



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

XIX Semana de Ética y Filosofía Política (AEEFP)
Congreso Internacional AEEFP-SIEU 2018
El Ferrol, 4/10/2018

MESA 9: Sesión 3

**La tecnología CRISPR y su uso en organoides
como sistemas modelo de enfermedades
humanas: aspectos éticos**

Miguel Moreno Muñoz
mm3@ugr.es

Contenido

- **Aspectos científico-técnicos**
 - Interacción compleja en sistemas orgánicos desarrollados
 - Diferencias notables entre modelos animales y biología humana (RRR)
 - Evolución natural del potencial observado en el empleo de células troncales
 - Nuevo rango de aplicaciones posibles (enfs. raras, inmunes, degenerativas...)
- **El potencial de los sistemas CRISPR/Cas9**
- **Desarrollos en la producción de organoides**
 - Ej.: modelos de envejecimiento, modelos de enfermedades genéticas,
- **Aspectos éticos**
 - Cuestiones pendientes en ética de la investigación – fase experimental
 - Aspectos de percepción pública y debate convergentes (IPS, transgénesis, traspl.)

Metodología y enfoque

- **Hipótesis de trabajo**

- El potencial combinado de ambas tecnologías plantea desafíos inéditos éticos específicos, no sólo amplifica los asociados con la ética de la investigación con células troncales e ingeniería genética.

- **Estrategia metodológica**

- Revisión de la literatura (2017-2018) y reacciones de expertos en países con estándares éticos diversos.
- Identificar aspectos específicos de los ensayos clínicos en marcha que emplean ambas tecnologías
- Concretar aspectos que pueden requerir abordajes éticos y epistemológicos novedosos
- Prospectiva y detección de posibles reajustes normativos

Los sistemas CRISP/cas

Aspectos científico-técnicos

Edición genética convencional

(Zhang et al., 2017)

- **Edición genómica**

- Las *tijeras moleculares* (nucleasas) utilizadas habitualmente en ingeniería genética para insertar, eliminar o reemplazar fragmentos de DNA en organismos vivos o en cultivos in vitro tienen una *eficacia baja, un coste relativamente alto y resultan poco específicas*.
- Los **sistemas CRISPR** emergen como alternativa reciente
 - mayor potencial y versatilidad para la manipulación genética
 - Puede usarse en edición genética de procariontas, mamíferos, plantas...
 - eficiencia alta en la edición genética y bajo coste
 - problemas específicos empleados en células troncales y medicina regenerativa

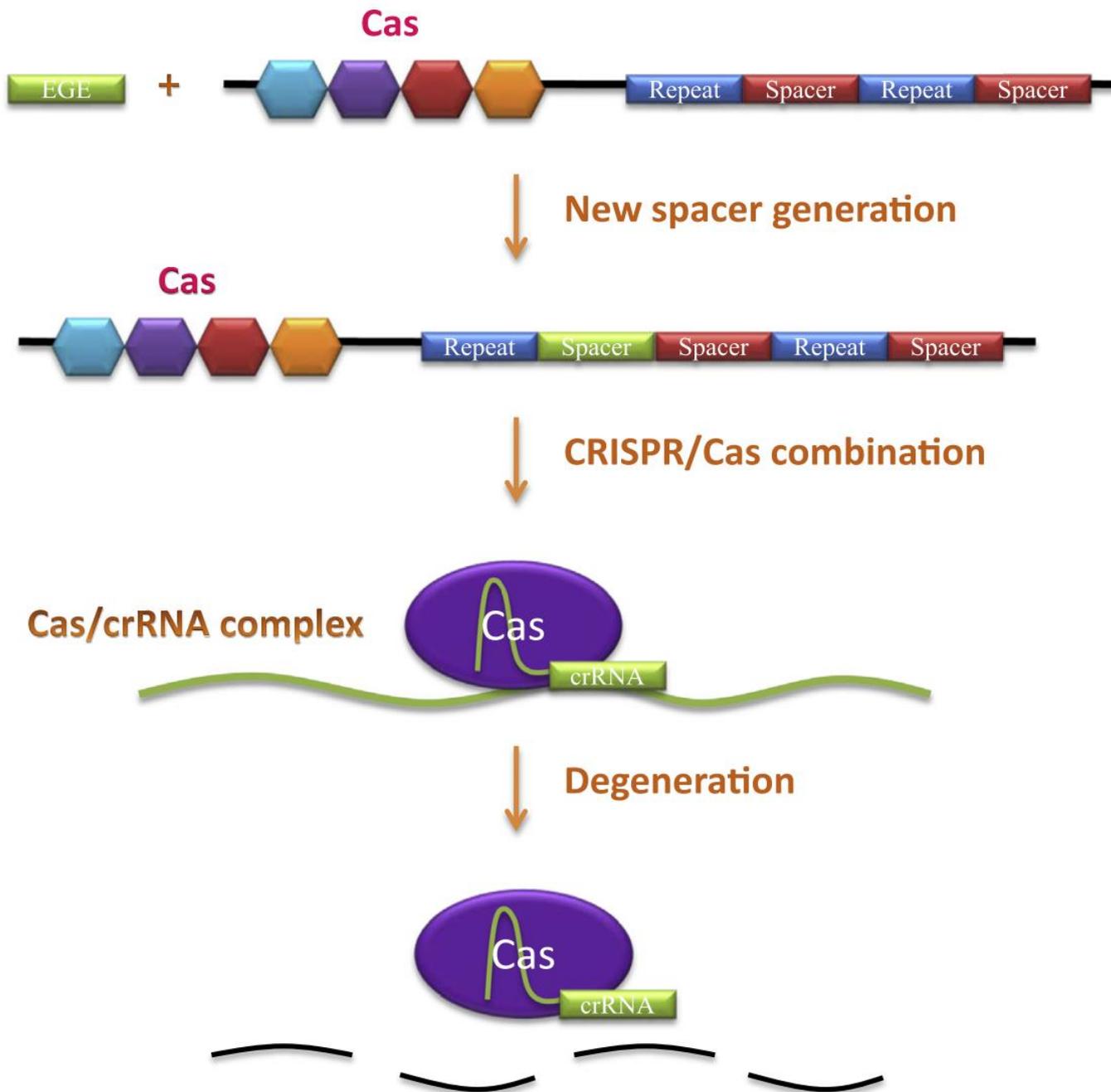


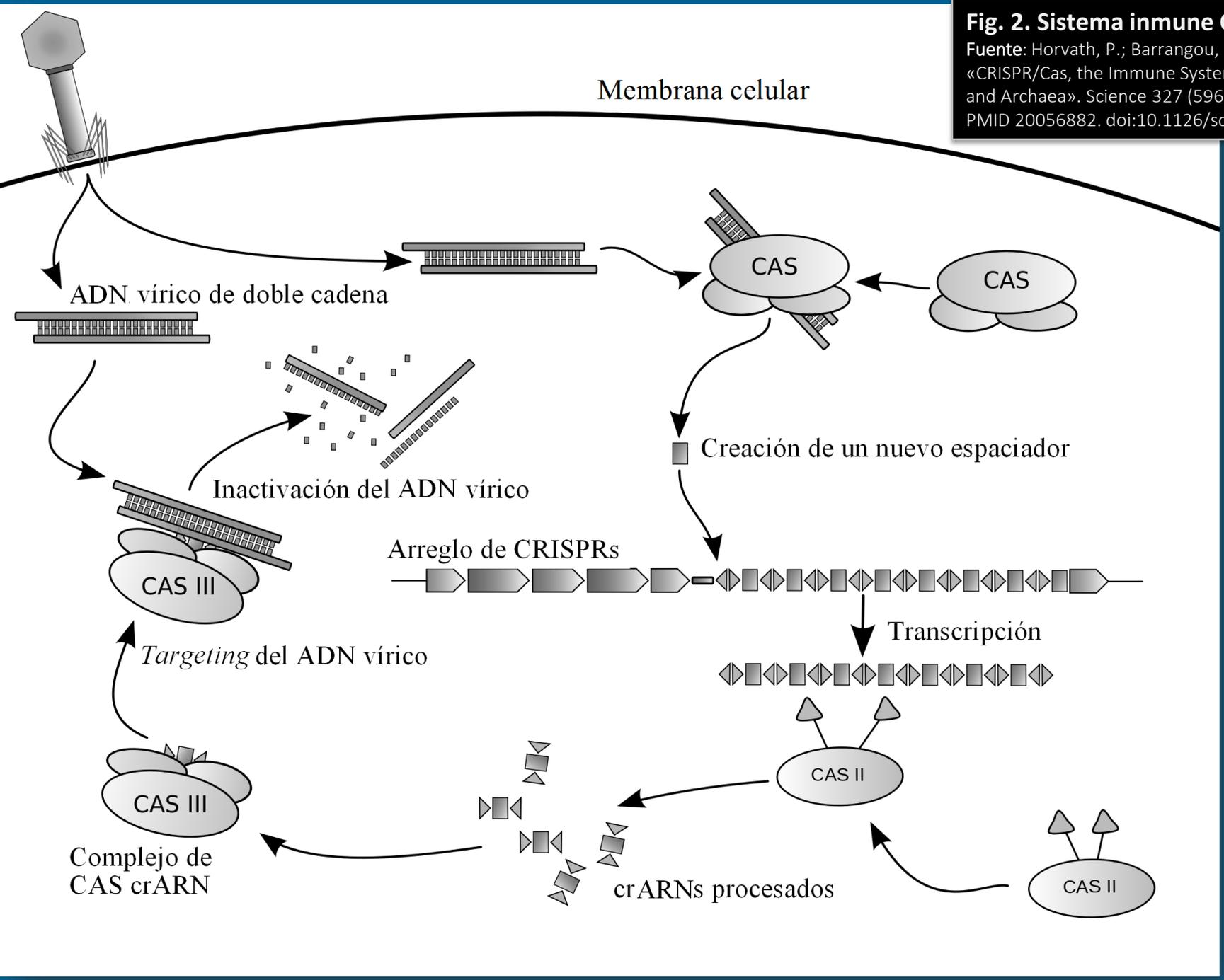
Figura 1.
Sistema inmune
CRISPR-Cas

Cuando un huésped es invadido por elementos genéticos exógenos (EGE), algunos fragmentos se integrarán en los loci CRISPR como un nuevo espaciador que será coexpresado con las nucleasas Cas para formar complejos Cas/crRNA.

Estos complejos pueden identificar y unirse con los mismos EGE durante una invasión posterior, siguiendo la regla de emparejamiento de bases complementarias, y romper finalmente los EGE.

Fuente:
www.moleculartherapy.org

Fig. 2. Sistema inmune CRISPR-Cas
Fuente: Horvath, P.; Barrangou, R. (2010).
«CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea». Science 327 (5962): 167-170.
PMID 20056882. doi:10.1126/science.1179555



Los sistemas CRISPR

- **Definición**

- Los sistemas CRISPR son nucleótidos cortos que aparecen repetidamente en el genoma de bacterias y arqueas.
- Su **función** es **eliminar los elementos genéticos exógenos (EGE) que se combinan con las proteínas Cas.**
- Pasos: integración del nuevo espaciador, combinación CRISPR/Cas y degeneración.
- **CRISPR/Cas9 es la herramienta de edición del genoma más simple con la que se puede trabajar: se basa en el apareamiento de bases de ARN-ADN, más que en la ingeniería de proteínas que se unen a determinadas secuencias de ADN.**
 - A diferencia de las ZFN (proteínas que se unen al ADN y que pueden ser diseñadas para inducir una ruptura de doble cadena en una sección del ADN).
 - Funcionan como tijeras moleculares que **permiten "destruir" genes específicos, reparar una mutación o incorporar un nuevo fragmento de ADN con precisión.**
- En embriones, el éxito no puede comprobarse hasta después del nacimiento.
- En el experimento de **Liang (2015)** los **embriones modificados fueron todos mosaicos.**

Los sistemas CRISP/cas

Aspectos éticos

Empleo de CRISPR/cas9: aspectos éticos

- **Diversos tópicos reeditan el debate de los 90**
 - CRISPR-Cas9 es ahora la herramienta para impulsar descubrimientos y aplicaciones clínicas del conocimiento genético.
 - ¿Tiene sentido abogar por una moratoria en su desarrollo?
 - Mulvihill, J. et al. (2017). Ethical issues of CRISPR technology and gene editing through the lens of solidarity. *British Medical Bulletin*, 122(1), 17–29. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx002>
 - Problemas con la estabilidad genómica de las células manipuladas
 - Patentabilidad, expectativas infundadas... aspectos genéricos de la ingeniería genética y de la experimentación con humanos/animales
 - Otros son más recientes:
 - Levine, S., & Grabel, L. (2017). The contribution of human/non-human animal chimeras to stem cell research. *Stem Cell Research*, 24, 128–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.09.005>
 - Mattis, V. B., & Svendsen, C. N. (2017). Modeling Huntington's disease with patient-derived neurons. *Brain Research*, 1656, 76–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.001>

Empleo de CRISPR/cas9: aspectos éticos

- **Alta demanda de rasgos genéticos a medida**
 - Se remonta al Neolítico, y se reforzó con el paradigma evolutivo (Darwin-Wallace)
 - Adquirió tintes estremecedores con los movimientos eugenésicos y sus efectos normativas: legitimaron programas de esterilización hasta el año 2000.
 - USA, Alemania, Japón, Suecia...(1945-2000)
 - Nuevos motivos de preocupación con el desarrollo de las técnicas de ADN recombinante (1973 >> Asilomar: 1975)
 - El empleo de sistemas CRISPR/Cas9 (12-14 variantes) permite modificar células somáticas y germinales con mucha mayor precisión.
 - Algunos científicos han logrado editar el genoma de un embrión humano con CRISPR/Cas9 (“Spice of life”, *Nature*).
 - Dirigida a un gen en particular, permite corregir/eliminar genes deletéreos y causantes de enfermedades de base genética.
 - El modo más preciso de intervenir en la línea germinal y erradicar genes devastadores:

Al menos 15 ensayos clínicos en marcha

Editing the human genome: balancing safety and regulation, *Lancet* 391 (2018). 402.

- **En China, al menos 86 individuos han participado en ensayos clínicos que implican modificación genética**
- **15 ensayos clínicos en marcha en otros países**
 - mieloma múltiple
 - cáncer de esófago, pulmón, próstata y vejiga
 - tumores sólidos, melanoma
 - leucemia
 - virus del papiloma humano
 - VIH-1; infección gastrointestinal
 - β -talasemia
 - anemia falciforme

Estándares éticos a medida

Liang, P. et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein and Cell*, 6(5), 363–372. doi:10.1007/s13238-015-0153-5

- ***Science y Nature rechazaron el paper de P. Liang***
 - En abril de 2015, un grupo de científicos chinos publicó el uso de CRISPR/Cas9 en un cigoto humano en un intento de erradicar el gen HBB (β -globina humana) de la línea germinal.
 - Generó un intenso debate entre los expertos, centrado en aspectos éticos e implicaciones para las generaciones futuras. Pero bastante convencional:
 - ¿Abrirá la puerta a la producción de bebés de diseño?
 - ¿Quién está autorizado a decidir sobre el destino de los bebés así generados?
 - ¿Qué margen de decisión se le deja a la persona afectada?ñ
 - La posibilidad verosímil de un paradigma de medicina capaz de curar antes de nacer suscita numerosos interrogantes, pero no introduce aspectos éticos inexplorados.
 - Problema: un escándalo puede perjudicar toda la investigación con cél. somáticas
 - Lanphier, E. et al. (2015). Don't edit the human germ line. *Nature*, 519 (7544), 410–411.
<https://doi.org/10.1038/519410a>

Potencial innegable de los sistemas CRISPR

- **Supone un enfoque poderoso para tratar muchas enfermedades humanas**
 - VIH/SIDA, hemofilia, anemia falciforme, β -talasemia, v. tipos de cáncer...
 - Pero las técnicas en alguna etapa de desarrollo clínico se centran en modificar el material genético de las células somáticas (células T, p.ej).
 - No han sido diseñadas ni probadas para afectar espermatozoides /óvulos.
 - Intentar la edición del genoma en embriones humanos con las tecnologías actuales podría tener **efectos impredecibles** en las generaciones futuras.
- **Lanphier, Urnov y cols. (2015): investigación de alto riesgo y éticamente inaceptable**
 - Esta investigación **podría ser explotada para llevar a cabo modificaciones no terapéuticas, y caer de pleno en el debate público por sus connotaciones eugenésicas**, obstaculizando el desarrollo de tratamientos terapéuticos mediante cambios genéticos no heredables.
 - Posición pública previa a la aparición de las primeras aplicaciones

Organoides

Aspectos científico-técnicos

Organoides

Hu, J. L., Todhunter, M. E., LaBarge, M. A., & Gartner, Z. J. (2018). Opportunities for organoids as new models of aging. *The Journal of Cell Biology*, 217(1), 39–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709054>

- **Definición**

- *Órgano en miniatura y simplificado que recrea la estructura fisiológica de los tejidos en 3D y la composición celular in vitro.*
- Ejemplos variados de **sistemas de cultivo in vitro 3D**:
 - fragmentos de tejido cultivados
 - tejidos reconstituidos a partir de células cultivadas y tejidos cultivados a partir de células troncales, generalmente en presencia de proteína ECM.

- **Uso de organoides**

- Responden al principio de que **la estructura y composición de un tejido es relevante para su función** (Simian y Bissell, 2017).

- **Características (varias/todas):**

- Un microentorno fisiológicamente relevante
- Células derivadas de tejidos primarios, células primarias o células madre, en lugar de líneas celulares inmortalizadas
- Células correctamente organizadas entre sí y con respecto a su ECM
- Múltiples tipos de células del órgano original

Bredenoord, A. L., Clevers, H., & Knoblich, J. A. (2017). Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 355(6322), eaaf9414. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9414>

The
Economist



The World
2018

LEADERS

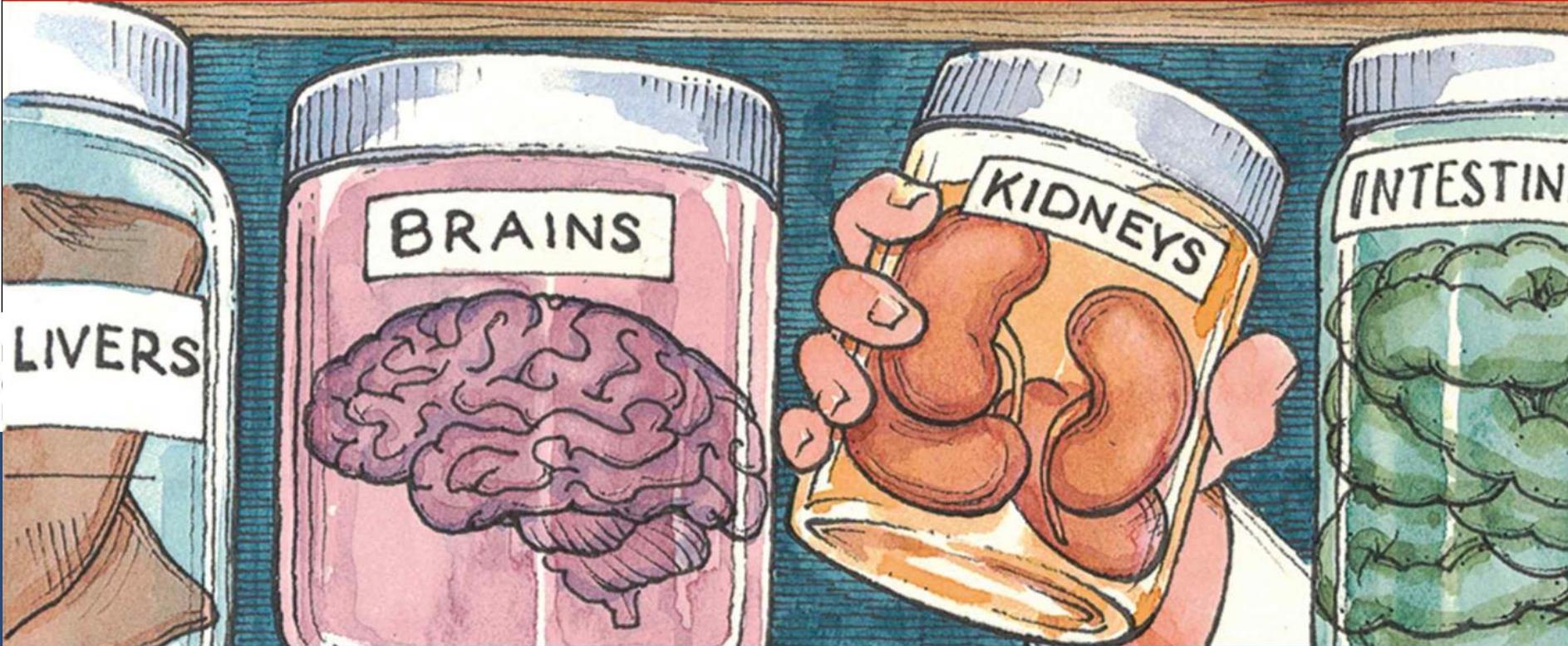
WORLD

BUSINESS & FINANCE

SCIENCE & TECHNOLOGY

CULTURE

EXTRA



The year of the organoid

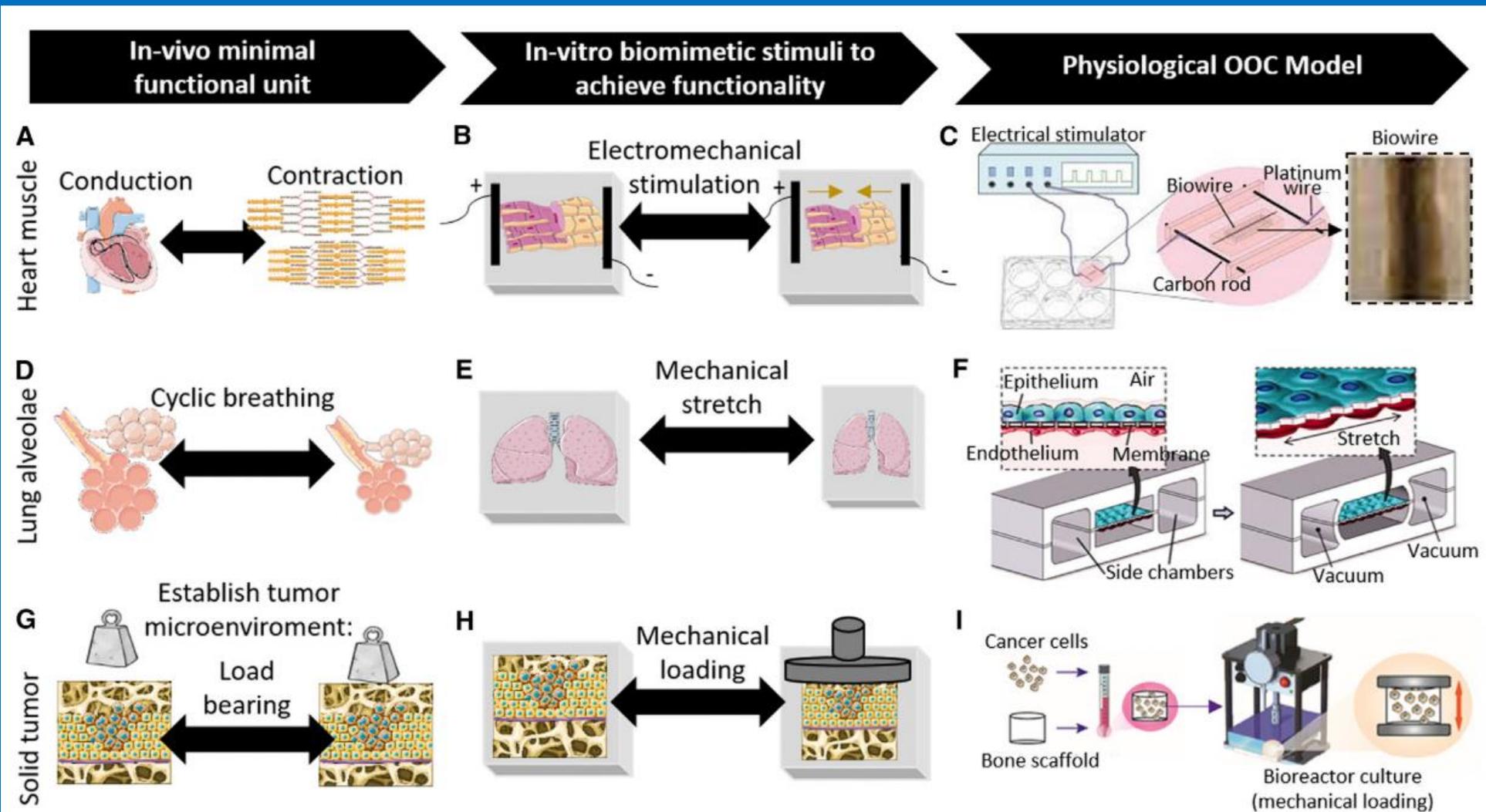
Aplicaciones de los organoides

Hu, J. L., Todhunter, M. E., LaBarge, M. A., & Gartner, Z. J. (2018). Opportunities for organoids as new models of aging. *The Journal of Cell Biology*, 217(1), 39–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709054>

- **Órganos en un chip (OOC):**
 - Tejidos en miniatura y órganos cultivados *in vitro* que permiten modelar la fisiología y las enfermedades humanas.
 - Resultado de avances convergentes en ingeniería de tejidos, fabricación de semiconductores y obtención de células troncales.
- **Ventajas asociadas con los OOC**
 - Gran potencial para emular la patología/fisiología humana *in vitro* y sortear limitaciones de los modelos basados en células troncales hum./anim.
 - El empleo de OOCs abre la posibilidad de potenciar con rapidez desarrollos necesarios en ingeniería de tejidos para su aplicación en el desarrollo de medicamentos y en la medicina de precisión.

Construcción de sistemas para simular funcionalidad

Ronaldson-Bouchard & Vunjak-Novakovic (2018). Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. Cell Stem Cell - <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>



Organoides y tejidos humanos

Bredenoord, A. L., Clevers, H., & Knoblich, J. A. (2017). Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 355(6322), eaaf9414. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9414>

- **Impacto en la investigación de los órganos cultivados a partir de células madre adultas**
 - Plantean problemas éticos específicos.
 - Para proporcionar un suministro constante de tales organoides, las muestras biológicas humanas deben almacenarse en los denominados biobancos vivos, colecciones de biomateriales humanos reunidas con fines de investigación científica médica (10).
 - Para recoger el material, los biobancos utilizan el tejido residual que queda en el proceso de act. clínica, o proporcionado para investigación.
 - Debate ético activo sobre la **ética y la gobernanza de los biobancos**
 - El biobanco de organoides es un nuevo campo prometedor y apasionante con un potencial considerable para la investigación científica, la medicina de precisión y la medicina regenerativa.

Organoides

Aspectos éticos

	Biological considerations	Ethical considerations
Animal models	Modeling of complex organ interactions	Animal research is ethically controversial
	Models include immune system, blood vessels	Reduction, refinement, and/or replacement of animal experiments is a commonly accepted goal
	Results often not transferrable to humans	
Human embryos and fetuses	Experimental limitations include reduced numbers because of low availability	Diversity of views regarding the moral acceptability of using and creating embryos for research
	Necessary for verification of organoid results and human reagents (antibodies)	Most countries allow research on embryonic and fetal tissues under strict conditions
	Organoid research might increase rather than decrease the need	
Organoid models	Close to unlimited availability	No animal experiment, no direct use of human embryos and fetuses
	Reprogramming and genome editing techniques allow unprecedented personalization of experiments	Current culture protocols include animal-derived reagents (Matrigel)
	Limited by variability and lack of predefined axis	Some protocols require the use of human embryonic stem cells
	No blood vessels, no immune system	Organoids might require specific patient consent
	Biobanking necessary for some types of organoids	Biobanking raises specific ethical issues
		Frontier science: specific responsibilities for scientists in the field

Aspectos científicos y éticos en la investigación con modelos animales, tejidos embrionarios humanos y organoides.

Bredenoord et al., *Science* 355, eaaf9414 (2017): 4

Hacia un marco ético con respaldo internacional

Brokowski, C., & Adli, M. (2018). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.044>

- **Impacto en la investigación de órganos cultivados a partir de células troncales adultas**
 - Importancia de actualizar y divulgar las guías de buenas prácticas y estándares internac. en ética de la investigación
 - Exigencia de evaluación ética rigurosa/de calidad en investigación financiada con fondos públicos, como ref.
 - Observatorio internac. sobre desarrollos/aplicacs controver.
 - Red de expertos coordinados, según el modelo del IPCC
 - Intercambio transdisciplinar y entre cults. ético-jurídicas div.
 - Moratorias frecuentes sobre datos/estudios de riesgo limit.

Referencias

- Bredenoord, A. L., Clevers, H., & Knoblich, J. A. (2017). Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 355(6322), eaaf9414.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf9414>
- Brokowski, C., & Adli, M. (2018). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.044>
- Devlin, H. (2017). Crispr inventor Jennifer Doudna talks about discovering the gene-editing tool, the split with her collaborator and the complex ethics of genetic manipulation. Retrieved May 5, 2018, from <https://www.theguardian.com/science/2017/jul/02/jennifer-doudna-crispr-i-have-to-be-true-to-who-i-am-as-a-scientist-interview-crack-in-creation>
- Krishan, K., Kanchan, T., & Singh, B. (2016). Human Genome Editing and Ethical Considerations. *Science and Engineering Ethics*, 22(2), 597–599. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9675-8>
- Levine, S., & Grabel, L. (2017). The contribution of human/non-human animal chimeras to stem cell research. *Stem Cell Research*, 24, 128–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.09.005>
- Snyder, E. et al. (2017). 6 - Stem Cell Biology. In R. A. Polin, S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz, & W. W. B. T.-F. and N. P. (Fifth E. Fox (Eds.) (p. 54–75.e5). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00006-8>
- Zhang, Z. et al. (2017). CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 9, 230–241.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.009>

Referencias

- Giandomenico, S. L., & Lancaster, M. A. (2017). Probing human brain evolution and development in organoids. *Current Opinion in Cell Biology*, 44, 36–43.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.001>
- Hockemeyer, D., & Jaenisch, R. (2016). Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Cell Stem Cell*, 18(5), 573–586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.013>
- O'Shea, K. S., & McInnis, M. G. (2016). Neurodevelopmental origins of bipolar disorder: iPSC models. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 73, 63–83.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.11.006>
- Liu, Y., & Deng, W. (2016). Reverse engineering human neurodegenerative disease using pluripotent stem cell technology. *Brain Research*, 1638, 30–41.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.023>
- Shah, S. B., & Singh, A. (2017). Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta Biomaterialia*, 53, 29–45.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.075>
- Wu, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2016). Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell*, 165(7), 1572–1585. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.043>

Referencias

- Hung, S. S. C., Khan, S., Lo, C. Y., Hewitt, A. W., & Wong, R. C. B. (2017). Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 177, 32–43.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.026>
- Rak-Raszewska, A., & Vainio, S. (2016). Nephrogenesis in organoids to develop novel drugs and progenitor cell based therapies. *European Journal of Pharmacology*, 790, 3–11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.011>
- Anderson, R. H., & Francis, K. R. (2018). Modeling rare diseases with induced pluripotent stem cell technology. *Molecular and Cellular Probes*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.01.001>
- Alladin, A., & Jechlinger, M. (2017). Towards a holistic and mechanistic understanding of tumourigenesis via genetically engineered mouse models. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 74–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.10.004>
- Ahmed, E., Sansac, C., Assou, S., Gras, D., Petit, A., Vachier, I., ... Bourdin, A. (2018). Lung development, regeneration and plasticity: From disease physiopathology to drug design using induced pluripotent stem cells. *Pharmacology & Therapeutics*, 183, 58–77.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.002>