
| 5. Aplicaciones de CRISPR-Cas9 en reproducción asistida humana..... | 12 |
| 5.1. Edición genética para prevenir enfermedades genéticas hereditarias | 12 |
| 5.2. Mejora de la fertilidad y la viabilidad embrionaria | 13 |
| 5.3. Desafíos y limitaciones en la aplicación de CRISPR-Cas9 en embriones humanos..... | 13 |
| 5.4. Eficiencia y precisión de la técnica CRISPR-Cas9 | 16 |
| 6. Investigaciones y avances recientes en la edición genética de embriones humanos | |
| 17 | |
| 6.1. Avances experimentales relevantes | 17 |
| 6.2. Actualidad sobre edición de embriones humanos con CRISPR-Cas9. | 18 |
| 7. Consideraciones éticas y legales de la edición genética de embriones humanos... | 19 |
| 7.1. Visión mundial | 19 |
| 7.2. Visión española y europea..... | 21 |
| 7.2.1. Visión española..... | 21 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 7.2.2. Visión Europea | 22 |
| 8. Discusión y conclusiones..... | 23 |
| 9. Referencias | 24 |

1. Abstract

CRISPR-Cas9 es una técnica de edición genética que se ha consolidado como una herramienta revolucionaria en biomedicina. El presente trabajo de final de máster tiene como objetivo analizar la aplicación de la tecnología CRISPR-Cas9 para la edición genética en embriones humanos, evaluando tanto su capacidad para introducir cambios en el genoma como los aspectos éticos, sociales y legales involucrados en su utilización. A través de una revisión bibliográfica se ha podido elaborar un marco teórico del funcionamiento de la técnica, su aplicación en reproducción y a su vez las limitaciones técnicas que se encuentran. Además de su funcionamiento y composición, se analizan aspectos de carácter más social y legal debido al gran debate ético que supone la edición genética de embriones humanos. El estudio concluye con la importancia de seguir mejorando el desarrollo de la técnica para resolver los problemas técnicos y éticos que existen actualmente ya que sería un gran beneficio para la prevención de enfermedades genéticas.

Palabras Clave: CRISPR-Cas9, embriones humanos, ética, genética.

2. Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Máster se plantea con una serie de objetivos basados en el análisis del conocimiento científico actual sobre la edición genética de embriones humanos mediante la técnica CRISPR-Cas9. En primer lugar, se pretende comprender en profundidad el mecanismo de acción de esta herramienta, así como su origen y evolución desde su descubrimiento hasta su aplicación en biomedicina. A lo largo del trabajo, también se aborda el estudio de los riesgos técnicos asociados a su uso, identificando sus principales limitaciones y los posibles efectos no deseados que pueden derivarse de su aplicación en etapas tempranas del desarrollo embrionario.

Otro de los objetivos centrales consiste en analizar el estado actual de la investigación en este campo, revisando los estudios más relevantes y recientes que han explorado la viabilidad, eficacia y seguridad de CRISPR-Cas9 en embriones humanos. Esta revisión crítica se complementa con la exploración de las implicaciones éticas, legales y sociales que plantea el uso de esta tecnología en la edición genética de seres humanos, un aspecto especialmente relevante dada la complejidad y sensibilidad del tema.

Además, se marca un objetivo en relación con la metodología del trabajo bibliográfico, que consiste en aprender sobre el proceso de cribado de información y análisis de varios artículos.

3. Material y métodos

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica. Inicialmente, se realizó una exploración general del tema para, posteriormente, definir unos objetivos principales. La búsqueda se realizó utilizando un algoritmo de búsqueda con palabras clave relacionadas con la edición genética y embriones humanos, como: *genom editing, CRISPR-Cas9, human embryos, y gene modification*. en webs como *Google Scholar, Web of Science, PubMed o más específica Fertility and serility*.

En lo que respecta a las investigaciones sobre la modificación genética en embriones, se filtraron artículos que abordaran específicamente **embriones humanos**, evitando inicialmente aquellos centrados en modelos animales. Sin embargo, para entender todo el proceso de CRISPR-Cas como técnica se volvió a hacer una búsqueda añadiendo bacterias y archeas para encontrar de donde proviene CRISPR-Cas9 y como se ha llegado a la actualidad.

La búsqueda incluyó artículos sobre embriones, aplicando un filtro temporal desde el año 2020 con el fin de asegurar la actualización de la información, aunque también se tuvieron en cuenta artículos en los que se refería al descubrimiento de la técnica a finales de la década de los 80.

4. Introducción a la técnica CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 representa un hito en la biología molecular debido a su capacidad para modificar el DNA con alta precisión. Su impacto se ha extendido a diversos campos como la medicina, la biotecnología y la investigación científica. Sin embargo, su uso también ha generado un intenso debate ético sobre sus posibles implicaciones y riesgos.

En el actual campo de la biotecnología, pocos descubrimientos han generado tanto impacto y cambio. Esta herramienta se originó a partir del estudio de los mecanismos de defensa de las bacterias, donde fue identificada como un componente clave de su sistema inmunológico adaptativo. Su desarrollo, ha pasado de ser de interés biológico a convertirse en fundamental para la investigación y los estudios de la modificación genética.

4.1. Historia y desarrollo de la técnica

Lo que actualmente conocemos como la técnica CRISPR-Cas9 tiene su origen en una serie de investigaciones de finales del siglo XX. En 1987, un grupo de investigadores en Japón identificaron la presencia de secuencias repetitivas en el DNA de *Escherichia coli*. (Ishino et al., 1987). En esos momentos aún no se sabía la función de estas ni la importancia biológica que supondría un gran avance en la investigación genética. En 1995 Francisco Mojica detectó estructuras similares en arqueas y sugirió que podrían formar parte de un sistema inmunológico común y desconocido (Mojica et al., 1995).

A partir de esta hipótesis se empezaron a realizar una serie de investigaciones sobre el estudio del mecanismo de defensa adaptativo de las bacterias. A partir de ahí en 2002 R.Jansen definió como CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) estas secuencias y estableció la relación con los genes que daban a las proteínas conocidas como Cas. (Jansen et al., 2002).

Entre 2005 y 2007 el papel de CRISPR como mecanismo inmunológico en bacterias y arqueas se confirmó. Durante estos años Mojica y otros investigadores demostraron que CRISPR era capaz de almacenar fragmentos de DNA viral, lo que podía ser un tipo de “memoria inmunológica” que permite a los microorganismos reconocer y defenderse de futuras infecciones (Mojica et al., 2005). Otro grupo de investigación demostró experimentalmente como el sistema CRISPR-Cas9 identificaba y eliminaba material genético de virus invasores (Barrangou et al., 2007).

No fue hasta 2012 – 2013 cuando se propuso CRISPR-Cas9 como una herramienta de edición genética. Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna pudieron simplificar el sistema y adaptarlo, utilizándolo para la manipulación genética (Jinek et al., 2012) y demostraron el funcionamiento de CRISPR-Cas9 como una semejanza a unas “tijeras moleculares” capaces de cortar y modificar el DNA con una gran precisión (Charpentier y Doudna., 2014).

Gracias a este trabajo, esta nueva tecnología puede ser utilizada en múltiples áreas de la biotecnología, permitiendo realizar cortes en secuencias específicas de DNA.

Aunque no fue hasta los estudios de George Church y Feng Zhang en 2013 que se demostró que CRISPR-Cas9 tenía capacidad para editar material genético de células humanas, hecho que marcó un antes y un después en la investigación genética (Cong et al., 2013).

En 2015 se desarrollaron unas variantes que mejoraron la especificidad del sistema, una de estas mejoras fue Cas9 mutantes que reducen cortes no deseados o la versión dCas9, una modificación que permite la regulación de la expresión de los genes sin tener que modificar directamente el DNA. (Kiani et al., 2015). También se empezó a introducir editores de bases que posibilitan la modificación de nucleótidos sin tener que cortar la doble hélice (Komor et al., 2016).

Al siguiente año en China se probó la técnica en humanos al aplicarla en pacientes de cáncer de pulmón. En estos ensayos los investigadores modificaron las células inmunitarias para hacerlas más efectivas contra tumores. Este hecho generó un gran debate ético y creó controversia sobre las cuestiones de seguridad de CRISPR-Cas9 aplicada a humanos (Cyranoski, 2016).

En 2018 el científico chino He Jiankui anunció unos hechos que indignaron a la comunidad científica y conllevo que se plantearan ciertas regulaciones éticas sobre el uso de CRISPR-Cas9. Jiankui utilizó la técnica para modificar dos embriones de dos niñas, Lulu y Nana, para poder hacerlas resistentes al VIH. Este experimento llevo al científico a ser condenado a prisión y se efectuaron medidas éticas más estrictas para controlar este tipo de investigaciones en un futuro (Greely, 2019).

En 2020 se reconoció el trabajo de Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, y recibieron el Premio Nobel de Química en 2020 por su contribución en el campo de la biología molecular. Un descubrimiento que consolidó a CRISPR como una herramienta fundamental en la investigación y en aplicaciones médicas (The Nobel Prize, 2020).

A partir de 2021 las aplicaciones de CRISPR-Cas9 han seguido estudiándose y han aparecido variantes como las proteínas Cas12 y Cas13, que permiten modificar RNA en vez de DNA. También se ha avanzado en el desarrollo e investigación de terapias génicas.

Actualmente siguen en debate temas de regularización, legalización y éticos sobre los usos de esta tecnología. Mientras siguen las investigaciones para tratar enfermedades o síndromes como serían el síndrome de Down.

4.2. Principios y funcionamiento de CRISPR-Cas9

El principio fundamental del funcionamiento de CRISPR-Cas9 está basado en el sistema inmunológico adaptativo de bacterias y arqueas. Estas células tienen la capacidad de identificar, almacenar y defenderse contra infecciones virales modificando su DNA.

4.2.1. Elementos clave del sistema CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 debe tener unos elementos para su correcto funcionamiento:

Secuencias CRISPR: Fragmentos de DNA repetitivos separados por segmentos de material genético viral previamente capturado.

RNA guía (sgRNA): Molécula sintética diseñada para dirigir la proteína Cas9 hacia la secuencia de DNA que se desea modificar.

Proteína Cas9: Actúa como una nucleasa, realizando cortes en el DNA en el sitio específico indicado por el RNA guía.

Secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif): Pequeño segmento de nucleótidos junto a la secuencia objetivo, necesario para que Cas9 realice el corte con precisión (Hsu, Lander y Zhang, 2014).

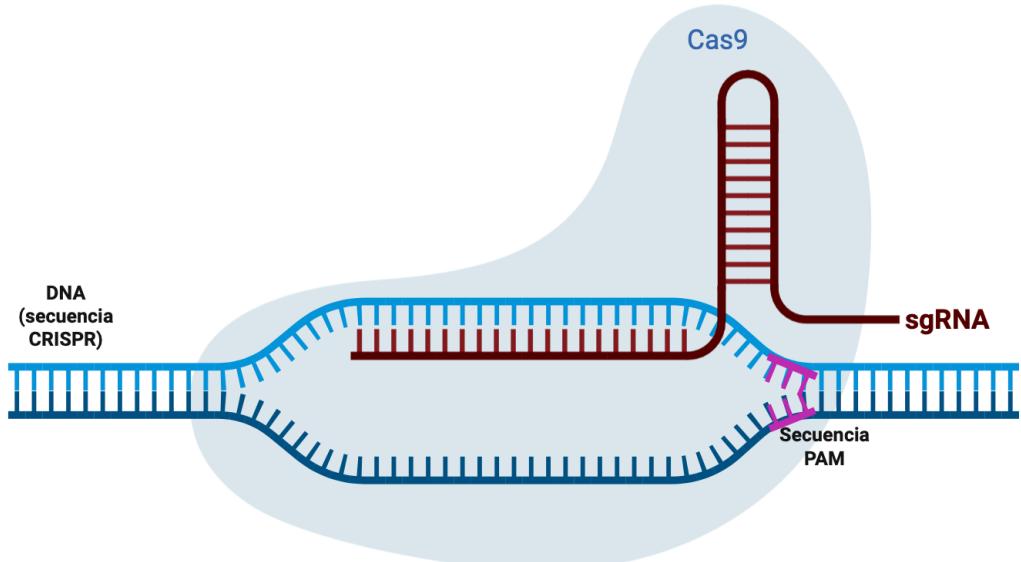


Figura 1: Representación de los elementos clave del mecanismo CRISPR-Cas9. Realizado con Biorender

Para reconocer el DNA CRISPR-Cas9 ha de modificar el RNA guía complementando la secuencia objetivo. Este proceso es el que permite dirigir la edición genética con precisión gracias a que es específico. Cuando se consigue tener identificado el segmento de DNA Cas9 se une y “corta” ambas hebras de la doble hélice. Este proceso permite la rotura del genoma que será reparada después por mecanismos naturales de la propia célula, permitiendo su modificación genética (Zhang, F et al., 2015). Aunque es una muy buena herramienta aun encontramos algunos fallos donde Cas9 realiza cortes no deseados en ciertas regiones del DNA.

4.2.3. Reparación del DNA y modificación genética

Cuando ya se ha realizado el corte, las células activan el mecanismo de reparación. Para este proceso tenemos dos principales vías que determinan como será el resultado de la edición:

- **NHEJ (unión de los extremos no homólogos):** en este mecanismo los extremos rotos se unen sin necesidad de una secuencia molde. Al no tener un molde es más probable que genere inserciones o eliminaciones de nucleótidos, lo que resulta en una desactivación del gen.

- **HDR** (recombinación homologa): utiliza una secuencia molde para reparar el DNA de forma dirigida, haciéndola más precisa. Se puede proporcionar un fragmento de DNA sintético con una modificación deseada y se incorporará a la célula en el sitio de corte (Doudna y Charpentier., 2014).

La elección del tipo de mecanismo dependerá del objetivo final, NHEJ es más eficiente y HDR en cambio permite un mejor control en las modificaciones.

4.2.4. Aplicaciones

La tecnología de CRISPR-Cas9 actualmente está siendo utilizada en distintos campos como la biomedicina, genética o agricultura:

- **Biomedicina:** investigaciones para permitir la corrección de enfermedades genéticas hereditarias como la fibrosis quística y la anemia falciforme.
- **Investigación genética:** se están creando modelos celulares y animales para el estudio de enfermedades.
- **Terapia génica:** trabajos para desarrollar tratamientos personalizados para condiciones genéticas específicas.
- **Agricultura:** se modifican cultivos para aumentar su resistencia a plagas y mejorar su rendimiento.

CRISPR-Cas9 tiene un gran potencial, pero en el contexto actual se encuentra con grandes desafíos técnicos y éticos, en especial las investigaciones que se relacionan con la genética humana.

4.2.5. Funcionamiento de CRISPR-Cas9

El funcionamiento de CRISPR-Cas9 se divide en cinco fases:

- Diseño del RNA guía

La primera fase consiste en diseñar un RNA guía, conocido como sgRNA. Este RNA tiene que ser complementario a la secuencia que tenemos como objetivo en el genoma que queremos modificar. Este indicará a Cas9 donde se realizará el corte en el DNA. El sgRNA se compone de:

Región espaciadora: zona de aproximadamente 20 nucleótidos y que será la complementaria a la secuencia de DNA.

Región estructural: será la zona que se unirá a la proteína Cas9 y facilitará su actividad.

De este RNA dependerá mucha de la precisión que rengamos en CRISPR-Cas9, si no se dirige de forma correcta a la secuencia deseada, podría generar cortes erróneos, lo que conocemos como efectos fuera del objetivo u off-target effects (Hsu, Lander y Zhang, 2014).

- Unión de Cas9 al RNA guía

El segundo paso después de tener el sgRNA consiste en unirlo con la proteína Cas9 formando un complejo activo. Cas9 es una nucleasa, las nucleasas son encimas que tienen como una de sus funciones degradar los ácidos nucleicos (cortar DNA o RNA). Esta función en Cas9 depende de una estructura llamada dominio de corte, que le permite separar la doble hélice del DNA (Jinek et al., 2012).

- Localización de la secuencia objetivo

Cuando se tiene el complejo RNA-Cas9 dentro de la célula, este empieza a buscar la secuencia objetivo. Cas9 solo cortará el DNA que encuentre coincidencia con el sgRNA y que además deberá contener un motivo especial (fragmento de nucleótidos adyacente a la secuencia objetivo) en este caso PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). PAM actúa como una especie de “marca” que le indica a Cas9 que la secuencia del DNA es la correcta. Sin esta secuencia Cas9 no se activará. Este paso es crucial para evitar modificaciones erróneas en el genoma (Doudna y Charpentier, 2014).

- Corte del DNA

Una vez se ha identificado la secuencia y se verifica la presencia de PAM, se procede a realizar el corte de la doble hélice. Este corte se realizará utilizando dos de los dominios de la nucleasa:

RuvC: corta una hebra del DNA.

HNH: corta la otra hebra del DNA.

Después del corte, la rotura que interrumpe la secuencia genética permite a los investigadores modificar el genoma eliminando o insertando fragmentos de DNA en el sitio de corte (Zhang, X et al., 2015).

- Reparación del DNA

Al finalizar la edición del DNA después del corte con Cas9, la célula activará sus mecanismos de reparación, NHEJ o HDR para unir los extremos que han sufrido la rotura. La elección del método de reparación dependerá de los objetivos finales de la edición.

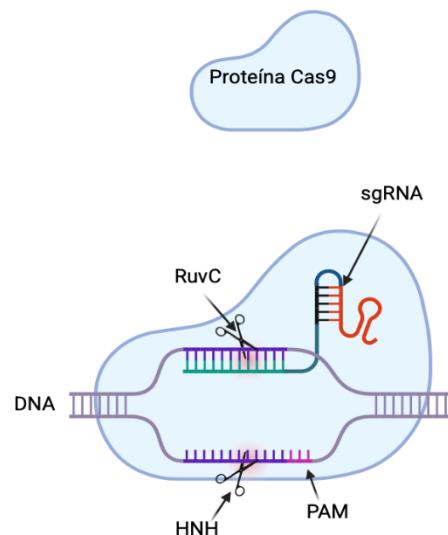


Figura 2: Mecanismo de Cas9 para hacer el corte del DNA. Realizado con Biorender

CRISPR/Cas9 Edición de un Gen

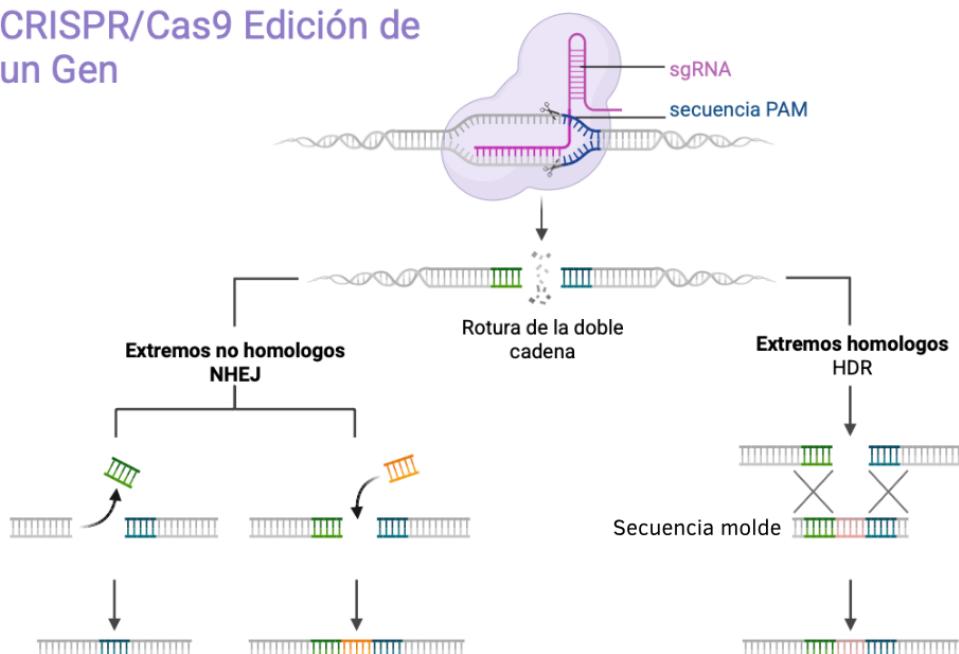


Figura 3: Diagrama de la rotura y las posibles reparaciones de la doble cadena con el uso de CRISPR-Cas9. Realizado con Biorender, se ha utilizado una plantilla de guía: Addgene. (2017) Chapter 3: Using CRISPR in Your Experiments. CRISPR 101: A Desktop Resource.

5. Aplicaciones de CRISPR-Cas9 en reproducción asistida humana

En el campo de la reproducción asistida humana la técnica CRISPR-Cas9 ha abierto un amplio ámbito de investigación, dando nuevas perspectivas a la prevención de enfermedades genéticas y a la mejora de la calidad embrionaria. Aunque las investigaciones son recientes y aún hay un amplio debate, el uso potencial de CRISPR-Cas9 para la edición de embriones humanos permitiría la corrección de mutaciones patogénicas antes de la implantación, que supondría una solución a la transmisión de enfermedades hereditarias graves. Se optimizaría la selección embrionaria al reducir la carga genética negativa y aumentaría la viabilidad de algunos embriones. Para todas las aplicaciones relacionadas con la reproducción asistida humana hay discusiones entorno a los límites éticos y morales de su uso e implicaciones sociales como sería la modificación con fines de “mejora genética” o “diseño de bebés” que marcan una necesidad de regular estas acciones (Nuffield Council on Bioethics, 2018).

5.1. Edición genética para prevenir enfermedades genéticas hereditarias

Prevenir las enfermedades genéticas monogénicas con CRISPR-Cas9 es uno de sus objetivos más prometedores en reproducción asistida. Enfermedades monogénicas bien caracterizadas, como la distrofia muscular de Duchenne, la beta-talasemia, la fibrosis quística o la de Huntington que tienen una base genética caracterizada, con CRISPR-Cas9 se identifica y edita la mutación responsable en las primeras etapas del desarrollo embrionario, permitiendo eliminar el factor monogénico causante (Barrangou y Horvath, 2017).

Esta posibilidad de corregir y eliminar las mutaciones antes del desarrollo del embrión implantado representa una alternativa innovadora en frente del actual diagnóstico genético preimplantacional (DGP), que solo selecciona e implanta los embriones no afectados. Un estudio en 2017 demostró que la corrección de una mutación que causaba miocardiopatía hipertrófica en embriones humanos podía ser corregida mediante CRISPR-Cas9 y no daba evidencia de mosaicismo en un 66'7% de los embriones editados en un primer estudio y de un 72% en un segundo estudio (Ma et al., 2017).

Hay que tener en cuenta que, junto con estos avances, también aparecen interrogantes sobre la seguridad del procedimiento y el riesgo de obtener off target effects en regiones no deseadas, creando nuevas mutaciones que puedan causar consecuencias desconocidas al futuro individuo (Hsu, Lander, y Zhang, 2014).

Del mismo modo, las modificaciones creadas en el embrión implicarán también introducir el cambio en las generaciones futuras, hecho que añade más debate ético. La OMS junto con otros organismos han subrayado la necesidad de crear un consenso global (OMS, 2021).

5.2. Mejora de la fertilidad y la viabilidad embrionaria

La técnica CRISPR-Cas9 no solo se limita al uso de corrección de errores y mutaciones hereditarias, actualmente presenta un gran potencial en la mejora de la fertilidad y consecuentemente en la viabilidad embrionaria. En los tratamientos en reproducción asistida, especialmente en fecundación in-vitro, uno de los principales problemas es la baja tasa de implantación embrionaria, que puede ser causado por anomalías genéticas o epigenéticas que afectan al desarrollo temprano del embrión (Pokrzywinski et al., 2021).

En estos casos CRISPR-Cas9 puede utilizarse para intervenir en los genes que regulan el desarrollo embrionario temprano, mejorando su capacidad de división, desarrollo e implantación. Algunos estudios han mostrado que la edición de los genes PLZF o KDM1A, que están implicados en la renovación de células germinales y en la capacidad de la pluripotencia, podrían mejorar la calidad de los gametos y por tanto de los embriones (Wei et al. 2023).

A esta función se le puede añadir la capacidad de CRISPR de detectar y eliminar a los embriones que contengan anomalías cromosómicas y por tanto ayudando a la selección.

5.3. Desafíos y limitaciones en la aplicación de CRISPR-Cas9 en embriones humanos

La aparición de CRISPR y su utilización en embriones humanos ha sido una gran innovación, pero también han aparecido desafíos y limitaciones tanto a nivel técnicos y biológico, como ético que hay que tener en cuenta.

Desafíos técnicos

El principal problema técnico de esta técnica son los *off-target effects*, o efectos fuera del objetivo. Esto sucede cuando el mecanismo CRISPR-Cas9 corta secuencias del genoma que son similares a las zonas diana deseadas, pero no son idénticas. Estos errores pueden producir mutaciones no deseadas que podrían ser dañinas o incluso silenciosas heredables a futuras generaciones (Zhang, X et al., 2015).

Además, encontramos una variabilidad en la eficiencia del corte dependiendo de la secuencia genética objetivo y del diseño del sgRNA. No todas las zonas genéticas son igual de accesibles no se cortan con la misma eficacia, lo cual también puede provocar mutaciones incompletas o inestables (Lino et al., 2018). También se podrían originar respuestas distintas según el tipo de célula o el momento del desarrollo embrionario en el que aplicamos la técnica.

En estos desafíos técnicos también encontramos que, aunque se han probado diferentes métodos como la microinyección, la electroporación o el uso de vectores virales, todas conllevan a un daño celular que podría poner en riesgo la integración genómica (Gaj et al., 2013).

Desafíos biológicos

En el ámbito biológico, el principal inconveniente es el mosaicismo. Estos casos donde tenemos una mezcla de células afectada y no afectadas, también preocupa si ocurre una mezcla de células editadas y no editadas. Este fenómeno afectaría sobre todo en etapas posteriores al desarrollo ya que puede afectar a la funcionalidad de órganos o tejidos y dificulta el estudio de los efectos fenotípicos de la edición (Ma et al., 2017).

Biológicamente también resulta crítica la respuesta celular al daño en el DNA al producir el corte en la doble cadena. Aunque CRISPR-Cas9 activa mecanismos de reparación como NHEJ o HDR, estas rutas podrían introducir algún error y crear un daño irreparable (Kosicki et al., 2018).

Por último, en el ámbito biológico existe la incertidumbre sobre las consecuencias epigenéticas que podría causar la edición genética. Aunque se modifique una sola secuencia no está asegurado que esto no altere la regulación de genes vecinos o relacionados y que puedan aparecer expresiones génicas inesperadas. Estos cambios epigenéticos aún son difíciles de predecir y podrían afectar a la salud del futuro humano o su descendencia (O'Geen et al., 2019).

Desafíos éticos

La ética entorno a la edición genética es un gran desafío en todos sus ámbitos, pero en lo que corresponde a la edición de embriones humanos todavía se complica más. El debate actual gira en torno a la legitimidad de modificar el genoma humano heredable, la línea entre el tratamiento y la mejora del embrión y los riesgos que aparecen de injusticia social y biotecnológica.

En la legitimidad a diferencia de terapias donde se trabaja en células somáticas y por tanto solo en el paciente, la edición embrionaria afecta también a las futuras generaciones que podrían presentar errores o consecuencias no previstas que podrían ser irreversibles (Nuffield Council on Bioethics, 2018).

El debate sobre que consideramos tratamiento y que consideramos mejora es uno de los más comentados, ya que, aunque corregir mutaciones patológicas puede considerarse un objetivo terapéutico válido, utilizar CRISPR-Cas9 para seleccionar o modificar características como el aspecto físico en el terreno de “mejora genética” o “bebés de diseño”, es un concepto actualmente rechazado por la comunidad científica internacional (Baylis, 2019).

Este proceso plantea unos riesgos de injusticia social y biotecnológica ya que crearía una división entre las personas que se puedan permitir pagar para poder modificar sus embriones y las que no. En este mismo ámbito se crearían diferencias entre los individuos mejorados genéticamente y los que no, al igual que plantea la película *Gattaca de 1997*, y plantea nuevas opciones de eugenesia (Gyngell et al. 2019).

Actualmente, la mayoría de las organizaciones internacionales como la OMS, la UNESCO y el consejo de Europa, han insistido en mejorar la edición germinal hasta que se logre un consenso ético científico y legal sobre su aplicación (OMS, 2021). En 2019, un comité convocado por la OMS concluyó que ningún país debería permitir el uso de edición genética en embriones humanos para reproducción hasta que se establezcan mecanismos regulatorios estrictos, transparentes y supervisados por la comunidad internacional.

5.4. Eficiencia y precisión de la técnica CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 ha mejorado mucho a la eficiencia de la edición genética en comparación a técnicas anteriores como la recombinación homologa dirigida o las nucleasas de dedos de zinc (Doudna y Charpentier 2014). Esta eficiencia se debe a ciertas características de la técnica:

- Aplicable en la mayoría de los tipos celulares y organismos modelo. Esto ayuda a que sea una gran herramienta para estudios genéticos.
- Combinable con mecanismos de reparación celular para hacer estables las modificaciones.
- Tiene capacidad de edición multiplexada lo que permite la intervención de múltiples genes simultáneamente (Zetsche et al., 2017).

Aunque la precisión de CRISPR-Cas9 es muy alta gracias al sgRNA, aun podemos encontrarnos con *off-targets*. Actualmente para mejorar este problema se están desarrollando variantes que puedan ser más precisas como el caso de Cas9-HF1 o eSpCas9, que mejoran estos efectos sin modificar su eficiencia. eficiencia (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016). También se está intentando optimizar el sgRNA para minimizar eventos inespecíficos (Doench et al., 2016) o se están estudiando nucleasas alternativas como Cas12 o Cas13, que proporcionarían una respuesta más selectiva en función del ácido nucleico y el contexto de edición que se requiera (Shmakov et al., 2017).

6. Investigaciones y avances recientes en la edición genética de embriones humanos

6.1. Avances experimentales relevantes

Actualmente y des del 2010, el desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 ha estado impulsando nuevas investigaciones de edición genética de embriones humanos. Aunque muchos de estos estudios se han realizado en embriones no viables, los resultados han demostrado potencial en la edición embrionaria (Liang et al., 2015).

En una de las primeras investigaciones se intentó corregir la mutación del gen HBB en embriones con beta-talasemia. Aunque tuvieron buenos resultados, también reveló problemas de off-target y mosaicismo (Liang et al. 2015). En 2017 se logró modificar el gen MYBPC3, relacionado con una miocardiopatía hipertrófica, en embriones que después resultaron viables. Esto demostró una alta tasa de corrección si introducir DNA externo y reduciendo así el riesgo de mosaicismo o los errores off-target (Ma et al., 2017). Ese mismo año las investigaciones de Fogarty et al. donde empleó CRISPR-Cas9 para estudiar genes clave en el desarrollo embrionario temprano permitieron mapear funciones esenciales de genes implicados en la diferenciación celular y morfogénesis (Fogarty et al., 2017).

La edición genética y los retos que surgen a partir del desarrollo de CRISPR, han dado pie a nuevos enfoques como la base de *editing*, técnicas que permitirían modificar el DNA sin romper la doble cadena. Estas técnicas reducirían los efectos no deseados y los errores de edición. Estas nuevas tecnologías, *base editing* basada en la conversión directa de bases nitrogenadas, o el *prime editing*, que posibilita la inserción, sustitución o eliminación de fragmentos específicos sin rotura, han permitido corregir mutaciones puntuales en células humanas o un mayor control de la edición (Komor et al., 2016; Anzalone et al., 2019).

6.2. Actualidad sobre edición de embriones humanos con CRISPR-Cas9.

Varios científicos han contribuido a las investigaciones sobre la edición del material genético de embriones humanos. Durante la última década se ha avanzado significativamente gracias a varios científicos que han contribuido con diferentes enfoques en este campo, tanto con conocimiento técnico como éticos. A continuación, se presentan algunos de los investigadores relevantes del ámbito y según el foco principal de sus aportaciones.

a) *Aplicaciones directas en embriones humanos: de la teoría a la práctica*

Dos investigadoras europeas han liderado ensayos pioneros sobre la edición del genoma en embriones.

Des de Reino Unido, Kathy Niakan, del Francis Crick Institute, se centró en estudiar el gen OCT4 y obtuvo la primera autorización para editar genomas de embriones humanos. Su estudio del 2016 demuestra la importancia del gen como factor de transcripción en la formación del blastocito. Este descubrimiento evidencia la utilidad de la edición genética para comprender la embriogénesis. (Ledford, 2017).

Por otro lado, en España, la Dra. Anna Veiga ha dirigido una de las primeras investigaciones con CRISPR-Cas9 en embriones humanos tripronucleares no viables para la implantación. Con el objetivo de estudiar los genes implicados en las primeras fases del desarrollo embrionario, utilizando la inactivación de genes concretos, ha contribuido en el proceso de identificar mecanismos clave en la diferenciación celular temprana (IDIBELL, 2020a, 2020b). Ambos trabajos han utilizado embriones no viables para poder seguir un rigor ético y legal.

b) *Estudios sobre mecanismos de reparación del DNA*

En un enfoque sobre como los embriones responden a los tratamientos de edición genética, se encuentra el Dr. Dagan Wells, profesor de Oxford y director científico de Juno Genetics. Las investigaciones de Wells presentadas en el Tercer Congreso Internacional sobre Edición del Genoma Humano, muestran que aproximadamente el 40% de los embriones no logra reparar las roturas de doble cadena realizadas con CRISPR-Cas9 (Wired. 2023). Estos resultados han sido cruciales para insistir en la necesidad de mejorar la precisión de las herramientas utilizadas.

c) Innovación técnica y desarrollo de herramientas avanzadas

Desde un enfoque más tecnológico, dos investigadores estadounidenses destacan por las mejoras en el sistema de CRISPR-Cas9.

Des del Arc Institute y UC Berkley, Partick Hsu, estudia el desarrollo de variantes más precisas de la proteína Cas (Arc Institute, 2024). Aunque el foco de la investigación no es la edición genética de embriones humanos, sus avances dan paso a nuevas vías de investigación donde se pueda aplicar de forma más segura la técnica CRISPR en embriones humanos.

Por otra parte, desde la Universidad de Columbia, Samuel H. Sternberg ha analizado la combinación de CRISPR con transposasas guiadas por RNA, permitiendo una inserción de fragmentos en la cadena más controlada. Estas nuevas herramientas tienen un gran potencial para mejorar la seguridad en el momento de realizar modificaciones en embriones. (Sternberg et al., 2015).

Esta nueva generación de investigadores no solo amplía las posibilidades terapéuticas de la edición genética, sino que también plantea nuevas e importantes dificultades éticas y técnicas que aún se deben resolver. Sus trabajos no deben entenderse de forma aislada, sino como parte de un ecosistema científico en evolución.

7. Consideraciones éticas y legales de la edición genética de embriones humanos

La edición genética ha sido y es un tema muy controvertido a nivel ético y social, sobre todo cuando se trata de seres humanos. Aunque las nuevas tecnologías siguen mejorando, estas limitaciones éticas llevan a temas legales. En la mayoría de los países se prohíben estas técnicas para uso clínico debido a la incertidumbre sobre los efectos a largo plazo que podrían causar (Baylis, 2019; ISSCR, 2021).

7.1. Visión mundial

Mundialmente la edición genética en embriones humanos también está dispuesta a grandes debates. Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la UNESCO recomiendan a los estados abstenerse de permitir aplicaciones clínicas de la edición genética germinal hasta que existan marcos que lo regulen correctamente y sean seguros y equitativos.

Por lo que respecta a potencias mundiales como Estados Unidos o China encontramos varias discrepancias.

EEUU.: Teóricamente la edición genética de embriones humanos con fines reproductivos está prohibida, y la investigación en este ámbito no recibe financiación federal. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) supervisa las investigaciones relacionadas con la edición genética, y cualquier intento de aplicar estas técnicas en humanos requiere su aprobación. Sin embargo, la legislación estadounidense permite cierta flexibilidad en la investigación privada, siempre que no se utilicen fondos federales y se cumplan las regulaciones éticas y de seguridad pertinentes (The New Yorker, 2023).

Australia: Actualmente la legislación australiana es muy clara y estricta con el tema. La *Research Involving Human Embryos Act 2002* y la *Prohibition of Human Cloning for Reproduction Act 2002* prohíben la creación de embriones humanos con fines de investigación sin una licencia específica y la clonación humana con fines reproductivos. Además, está prohibido alterar el genoma de un embrión humano de manera que la alteración sea heredable por la descendencia, con la intención de que así sea. Aunque no mencionan el uso de embriones sobrantes de un tratamiento FIV (Pursuit, 2018).

China: Antes del polémico caso de la edición de embriones para hacerlos resistentes al VIH y el posterior nacimiento de dos niñas por el científico He Jiankui, no tenía unas leyes demasiado estrictas. Actualmente ha reforzado su regulación, en 2021, se introdujeron disposiciones en el Código Civil que prohíben explícitamente la edición del genoma humano con fines reproductivos.

Recientemente en 2024, se han publicado nuevas cuestiones éticas que prohíben la investigación clínica en la edición germinal. (Ministerio de Ciencia y Tecnología de China, 2024)

| Región/Continente | Investigación con embriones humanos | Edición genética germinal | Uso clínico con fines reproductivos | Supervisión ética | ¿Financiamiento público? |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---|-------------------|--------------------------------|
| Europa | Sí con restricciones | Prohibida | Prohibido | Sí | Sí, con limitaciones |
| América del Norte | Sí, EEUU privada. | Prohibida | Prohibido | Sí | Sí en Canadá no en EEUU |
| Asia | Solo en algunos países | Generalmente prohibida | No regulado claramente (excepción de China) | Depende | Sí |
| Oceanía | Sí, Australia funciona con licencias | Prohibida | Prohibido | Sí | Si pero bajo una autorización. |
| África | Poca regulación e información | No hay regulación | Prohibido | Depende | Limitado, normalmente no |
| América del sur | Permitida en pocos países. | No hay regulación | Prohibido | Depende | Limitado, normalmente no |

Figura 4: Tabla resumen de las condiciones por continentes sobre la edición genética de embriones.

7.2. Visión española y europea

7.2.1. Visión española

En España la edición genética está sujeta al marco normativo donde se prioriza la protección de la dignidad humana, la salud pública y la no transmisión de modificaciones genéticas hereditarias. El uso de CRISPR-Cas9 según su legislación, está limitado a contextos de investigación y siempre bajo supervisión ética.

El marco legal vigente es el de la Ley 14/2007 de investigación biomédica. Este establece unos límites para el uso de embriones humanos para investigación. En el artículo 33 se autoriza el uso de embriones sobrantes de técnicas de fecundación in vitro con fines de investigación siempre que se haya dado un previo consentimiento informado de los progenitores y se haya aprobado en un comité ético. Se prohíbe la creación de embriones solo con el fin de investigación (Ley 14/2007, art. 33.2).

Además, la Ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida dicta que no está permitido alterar el genoma de embriones humanos solo con fines reproductivos (Ley 14/2006, art. 26).

7.2.2. Visión Europea

A nivel europeo encontramos al igual que en España un marco legal y bioético donde priorizan la protección de la dignidad humana. A este nivel institucional se han ido adoptando diferentes normativas:

Convenio de Oviedo (1997): Conocido como el *convenio sobre los Derechos humanos y la biomedicina*, que fue elaborado por el Consejo europeo. En su artículo 13 se establece que las intervenciones en el genoma humano serán con fines preventivos, de diagnóstico o terapéuticos. Además, se tendrá que demostrar que no hay riesgo de introducir modificaciones en la descendencia (Consejo de Europa, 1997, art. 13).

Reglamento (UE) 536/2014 sobre ensayos clínicos de medicamentos, en este caso Europa prohíbe la investigación que implique la modificación de la línea germinal humana con fines reproductivos.

Con respecto a la financiación de la investigación en la UE, se sigue el marco de Horizonte 2020 y el actual Horizonte Europa que excluye proyectos que impliquen la modificación hereditaria del genoma humano, la clonación con fines reproductivos o la creación de embriones únicamente con fines de investigación (Comisión Europea, 2021).

También hay que tener en cuenta la Carta de los Derechos Fundamentales de la UE que establece la prohibición de prácticas eugenésicas, por tanto, la “mejora” de los embriones para conseguir “mejores” bebés o con características específicas sin tener un fin terapéutico (Parlamento Europeo, 2012)

8. Discusión y conclusiones

La técnica CRISPR-Cas9 se ha consolidado como una herramienta fundamental en la edición genética y representa un campo de gran interés en la reproducción asistida. Aunque las restricciones éticas y legales impiden actualmente su aplicación clínica en embriones humanos destinados a la transferencia, los avances obtenidos muestran un potencial prometedor para el futuro.

Los esfuerzos de la comunidad científica se orientan principalmente a mejorar la especificidad y la seguridad de la técnica, con el fin de reducir los off-target effects y garantizar un uso más fiable en contextos clínicos. En paralelo, el debate bioético y jurídico continúa siendo esencial para establecer límites claros y un marco regulatorio adecuado.

Este Trabajo de Fin de Máster ha permitido profundizar en la comprensión del mecanismo de acción de CRISPR-Cas9, analizar sus riesgos y limitaciones, y evaluar su impacto en biomedicina. Asimismo, ha favorecido el desarrollo de competencias investigadoras y metodológicas fundamentales para la práctica académica y profesional, consolidando una visión crítica y actualizada sobre uno de los temas más relevantes de la biotecnología contemporánea.

9. Referencias

- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., ... & Liu, D. R. (2020). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arc Institute. (2024). *Hsu Lab*. <https://arcinstitute.org/labs/hsulab>
- Barrangou, R., & Horvath, P. (2017). *A decade of CRISPR-Cas9: biology, mechanisms and applications*. *Nature Microbiology*, 2, 17092. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>
- Baylis, F. (2019). Altered inheritance: CRISPR and the ethics of human genome editing. Harvard University Press.
- Charpentier, E., & Doudna, J. A. (2014). *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- China's Ministry of Science and Technology. (2024). *Ethical guidelines for human genome editing research*. https://english.www.gov.cn/news/202407/09/content_WS668d34e4c6d0868f4e8e903e.html
- Comisión Europea. (2021). Horizonte Europa – Programa Marco de Investigación e Innovación (2021–2027). https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding-opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe_en
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Congreso de los Diputados. (2006). *Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida*. Boletín Oficial del Estado, nº 126, 27 de mayo de 2006. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2006-9292>

Congreso de los Diputados. (2007). *Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica*. Boletín Oficial del Estado, nº 159, 4 de julio de 2007. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-12945>

Consejo de Europa. (1997). *Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina: Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina (Convenio de Oviedo)*. <https://rm.coe.int/168007cf98>

Cyranoski, D. (2016). Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*, 535(7613), 476-477. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20302>

Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., ... & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

European Commission. (2014). *Regulation (EU) No 536/2014 of the European Parliament and of the Council on clinical trials on medicinal products for human use*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32014R0536>

Fogarty, N. M. E., McCarthy, A., Snijders, K. E., Powell, B. E., Kubikova, N., Blakeley, P., ... Niakan, K. K. (2017). Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550(7674), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature24033>

Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>

Greely, H. T. (2019). CRISPR'd babies: Human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *Journal of Law and the Biosciences*, 6(1), 111-183. <https://doi.org/10.1093/jlb/lz010>

Gyngell, C., Bowman-Smart, H., & Savulescu, J. (2019). Moral reasons to edit the human genome: Picking up from the Nuffield report. *Journal of Medical Ethics*, 45(8), 514–523. <https://doi.org/10.1136/medethics-2018-105084>

Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

IDIBELL. (2020a). *El IDIBELL y Dexeus Mujer estudiarán el desarrollo embrionario mediante la edición genética de embriones humanos.* <https://idibell.cat/es/2020/02/el-idibell-y-dexeus-mujer-estudiaran-el-desarrollo-embrionario-mediante-la-edicion-genetica-de-embiones-humanos/>

IDIBELL. (2020b). *El proyecto de la Dra. Anna Veiga para poner a punto la edición genética de embriones humanos recibe la Ayuda Merck para la Investigación.* <https://idibell.cat/es/2020/04/el-proyecto-de-la-dra-anna-veiga-para-poner-a-punto-la-edicion-genetica-de-embiones-humanos-recibe-la-ayuda-merck-para-la-investigacion/>

International Society for Stem Cell Research (ISSCR). (2021). *Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation.* <https://www.isscr.org/guidelines>

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product.* Journal of Bacteriology, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.* Molecular Microbiology, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Kiani, S., Beal, J., Cheng, J., Haynes, K., Leon, E. Y., & Weiss, R. (2015). CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells. *Nature Methods*, 12(5), 531-538. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3433>

Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420-424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>

Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology*, 36(8), 765–771. <https://doi.org/10.1038/nbt.4192>

Ledford, H. (2017). *CRISPR used to peer into human embryos' first days*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.22646>

Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., ... Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein & Cell*, 6(5), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>

Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>

Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., ... & Mitalipov, S. (2017). *Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos*. Nature, 548(7668), 413–419. <https://doi.org/10.1038/nature23305>

Mojica, F. J. M., 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(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>

Mojica, F. J. M., Ferrer, C., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1995). *Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea Haloferax mediterranei and Haloferax volcanii and could be involved in replicon partitioning*. Molecular Microbiology, 17(1), 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x

Nuffield Council on Bioethics. (2018). *Genome editing and human reproduction: social and ethical issues*. <https://www.nuffieldbioethics.org/publications/genome-editing-and-human-reproduction>

O'Geen, H., Yu, A. S., & Segal, D. J. (2015). *How specific is CRISPR/Cas9 really?* Current Opinion in Chemical Biology, 29, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.001>

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021). *Informe del Comité Asesor de Expertos sobre la edición del genoma humano*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030381>

Parlamento Europeo. (2012). *Carta de los Derechos Fundamentales de la Unión Europea*. Diario Oficial de la Unión Europea, C 326. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:12012P/TXT>

Pokrzywinski, R. M., Soliman, A. M., Snabes, M. C., Chen, J., Taylor, H. S., & Coyne, K. S. (2021). Responsiveness and thresholds for clinically meaningful changes in worst

pain numerical rating scale for dysmenorrhea and nonmenstrual pelvic pain in women with moderate to severe endometriosis. *Fertility and Sterility*, 115(2), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.07.013>

Pursuit. (2018). *Australia's laws on embryo research and human cloning*. University of Melbourne. <https://pursuit.unimelb.edu.au/articles/australia-s-laws-on-embryo-research-and-human-cloning>

Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>

Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268), 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>

Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2015). Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, 58(4), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>

The New Yorker. (2023). *The complicated ethics of gene editing in human embryos*. <https://www.newyorker.com/science/medical-dispatch/the-complicated-ethics-of-gene-editing-in-human-embryos>

The Nobel Prize (2020). The Nobel Prize in Chemistry 2020 - Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>

UNESCO. (2015). *Report of the IBC on updating its reflection on the human genome and human rights*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000233258>

Wei, Y., Yang, C.-R., & Zhao, Z.-A. (2023). CRISPR/Cas9 technology: Applications in oocytes and early embryos. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04610-9>

Wired. (2023). *Why gene editing in human embryos is still risky, according to scientists*. <https://www.wired.com/story/gene-editing-human-embryos-risky-science/>

Zetsche, B., Heidenreich, M., Mohanraju, P., Fedorova, I., Kneppers, J., DeGennaro, E. M., ... & Zhang, F. (2017). Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, 35(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nbt.3737>

Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2015). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 24(R1), R37–R45. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>

Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S., & Yang, S. H. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4(11), e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>

Zhao, Z., Li, C., Tong, F., et al. (2021). Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. *Biological Procedures Online*, 23, 14. <https://doi.org/10.1186/s12575-021-00151-x>