



## LA TECNOLOGÍA DE CRISPR Y LA COVID 19

Evelin Pérez Acuña <sup>1</sup>, Elizabet Pérez Acuña<sup>2</sup>, Yanet Carbo Alfonso<sup>3</sup>, Yamile Sarmiento Teruel<sup>4</sup>, Ailian Serra Garcia <sup>5</sup>

1-Especialista en Medicina General Integral. Residente de segundo año de Bioquímica Clínica. Profesora instructor. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas Holguín Cuba.

[evelinpereza@gmail.com](mailto:evelinpereza@gmail.com) Orcid:0000-0002-03013

2-Especialista de Primer Grado en Medicina Intensiva. Profesora Instructor. Hospital General Docente Orlando Pantoja Tamayo. Contramaestre. Santiago de Cuba. Cuba

3- Especialista en Medicina General Integral. Especialista en Bioquímica Clínica. Profesora Asistente. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas Holguín Cuba.

4-Especialista en Medicina General Integral. Especialista en Bioquímica Clínica. Profesora Auxiliar. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas Holguín Cuba.

5- Especialista en Medicina General Integral. Especialista en Bioquímica Clínica. Profesora Asistente. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas Holguín Cuba.

## **Resumen**

La edición de genes o edición genómica es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo, utilizando enzimas del tipo nucleasas (tijeras moleculares) siendo llamada la técnica del corta y pega<sup>1</sup> Las posibilidades que brinda la aplicación de las herramientas CRISPR han supuesto una de las mayores revoluciones biomédicas en lo que va de siglo. Estas herramientas permiten editar el genoma de cualquier especie. Nuestro debate se centra en la aplicación de estas herramientas Crispr Cas al diagnóstico de la Covid-19. Se realizó una revisión bibliográfica actualizada con relación al tema. . Si se confirman sus niveles de fiabilidad, las herramientas de diagnóstico de COVID-19 basadas en CRISPR pueden suponer un espaldarazo a la estrategia testar-trazar-aislar, necesaria para frenar la transmisión del virus.

Palabras Claves. Edición génica, proteínas asociadas a CRISPR, infección por Sars-CoV-2.

## **Introducción**

La edición de genes o edición genómica como también es conocida es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo, utilizando enzimas del tipo nucleasas (tijeras moleculares).Las nucleasas producen roturas de doble cadena en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos o mediante reparación dirigida por homología, dando lugar a mutaciones controladas(edición) siendo llamada la técnica del corta y pega<sup>1</sup>

La edición genómica posee el potencial de realizar modificaciones en la secuencia de ADN dirigidas a genes específicos para alterar su expresión (silenciarlos o sobre-expresarlos), reemplazar alelos (introduciendo alelos favorables) o introducir transgenes en sitios específicos del genoma<sup>2</sup> .

La edición genética, vieja ambición de la ingeniería genética, es ya una realidad con la irrupción de la técnica Crispr-Cas-9 (Repeticiones palindrómicas agrupadas

espaciadas a intervalos regulares). La pretensión de modificar el ADN es la quinta esencia de la ingeniería genética. Las técnicas de ADN recombinante, desarrolladas en los años 70 y perfeccionadas en los 80 permitían combinar ADN de especies u organismos diferentes, partiendo de la universal compatibilidad del ADN de cualquier especie<sup>3</sup>. Con la tecnología CRISPR/Cas9 es posible alterar o eliminar cualquier secuencia o letra en un genoma de billones de nucleótidos. La enzima llamada Cas9 funciona como el cursor del editor de texto de Microsoft Word posicionándose sobre un fragmento de texto genético y marca un corte, casi como corregir un error tipográfico es guiada por CRISPR, una secuencia ribonucleotídica que está diseñada para encontrar por apareamiento la secuencia que queremos cortar.

La técnica CRISPR es el resultado de un esfuerzo colectivo que comienza en 1995 con la curiosidad suscitada por unas secuencias repetidas de función desconocida, encontradas en un microorganismo en la costa de Alicante en España. El microbiólogo, investigador y profesor español, Francisco Juan Martínez Mojica, más conocido como Francis Mojica descubre un sistema inmune microbiano, cuya existencia ni siquiera se sospechaba Mojica pasa años intrigado por esta serie de secuencias genéticas que se repetían a intervalos regulares en el genoma y a las que nombra CRISPR resuelve el misterio al darse cuenta de que entre esas secuencias repetidas hay fragmentos de ADN de virus, antiguos invasores de los microorganismos<sup>4</sup> encontrando en el año 2000 la herramienta más prometedora de la ingeniería genética y con la colaboración de las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, lograron crear una copia sintética de esta, denominándola CRISPR/Cas9, el 25 de octubre del 2017, un grupo de científicos encabezados por el investigador estadounidense de origen chino, Feng Zhang publicó un artículo en la revista Science describiendo una alternativa al ya mencionado CRISPR/Cas9 al que denominaron REPAIR, y en cuanto a su método de acción es muy similar, pero, al contrario que CRISPR/Cas9, esta nueva técnica actúa sobre el ARN en vez de sobre el ADN<sup>5</sup>.

Entrando así en una batalla legal la Universidad de California, Berkeley, representando a las profesoras Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier y el Eli

& Edythe Broad Institute of MIT and Harvard, más conocido como Broad Institute, representando al investigador Feng Zhang, quien a los pocos meses de publicado el trabajo sobre la edición de genomas en procariontes usando CRISPR/Cas, publicó los primeros resultados sobre la edición del genoma de eucariontes usando células humanas y de ratón. En febrero de 2017, el juez que atiende el caso decidió a favor del Broad Institute, decisión que fue rápidamente apelada por la Universidad de California, presentando evidencias sobre malas prácticas y demoras en las oficinas de patentes, razón por la que el Broad Institute logró patentar CRISPR más rápido que los mismos descubridores. El premio Nobel de Química en el 2020 fue otorgado a las investigadoras Emmanuelle Charpentier del Instituto Max Planck en Biología de las Infecciones y a Jennifer Doudna de la Universidad de Berkeley y del Howard Hughes Medical Institute, por su aportación en el desarrollo de la herramienta de genética molecular conocida como CRISPR/Cas .

Las posibilidades que supone la aplicación de las herramientas CRISPR han supuesto una de las mayores revoluciones biomédicas en lo que va de siglo. Estas herramientas permiten editar el genoma de cualquier especie, añadiendo, eliminando o modificando genes. La infección por SARS-CoV-2 no escapa a la influencia de CRISPR y ya hay abiertas varias líneas de investigación, sobre todo enfocadas al diagnóstico pero también a posibles terapias, para mejorar el manejo de la COVID-19 utilizando estas tijeras moleculares de edición genética para detectar mediante la edición genética el SARS-CoV-2<sup>6</sup> . Los primeros casos de COVID-19 se reportaron a finales de diciembre de 2019 en Wuhan China, y tres meses después ya se había propagado por todo el mundo por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 24 de enero del 2020 ya se había publicado la secuencia genética del SARS- CoV-2<sup>8</sup> . El 11 de Marzo del 2020 la OMS declaró la COVID-19 como pandemia tras los más de 118.000 casos positivos en 114 países y 4.291 fallecidos hasta ese momento<sup>7</sup>, convirtiéndose en uno de los más grandes retos para la ciencia en las últimas décadas.

El Sars-CoV-2 es un virus con envoltura cuyo genoma está hecho de RNA de sentido positivo de una sola hebra. Este virus cuenta con la corona característica de los coronavirus, la cual se observa en microscopia electrónica de barrido gracias a

la presencia de las proteínas S (spike) o proteínas en forma de púas. Adicional a esta proteína los genes más importantes en el diagnóstico del SARSCoV-2 son el gen que codifica para la nucleocapside (gen N) y los genes que codifican para la RNA polimerasa dependiente de RNA + y el gen codificante para la helicasa, los cuales están codificados por un solo gen en el genoma, en la región RdRp<sup>8</sup>.

## **Objetivo**

Nuestro equipo de trabajo se trazó como objetivo incrementar el conocimiento de sobre las novedosas técnica actuales de manipulaciones del ADN específicamente a través de la técnica de Crisper Cast y sus aplicaciones en la Covid 19. De esta manera contribuir a elevar el potencial científico de nuestro colectivo.

## **Metodología**

Se realizó una revisión bibliográfica actualizada con relación al tema. La recopilación de la información se efectuó entre los días 16 y 28 de febrero del 2022. En la búsqueda se emplearon los recursos disponibles en la red se utilizó el descriptor para Ciencias de la Salud (DeCS) para localizar las palabras claves (Edición génica, proteínas asociadas a CRISPR, infección por Sars-CoV-2). Utilizamos el buscador Google Académico para formar una primera idea de cuál era el tema a tratar y se aplicó una estrategia de búsqueda utilizando las palabras claves. Se realizó un análisis de la calidad y validez de los documentos seleccionados para realizar una adecuada revisión siendo seleccionadas un total de 44 fuentes bibliográficas.

### **1. Edición genética o genómica.**

La edición genómica es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas (tijeras moleculares). Las nucleasas producen roturas de doble cadena (*DSB*) en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) o mediante reparación dirigida por homología (*HDR*), dando lugar a mutaciones controladas (edición).

La edición genómica se denomina como la técnica de corta y pega. En la actualidad se dispone fundamentalmente de cuatro tipos de nucleasas: 1) meganucleasas, 2) nucleasas de dedo de zinc (ZF nuclease), 3) Talen (Transcription Activator-Like Effector-based Nuclease) y 4) el sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ó su sinónimo en español Repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas<sup>9</sup>. El sistema CRISPR-Cas, por lo simple de su metodología y su reducido coste, atrajo la atención desde sus inicios, en el 2011 empezaron a proponerse diferentes soluciones basadas en este sistema relacionadas principalmente con la manipulación genómica<sup>10</sup>.

La edición génica tiene diversos usos en primer lugar. Podemos plantearnos: 1) Disruptar un gen para destruir una instrucción genética concreta; 2) Modificar el gen para que la información genética sea distinta; 3) Insertar información totalmente nueva; 4) Delecionar genes y secuencias de ADN concretas; 5) Corregir mutaciones genéticas que causan enfermedades hereditarias, 6) Crear nuevas combinatorias genéticas sintéticas, no existentes en ese organismo ni en ningún otro, 7) Cambiar la regulación de un gen, de forma que no se exprese más que en determinadas condiciones; 8) Usar, bien una información genética determinada para lograr objetivos en una investigación<sup>11</sup>.

La tecnología CRISPR/Cas9 permite que sea más sencillo editar genes en la actualidad, mediante un sistema biológico muy sencillo y con gran potencial en materia de salud, agricultura, bioindustria. Es capaz de identificar y reparar secuencias de DNA defectuosas en pacientes que sufren enfermedades de origen genético, tales como Huntington o diabetes tipo I. Sirve también para prevenir y controlar las infecciones virales tales como VIH o hepatitis. Además, puede ser usada en microorganismos y también en plantas o animales para eliminar características no deseables del fenotipo, incluso cuando el organismo es adulto. Estas son, entre otras, las aplicaciones que tiene el sistema CRISPR/Cas9, y dan una idea de su gran potencial. Se trata de una herramienta tan sencilla y económica que puede ser usada por cualquier persona que conozca de biología molecular<sup>12</sup>.

En la actualidad ya se ha aplicado como terapia génica en varias enfermedades en modelos animales con resultados prometedores. El tratamiento de embriones mediante el sistema CRISPR-Cas proporciona datos prometedores se realizó un trabajo investigativo publicado en la revista Nature en el 2017 por científicos de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón donde se describe la corrección de la mutación heterocigótica en el gen MYBPC3 (causa una miocardiopatía hipertrófica, una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 500 personas aproximadamente) en embriones humanos preimplantados con una precisión y una alta eficiencia de reparación dirigida y homologada mediante la activación de una respuesta endógena de reparación del ADN específica de la línea germinal.

El mosaicismo en embriones humanos con corrección genética sería difícil de detectar y plantearía serios problemas de seguridad para posibles aplicaciones clínicas<sup>13</sup>.

## **2. Tecnología CRISPR/Cas**

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés), junto con la endonucleasa Cas, forman el complejo CRISPR/Cas. CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas análogo al silenciamiento con ARN interferente en eucariontes, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos.

Este sistema se compone de dos elementos: un ARN proveniente de la secuencia CRISPR, llamado ARNcr, y la endonucleasa Cas. La secuencia CRISPR se compone de un líder o promotor y distintas secuencias espaciadoras (de 25 a 50 nucleótidos) flanqueadas por elementos repetidos, usualmente palindrómicos (de 32 nucleótidos). El ARNcr es el encargado de dirigir a Cas hacia su secuencia complementaria, donde Cas realiza el corte de la secuencia patógena<sup>14</sup>.

La principal utilidad que ha tenido el sistema CRISPR/Cas9 ha sido la generación de mutaciones y ediciones en lugares específicos en el genoma también se puede utilizar para sobre activar la expresión de un gen o para silenciarlo. El sistema

CRISPR/Cas9, funciona en parte tan bien porque durante la evolución se seleccionaron mecanismos de reparación del ADN funcionan igual en todos ellos, dependiendo del tipo de daño. Usando ARNs guías (gARNs) específicos para editar una región del genoma podemos enviar a la Cas9 a cortar la doble hélice esta enzima hace cortes en un sitio específico en las dos cadenas del ADN. Cuando esto ocurre en una célula se activa un mecanismo de reparación para volver a pegar el cromosoma que ha sido cortado<sup>15</sup>.

La tecnología CRISPR/Cas se originó a partir del sistema CRISPR/Cas tipo II que provee a las bacterias de una inmunidad adaptativa a virus y plásmidos(x1) La proteína Cas9 asociada a CRISPR es una endonucleasa que utiliza una secuencia guía (gRNA) dentro de un RNA dúplex que, al formar pares de bases con la secuencia blanco en el DNA, le permite introducir un sitio específico de rotura en la doble hebra de DNA<sup>16</sup>.

Con el objetivo de optimizar su uso en el laboratorio, el dúplex rRNA se ha fusionado en una sola molécula de gRNA, llamada RNA guía simple. El sistema CRISPR/Cas9 realiza una edición precisa y dirigida del genoma de células vivas. La especificidad es la mayor preocupación en el sistema CRISPR/Cas9, debido a que Cas9 puede cortar sitios que no son totalmente complementarios a la secuencia del sgRNA<sup>17</sup>. Con el objetivo de optimizar la predicción de los sgRNAs con alta especificidad y reducir la frecuencia relativa de corte de sitios no blanco (*off-target*), se han desarrollado diversos programas informáticos que sirven como herramientas de apoyo. Por su eficacia y precisión, la técnica CRISPR-Cas9 ha venido a sustituir a las técnicas que desde hace 30 años se vienen utilizando para modificar el genoma de los organismos.

### **3.FUNCIÓN DE LOCUS CRISPR.**

Este sistema de defensa recae sobre pequeños RNAs que detectan pequeñas secuencias específicas de ácidos nucleicos foráneos. La inmunidad mediada por CRISPR/Cas ocurre en dos fases: adaptación e inhibición. En la fase de adaptación las bacterias y arqueas que albergan uno o más loci CRISPR responden a la introducción de material genético, viral o plasmídico, integrando fragmentos cortos



de las secuencias foráneas (protoespaciadores) dentro de sus cromosomas en el extremo proximal del arreglo CRISPR<sup>20</sup>. En la fase de inhibición se transcribe el elemento repetitivo espaciador y el producto se denomina precursor de CRISPR RNA (pre-crRNA). Éste luego es cortado enzimáticamente para producir CRISPR RNA (crRNA) cortos, los cuales pueden aparearse con secuencias protoespaciadoras complementarias al invasor viral o plasmídico. El blanco de reconocimiento para los crRNAs dirige el corte de genes foráneos mediante el uso de nucleasas Cas que funcionan en complejos con los crRNAs<sup>21</sup>.

El sistema CRISPR mejor caracterizado y utilizado en edición genómica es el de tipo II. Está compuesto por la nucleasa Cas9, el cual cumple una función estructural. Estos RNAs son considerados el RNA guía (gRNA) y forman un complejo con la proteína Cas9<sup>22</sup>. Una reparación imprecisa mediada por NHEJ puede producir mutaciones de inserción y/o deleción de longitud variable en el sitio de la ruptura de doble hebra<sup>23</sup>.

#### **4. Elección de sitios blanco de sgRNA**

Es posible que al utilizar secuencias de mRNA accidentalmente se diseñe el sgRNA en una región de unión exón-exón, la cual no existe en la secuencia de DNA. Se recomienda elegir las secuencias entre los primeros exones, después del codón de inicio. Luego de seleccionar el gen blanco, se procede a diseñar el sgRNA. Actualmente existen numerosos sitios web que lo diseñan y evalúan su especificidad mediante análisis de BLAST. Debido a que estos recursos utilizan en sus bases de datos genomas de sus organismos de interés, es importante verificar si el organismo de interés del investigador se encuentra dentro de su base de datos<sup>24</sup>.

#### **5. Entrega de los componentes de CRISPR/Cas.**

En cultivos de células de mamíferos los investigadores han usado electroporación, nucleofección, inyección de virus recombinante asociado a adenovirus, y transfección mediada por lipofectamina de plásmidos no replicativos que expresan

Cas9 en forma transiente, y sgRNAs. Los componentes de CRISPR/Cas también pueden ser entregados mediante complejos de ribonucleoproteínas (Cas9 RNPs), consistentes en la proteína Cas9 purificada con el sgRNA. Son ensambladas *in vitro* y pueden ser entregadas directamente a la célula mediante electroporación u otras técnicas estándar de transfección<sup>25</sup>.

## **6. Técnicas que utilizan CRISPR diagnosticar la Covid-19.**

Desde que se conociera la secuencia del genoma de SARS-CoV-2 han surgido diferentes estrategias innovadoras para el diagnóstico de COVID-19 basadas en la detección del ácido nucleico del virus. Una de estas estrategias son las técnicas de amplificación isotérmica, como la amplificación por recombinasa-polimerasa, la amplificación dependiente de helicasas o la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que tienen la ventaja de no necesitar un equipamiento especializado y que alcanzan niveles de sensibilidad equivalentes a la RT-PCR .

La OMS propuso los criterios ASSURED (asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipo y entregable a los usuarios finales) para determinar si los métodos de diagnóstico que se utilizan, satisfacen las necesidades de control epidémico<sup>26</sup>.

Las estrategias más prometedoras parecen ser las basadas en sistemas CRISPR Cas, herramientas de edición genética que permiten agregar, eliminar o reordenar secuencias genéticas y que ya han demostrado su gran versatilidad en muchos ámbitos de la biología, la biotecnología y la biomedicina. El aislamiento y la caracterización de nuevos sistemas CRISPR Cas de diversas bacterias, con propiedades singulares, ha aumentado considerablemente la capacidad de aplicar estas poderosas herramientas en nuevos campos, tales como el diagnóstico y la terapia de la COVID-19. Su desarrollo supone un claro avance para poder diagnosticar la infección por SARS-CoV-2 de manera masiva, rápida, sencilla y fiable.

Actualmente se dispone de nuevos métodos que aplican el sistema CRISPR/Cas en el diagnóstico molecular del coronavirus SARS-CoV-2 como: SHERLOCK (Specific

High-sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking),(22,23) STOP-Covid,(24,25) DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter),(26,27) AIOD-CRISPR,(28) CARMEN (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids),(29) CONAN(Cas3-Operated Nucleic Acid detection)(30) y otros en desarrollo. Estos detectan los ácidos nucleicos y han mostrado una especificidad y sensibilidad mayor o igual que la RT-qPCR, con un tiempo de detección muy inferior<sup>27</sup>.

## **7. Técnica SHERLOCK**

La primera aplicación del sistema CRISPR/Cas en el diagnóstico molecular del coronavirus SARS-CoV-2, fue la implementación del método SHERLOCK (en español: desbloqueo específico del reportero enzimático de alta sensibilidad), desarrollado en el 2017 por el laboratorio de Feng Zhang del Instituto Broad-MIT en Boston (EE. UU.)<sup>28</sup>

La técnica CRISPR-based SHERLOCK permite una detección portátil, múltiple y ultrasensible de ARN o AND de muestras clínicamente pertinentes. Estos ensayos están conformados con preamplificación recombinada mediada por polimerasa del ADN o ARN y proporcionan resultados en menos de 1 hora, sin requerir instrumentación elaborada, pero aún necesitan ser confirmados con muestras de pacientes.

El método SHERLOCK-Covid está basado en la sustitución en la plataforma CRISPR de la nucleasa Cas9 por la Cas 13a, cuya actividad es capaz de cortar RNA (una actividad de RNAsa) en lugar de DNA. La prueba está dirigida a detectar el gen de la proteína S (proteína de pico) que interviene en la entrada del virus a las células humanas, y el gen ORF1ab que codifica una replicasa del virus<sup>30</sup>.La actividad de escisión colateral para virus de ARN monocatenario como el SARS-CoV-2. Debido a esta actividad se puede combinar con amplificación isotérmica de ácido nucleico para simplificar el método de detección visualizar el resultado de muestras positivas o negativas a ojo desnudo bajo una luz específica, un lector de placas de fluorescencia o un ensayo de flujo lateral<sup>31</sup>.

El funcionamiento básico de SHERLOCK es simple..

En mayo del 2020 Sherlock Biosciences (Cambridge, MA, EE. UU.) recibió la autorización de uso en emergencias de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para su kit Sherlock CRISPR SARS-CoV-2, fue diseñado para uso en laboratorios con certificación CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) para realizar pruebas de alta complejidad. El kit funciona mediante la programación de una molécula CRISPR para detectar la presencia de una firma genética específica, en este caso, la firma genética para el SARS-CoV-2, en un hisopo nasal, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo o muestra de lavado broncoalveolar. Cuando se encuentra la firma, la enzima CRISPR se activa y libera una señal detectable<sup>33</sup>.

El protocolo utiliza 25 min para amplificar los ácidos nucleicos extraídos de la muestra, 30 min de incubación con los elementos de CRISPR y los ARNs con la sonda fluorescente y 2 min de incubación para obtener la lectura visual de la reacción

### **8. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante el STOP-Covid, derivado de SHERLOCK.**

En mayo del 2020, Feng Zhang hace público un nuevo método de diagnóstico optimizado y simplificado el STOP-Covid, derivado de SHERLOCK, aplicable para detectar directamente el coronavirus SARS-CoV-2, sin mediar extracción o aislamiento de ARN, que apenas requiere de 40-70 min para obtenerse el resultado, tras una incubación a 60 grados<sup>35</sup>.

Es un ensayo optimizado que combina la extracción simplificada de ARN viral con amplificación isotérmica mediada por bucle y detección mediada por CRISPR-Cas12b. proporciona sensibilidad sin requerir un proceso de amplificación de ácido nucleico de varios pasos, incluidos los pasos de manipulación de fluidos, lo que permite su implementación fuera de los laboratorios clínicos y no afecta la cuantificación precisa del objetivo<sup>36</sup>

## **9. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas12a: DETECTR**

En 2018, el laboratorio de la investigadora Jennifer Doudna -una de las "madres" del desarrollo de CRISPR- reportó un sistema de diagnóstico análogo, basado en otro sistema CRISPR-Cas, en la nucleasa Cas12 pero todavía no ha recibido la aprobación de la FDA. Este método fue validado mediante la utilización de muestras clínicas de pacientes de EEUU, incluyendo 36 pacientes con COVID-19 y 42 pacientes con otras infecciones virales.

La segunda tecnología de detección del coronavirus SARS-CoV-2 basada en CRISPR es el ensayo de flujo lateral DETECTR (pronunciado en inglés como "detector" de coronavirus). Esta fue desarrollada inicialmente en el laboratorio de Jennifer Doudna de la Universidad de California en Berkeley<sup>37</sup>.

## **10. Diagnóstico mediante la técnica Carmen**

A finales del mes de abril del 2020, dos equipos del BROAD Institute de Massachusetts, han publicado un nuevo método basado en la nucleasa Cas13 con microfluídica para permitir la detección simultánea de centenares de virus distintos en un número limitado de muestras clínicas o la detección de un único virus, como el SARS-CoV-2, en más de mil muestras clínicas. Esta nueva técnica se denomina CARMEN (acrónimo de *Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids*). Combina la estrategia SHERLOCK, que utiliza nanogotas que portan la muestra clínica y por otro lado nanogotas que portan la Cas13.

## **11. Ventajas de las técnicas SHERLOCK y DETECTR en el diagnóstico SARS-CoV-2**

Una de las ventajas de SHERLOCK y DETECTR es que pueden ser utilizados en cualquier laboratorio equipado con instrumental básico. utilizan reactivos diferentes a los de las pruebas basadas en PCR. La principal limitación de momento es que su sensibilidad es todavía menor a la de las pruebas basadas en PCR.

La detección rápida y específica del ácido nucleico del SARS-CoV-2 sigue siendo un desafío para los proveedores de atención médica. La detección del SARS-CoV2

mediada por el sistema CRISPR/Cas representa una plataforma prometedora para el desarrollo de diagnósticos moleculares de próxima generación de COVID19 en el punto de atención. Tiene el potencial de desempeñar un papel crucial en las medidas efectivas de prueba, rastreo y aislamiento para contener la COVID19.

Si bien el CRISPR/Cas es un sistema tecnológico en desarrollo, los avances en sus múltiples variedades y las viables soluciones contra el SARS-CoV-2 que de ellos se derivan, recuerdan la importancia de que se profundice en sus estudios. Los métodos de detección basados en CRISPR/Cas tienen el potencial de volverse más simples, más confiables, más asequibles y más rápidos en un futuro cercano, lo cual es muy importante para lograr diagnósticos en el punto de atención<sup>40</sup>

### **Conclusiones**

La ingeniería genética ha ido avanzando desde hace varias décadas a gran velocidad pero aun se mantiene como un campo amplio y desconocido. Uno de sus grandes descubrimientos es la edición génica mediante la aplicación de la técnica CRISPR-Cas9 la cual es una de las herramientas más poderosas, asequibles en precio así como en facilidad de uso, versátil y prometedora para la ingeniería biológica, lo que ha hecho posible que intervenciones que antes eran muy complejas y largas o directamente imposibles, sean relativamente fáciles de sacar a delante. La ciencia es nuestra principal herramienta para analizar y comprender el mundo que nos rodea y el progreso científico ha influido profundamente en la evolución de las sociedades occidentales.

La edición genética puede aportar muchísimo a la sociedad, ya no solo a nivel de mejoramiento y restauración de la salud, sino a nivel alimenticio y del medio ambiente e incluso de las industrias, el problema viene cuando se habla de la edición genética en la línea germinal humana. La población debe conocer cuáles son los retos a los que nos enfrentamos para así poder participar en la toma de decisiones, además la investigación debería ir siempre de la mano de la ética<sup>43</sup>.

En la actualidad hay muchas esperanzas depositadas en las estrategias CRISPR-Cas9 en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Si se confirman sus niveles

de fiabilidad, las herramientas de diagnóstico de COVID-19 basadas en CRISPR pueden suponer un espaldarazo a la estrategia testar-trazar-aislar, tan necesaria para frenar la transmisión del virus. Desde el año 2020 en la Universidad de Stanford (CA, EEUU) se realizan estudios para utilizar esta técnica en el tratamiento de la infección por Sars- Cov-2 a la cual han llamado PAC-MAN (Prophylactic Antiviral CRISPR in huMAN cells)<sup>44</sup>.

Fuentes de financiamiento: Esta revisión bibliográfica ha sido financiado con recursos propios de los autores.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

### **Referencias Bibliográficas**

1. Ramírez c. Edición del genoma humano mediante CRISPR. Rev. divulgativa del INHR. 2020; Vol. 1(11): 77-87.
2. Feingold S.E, Bonnacarrère V, Nepomuceno A., Hinrichsen P, Cardozo Tellez L, Molinari H *et al.* Edición génica: una oportunidad para la región. Rev. RIA .2018; Vol. 44 (3): 425-7.
3. Borgoño Barros C. Reflexiones ético-teológicas ante la edición genética. Cuadernos de Bioética. 2019; 30(100): 289-302.
4. Becú-Villalobos D. El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad? Editorial Medicina.2017; Vol. 77 (6):521-523.
5. Eraso Pérez de Urabaye M. Aplicación de CRISPR/Cas9 en humanos. Conocimiento insuficiente y necesaria discusión. Universidad Pública de Navarra. 2018.
6. Zurita M. El sistema CRISPR/Cas, crónica de un premio Nobel anunciado. Rev. Educación química.2021; Vol. 32(3):3-13.
7. Lam-Cabanillas E, León-Risco A, León-Risco K, Llamo-Hoyos1G., López-Zavaleta R.,Luzuriaga-Tirado E. *et al.* Bases moleculares de la patogénesis de covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. Rev. Fac. Med. Hum. Abril 2021;21(2):417-432. DOI 10.25176/RFMH.v21i1.3327.
8. Haque S, Ashwaq M, Sarief O, Mohamed AJ. A comprehensive review about SARS-CoV-2. Future virology. 2020; 15(9), 625-648.

9. Lacadena J.R. Edición genómica: ciencia y ética. Revista Iberoamericana de Bioética / nº 03 / 01-14 [2017] [ISSN 2529-9573] DOI: 10.14422/rib.i03.y2017.004)
10. Thomas M, Burgio G, Adams DJ, Iyer V. Daño colateral y edición del genoma CRISPR. *PLoS genet.* 2019; 15(3):e1007994.
11. DOUDNA, J.; CHARPENTIER, E. □The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:6213(2014) DOI:10.1126)
12. Kang, S., Peng, W., Zhu, Y., Lu, S., Zhou, M., Lin, W., *et al.* Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *International journal of antimicrobial agents.* 2020. 55(5), 105950.
13. Ma H, Marti-Gutierrez N, SW, P., & al., e. Correction of pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017; Vol. 000 (413-419.)
14. Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, García-Sandoval CD, Avilez-Bahena CM, Trejo-Reveles V, Balam Muñoz-Soto R, *et al.* La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. Artículo de revisión. 2016 Vol. 5(2): 116-128.
15. Anzalone A.V, Randolph, P.B, Davis, J.R, Sousa, A.A, Koblan L.W, Levy J.M, *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019; Vol 576(7785): 149-157.
16. Chylinski K, LeRhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR- Cas immunity systems. *RNA Biol* [Internet]. 5 de mayo de 2016; 10 (5):726-37. Disponible en: <http://www.tandfonline.com>
17. Kimberland ML, Hou W, Alfonso Pecchio A, Wilson S, Rao Y, Zhang S, *etal.* Strategies for controlling CRISPR/Cas9 *off-target* effects and biological variations in mammalian genome editing experiments. *J Biotechnol* [Internet]. octubre de 2018; 284:91-101. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com>
18. Lone BA, Karna SKL, Ahmad F, Shahi N, Pokharel YR. CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. *Genet Res Int* [Internet]. 18 de septiembre de 2018; 2018:1-17. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals>



19. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *CrisJ* [Internet]. octubre de 2018;1(5):325-36. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/>
20. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* [Internet]. marzo de 2018;172(6):1239-59. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com>.
21. McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 31 de enero de 2019;17(1):7-12. Disponible en: <http://www.nature.com>.
22. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. *Science* (80- ) [Internet]. 10 de septiembre de 2010;329(5997):1355-8. Disponible en: <http://www.sciencemag.org>
23. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* [Internet]. 24 de octubre de 2017;8(11):2281-308. Disponible en: <http://www.nature.com>
24. Brazelton VA, Zarecor S, Wright DA, Wang Y, Liu J, Chen K, et al. A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GMCrops Food* [Internet]. 2 de octubre de 2015 [citado 12 de mayo de 2019];6(4):266-76. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033207/>
25. Tagliafierro L, Ilich E, Moncalvo M, Gu J, Sriskanda A, Grenier C, et al. Lentiviral Vector Platform for the Efficient Delivery of Epigenome-editing Tools into Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Disease Models. *J Vis Exp* [Internet]. 29 de marzo de 2019;(145). Disponible en: <https://www.jove.com>.
26. Shihong Gao D, Zhu X, Lu B. Development and application of sensitive, specific, and rapid CRISPR-Cas13-based diagnosis. *J Med Virol*. 2021 [acceso: 19/02/2022]; 93(7):4198-204. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
27. Benzigar MR, Bhattacharjee R, Baharfar M, Liu G. Current methods for diagnosis of human coronaviruses: pros and cons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021 [acceso: 03/03/2022];413:2311-30. Disponible en: <https://link.springer.com>

28. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. 2020 [acceso: 02/02/2022]: 1-8. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org>
29. Xiao, A. T., Tong, Y. X., Gao, C., Zhu, L., Zhang, Y. J., & Zhang, S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020. 127, 104346. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104346>
30. Lall S. SHERLOCK-based one-step test provides rapid and sensitive Covid-19 detection. *MIT News*. 2020 [acceso: 20/02/2022].
31. Dhanda R. COVID, CRISPR, and a Commitment to Global Health: An Interview with Sherlock Biosciences Rahul Dhanda. *Genetic Engineering and Biotechnology News*. 2021 [acceso: 20/02/2022]. Disponible en: <https://www.genengnews.com>
32. Sherlock Biosciences. Instructions for Use SHERLOCK™ CRISPR SARS-CoV-2 kit. For Emergency Use Authorization (EUA) only. 2021 [acceso: 03/03/2022]: [aprox. 10 p.]. Disponible en: <https://www.fda.gov>
33. Pacheco Morffi PM, Pacheco González JD, Hernández Millán AB, Cázares de León F. Consideraciones sobre el diagnóstico de COVID-19 y el papel del diagnóstico salival. *Revista ADM* 2020 [acceso: 19/02/2022];77(4):191-6. Disponible en: <https://www.medigraphic.com>.
34. Konwarh R. Can CRISPR/Cas Technology Be a Felicitous Stratagem Against the COVID-19 Fiasco? Prospects and Hitches. *Front. Mol. Biosci*. 2020 [acceso: 19/02/2022]: [aprox. 10p.]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org>.
35. Moehling TJ, Choi G, Dugan LC, Salit M, Meagher RJ. LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021 [acceso: 19/02/2022];21(1):43-61. Disponible en: <https://www.tandfonline.com>.
36. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-

- CoV2 RNA. Nature Biomedical Engineering. 2020 [acceso: 01/03/2022];4:1140-9. Disponible en: <https://www.nature.com>.
37. Sethuraman N, Stanleyraj Jeremiah S, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 [acceso: 01/03/2022];323(22):2249-51. Disponible en: <https://jamanetwork.com>
38. Rahimi H, Salehiabar M, Barsbay M, Ghaffarlou M, Kavetsky T, Sharafi A, et al. CRISPR Systems for COVID-19 Diagnosis. ACS Sens. 2021 [acceso: 19/02/2022]: [aprox. 09 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
39. Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. Viruses. 2020.12(4), 372. Disponible en: <https://doi.org>
40. Rodríguez Perú JM, Rodríguez Izquierdo MM. Tecnología de detección del coronavirus SARS-CoV-2 basada en el sistema de edición genética CRISPR/Cas. Revista Cubana de Medicina General Integral. 2021;37(Sup): 1-18.
41. Who interim guidance for laboratory testing. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5. <https://www.who.int/public>.
42. Udagama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. ACS Nano. 2020;14(4):3822-3835.
43. Osorio, J. G. (2000). Principios éticos de la investigación en seres humanos y animales. Marzo 3, 2018, de Universidad del Valle Sitio web: <http://www.medicinabuenosaires.com>.
44. Singh, V., Braddick, D. & Kumar, P. (2017, junio 30). Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. Science Direct, 599, pp. 1-18. 2017, octubre 7, De Sirius Base de datos.