



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

APLICACIONES DE HERRAMIENTAS CRISPR EN COVID-19

CRISPR TOOL APPLICATIONS IN COVID-19

Autor/es

Miguel Corzán López

Director/es

Pedro Muniesa Lorda

Facultad de Veterinaria

2022

---

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
1.1. ABSTRACT .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1. COVID-19 .....	3
2.2. SARS-CoV-2.....	4
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>8</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>9</b>
5.1. DESCUBRIMIENTO DE CRISPR/CAS.....	9
5.2. FUNDAMENTOS DE CRISPR/CAS .....	10
5.3. CLASIFICACIÓN Y APLICACIONES DE CRISPR/CAS .....	12
5.4. DIAGNÓSTICO DE COVID-19.....	13
5.5. TERAPIA FRENTE AL COVID-19 .....	21
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
6.1. CONCLUSIONS .....	25
<b>7. VALORACIÓN PERSONAL</b> .....	<b>25</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>26</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>32</b>

# 1. RESUMEN

## “APLICACIONES DE HERRAMIENTAS CRISPR EN COVID-19”

Los contratiempos generados en el sector de la salud tras la aparición de la pandemia del COVID-19, han impulsado el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas que permitan combatir el SARS-CoV-2 y otros agentes infecciosos responsables de la producción de brotes a nivel mundial. Dentro de estos nuevos enfoques destaca la tecnología de edición genómica CRISPR/CAS, siendo CRISPR el acrónimo de “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas”, y CAS como el conjunto de proteínas ejecutoras de este sistema. Esta herramienta de Ingeniería Genética se ha posicionado como una alternativa de futuro a los métodos convencionales debido a su sencillez, eficacia y bajo coste.

Esta tecnología, originaria de bacterias y arqueas, se ha adaptado para crear pruebas moleculares que detectan el ARN del virus con una sensibilidad y especificidad similares al estándar de oro RT-qPCR, mientras sorteas las limitaciones que presenta esta última como la necesidad de disponer de equipos caros y sofisticados, o el alto coste y tiempo por reacción. Asimismo, también se está investigando su aplicación como agente antiviral, siendo este un campo menos desarrollado pero con un gran potencial frente a los tratamientos y vacunas convencionales.

No obstante, continuar desarrollando estos sistemas CRISPR/CAS e investigando acerca de la patogénesis del COVID-19, se ha convertido en un aspecto esencial para afrontar aquellos desafíos que todavía ponen en duda la seguridad y eficacia de estas novedosas plataformas en el entorno clínico.

## **1.1. ABSTRACT**

### **“CRISPR TOOL APPLICATIONS IN COVID-19”**

The setbacks generated in the health sector after the emergence of the COVID-19 pandemic have prompted the development of new diagnostic and therapeutic tools to combat SARS-CoV-2 and other infectious agents responsible for producing outbreaks worldwide. Among these new approaches, the CRISPR/CAS genomic editing technology stands out, CRISPR being the acronym for "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", and CAS as the set of proteins executing this system. This genetic engineering tool has positioned itself as a future alternative to conventional methods due to its simplicity, efficiency and low cost.

This technology, originally from bacteria and archaea, has been adapted to create molecular tests that detect virus RNA with a sensitivity and specificity similar to the gold standard RT-qPCR, while circumventing the limitations of the latter, such as the need for expensive and sophisticated equipment, or the high cost and time per reaction. Furthermore, its application as an antiviral agent is also being investigated, this being a less developed field but with great potential compared to conventional treatments and vaccines.

However, further development of these CRISPR/CAS systems and research into the pathogenesis of COVID-19 has become essential to address the challenges that still cast doubt on the safety and efficacy of these novel platforms in the clinical setting.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. COVID-19

En diciembre de 2019 empezaron a llegar noticias acerca de un nuevo coronavirus que estaba causando estragos en China. La ciudad china de Wuhan fue el epicentro de lo que, en unos meses más tarde, pasaría a ser una de las pandemias más relevantes de la historia (Singh et al, 2021). Este coronavirus, denominado en adelante como SARS-CoV-2, ha sido el causante de la enfermedad por COVID-19 y ha producido, hasta la fecha, más de 500 millones de casos confirmados, y más de 6 millones de muertos en todo el mundo (WHO coronavirus (COVID-19) dashboard). Estas cifras evidencian el elevado impacto sanitario de una pandemia que ha supuesto un desafío para los sistemas de salud de todo el mundo.

En el comienzo de la pandemia los centros de salud y hospitales fueron colapsados por el creciente número de pacientes que necesitaban ser ingresados. Esta situación afectó gravemente al manejo de otras enfermedades diferentes al COVID-19 como la diabetes o el cáncer, ya que los servicios sanitarios encargados del seguimiento de estas otras patologías fueron derivados a la lucha contra la pandemia. De esta manera, todas aquellas citas médicas que no eran de urgencia se retrasaron, incluyendo las citas de cirugía programada (Kaye et al, 2021). Una revisión bibliográfica acerca del impacto de la pandemia en la atención clínica y quirúrgica en la consulta ortopédica y traumatológica, concluyó que la cirugía traumatológica había disminuido drásticamente en el primer año de pandemia (Blum et al, 2021). A su vez, un estudio español mostró como habían disminuido los procedimientos de Cirugía de Cuidados Intensivos en más de un 50% en los hospitales del país (Cano-Valderrama et al, 2020). Estos son solo algunos de los muchos estudios que ponen de manifiesto como la pandemia ha afectado a un sector de la salud que claramente no estaba preparado, lo cual ha llevado a idear nuevas maneras de atender a los pacientes y de hacer frente a futuras pandemias.

A su vez, la incertidumbre generada y la adopción de medidas de emergencia dirigidas a reducir la propagación del virus, han resultado en un impacto psicológico que se traduce en altos niveles de estrés y ansiedad. La cuarentena, el distanciamiento social, la falta de información verídica y el miedo a la infección, han favorecido el incremento de problemas de salud mental como la depresión, soledad, ira e incluso conductas suicidas (Brooks et al, 2020). Se ha podido observar que el impacto en la salud mental varía atendiendo a muchos factores como la edad, sexo o condiciones socioeconómicas, habiendo estudios que posicionan el sexo femenino y las personas de mayor edad como más susceptibles al deterioro mental ante este

tipo de situaciones (Lindert et al, 2021). La población adolescente no se ha visto exenta y también ha experimentado un impacto negativo en su salud mental, con un aumento de la adicción a los móviles, Internet, y al consumo de drogas y alcohol (Jones et al, 2021).

Por otro lado, la pandemia también ha afectado a la economía mundial. La necesidad de ralentizar la propagación del nuevo coronavirus condujo a las grandes potencias del planeta hacia un bloqueo económico que hizo notar su impacto en todos los países del mundo. La paralización del comercio global, las cuarentenas y las restricciones a los viajes, dieron lugar a una oleada de cierres prolongados en muchos comercios y fábricas, que se vieron obligados a despedir a sus empleados para poder subsistir hasta reanudar sus actividades económicas (Kaye et al, 2021). Dichas pérdidas financieras hostigaron con mayor fuerza a los países más pobres, muchos de los cuales dependen de los suministros procedentes de una China que no tardó en cerrar sus fronteras, dejando sin bienes de primera necesidad a estas regiones (Bong et al, 2020). Esta falta de abastecimiento agravó la situación de la pandemia, ya que dificultó el acceso a los equipos de protección personal (mascarillas, guantes, gafas de protección...), facilitando la propagación del virus.

Los efectos de la enfermedad por COVID-19, declarada como pandemia en marzo de 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la han posicionado como la crisis sanitaria más relevante desde la pandemia de influenza en 1918 (Casella et al, 2022).

## **2.2. SARS-CoV-2**

El SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario de sentido positivo perteneciente a un subgrupo de *Betacoronavirus* (betaCoV) denominado como *Sarbecovirus*. Dentro de este grupo encontramos otros coronavirus que han sido aislados de poblaciones de murciélagos, y que están muy relacionados genéticamente con el SARS-CoV-2. Aunque el origen del virus ha sido y sigue siendo muy discutido, las investigaciones al respecto indican que este nuevo virus tiene un origen animal natural, siendo su reservorio más probable el murciélago. Estudios más recientes también han demostrado la elevada similitud genómica de los coronavirus de pangolines con el SARS-CoV-2. Se trata entonces de un virus zoonótico que en algún momento logró saltar la barrera entre especies llegando así al ser humano (“WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part”, 2021).

La transmisión del virus entre personas se da principalmente a través de gotitas expulsadas en los estornudos y toses de los pacientes con COVID-19. Estas gotas también se pueden emitir durante la respiración y habla normales, siendo las más pequeñas y numerosas las que

constituyen las partículas aerosol, que pueden permanecer un tiempo en el aire y penetrar en los pulmones si una persona las inhala. Una vez el virus se introduce en el organismo, a través de las fosas nasales, cavidad bucal e incluso superficie ocular, este penetra hasta las vías respiratorias bajas llegando a los alveolos (Hu et al, 2021).

La patogenia del SARS-CoV-2 depende de sus proteínas no estructurales (NSP) y estructurales. Gracias a este conjunto proteico el virus puede defenderse de la respuesta inmunitaria innata del huésped, así como penetrar en las células del mismo (Figura 1).

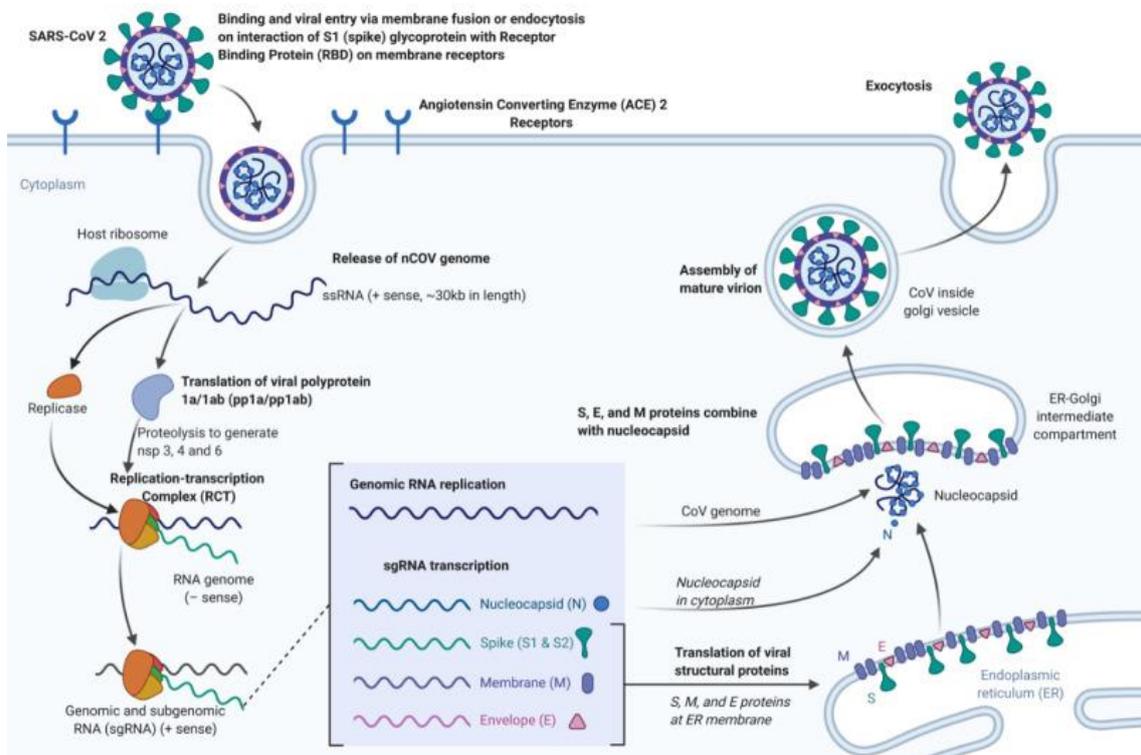


Figura 1. El virus tiene 4 proteínas estructurales principales: espina (S), glicoproteína de cubierta (E), nucleocápside (N) y proteína de membrana (M). La proteína S del virus se une a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2), permitiendo la entrada del ARN del virus a la célula. El ARN viral hace uso de los propios ribosomas de la célula para fabricar sus proteínas y así ensamblar nuevos viriones que saldrán de la célula por exocitosis para continuar con la infección. (Imagen extraída de Cascella et al, 2022).

SARS-CoV-2 ingresa principalmente en el sistema respiratorio afectando a las células epiteliales alveolares de tipo II, lo cual puede producir trastornos en el intercambio de gases debido a la fuerte respuesta inmunitaria que esto desencadena. Por ello, los síntomas más comunes son la fiebre, toses y el dolor de garganta. SARS-CoV-2 también afecta a otros órganos extra-

pulmonares produciendo síntomas como fatiga o dolor muscular, dolor de cabeza, diarrea, dolor abdominal y dolor torácico (Weng et al, 2021).

En la mayor parte de los pacientes la manifestación clínica comienza entre los 2 y 14 días tras la exposición al virus. Los síntomas de esta enfermedad evolucionan con el tiempo, pudiendo persistir en algunos pacientes durante semanas e incluso meses desde el diagnóstico de la enfermedad. Algunas de las secuelas más comunes son la fatiga, la disnea y la anosmia (Nehme et al, 2020).

Por el contrario, muchas infecciones por COVID-19 son asintomáticas, lo cual dificulta el control de la enfermedad ya que tienen la misma infectividad que las infecciones sintomáticas. Se sabe que la edad, condición corporal y el estado de salud son muy relevantes en la gravedad de la enfermedad, de ahí que la mayor parte de asintomáticos sean personas de mediana edad, de entre 30 y 50 años sin patologías subyacentes (Gao et al, 2020). Por tanto, aunque todas las edades son susceptibles de infectarse, los síntomas y la gravedad de los mismos difieren en función de estos factores. Personas de mayor edad o con patologías coexistentes, pueden desarrollar más fácilmente un estadio más grave de la enfermedad que podría provocar la muerte del paciente (Wu y McGoogan, 2020).

El desarrollo de pruebas diagnósticas, como el ensayo de PCR en tiempo real o el Test de detección rápida de antígenos, así como la administración de casi 12.000 millones de dosis de vacunas en todo el mundo como método de prevención (WHO coronavirus (COVID-19) dashboard), han sido cruciales para disminuir la transmisión del SARS-CoV-2 y conseguir un mayor control de la pandemia. A pesar de todos los esfuerzos siguen habiendo muchos países soportando nuevas oleadas de brotes producidas por las numerosas variantes que van apareciendo en el transcurso de la pandemia. La capacidad del virus para evolucionar genéticamente complica cualquier progreso diagnóstico y terapéutico. Algunas de estas variantes mutantes del virus presentan mayor transmisibilidad y virulencia, por lo que suponen un riesgo para la salud pública (Aleem et al, 2022).

La aparición de este tipo de brotes a nivel mundial, y todas las consecuencias que esto conlleva, muestra la necesidad de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos que sean lo más eficientes y específicos posibles. A su vez, estas nuevas herramientas tienen que ser viables para su uso clínico y han de ser económicas, así como de aplicación rápida y sencilla.

El creciente desarrollo de los sistemas CRISPR/Cas ha posicionado esta herramienta de edición genética como la principal candidata para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por COVID-19, así como de otras patologías víricas.

El funcionamiento y las posibles aplicaciones de esta prometedora herramienta se explicarán en los resultados.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Antiguamente, la propagación de epidemias y pandemias era realmente complicada debido al estilo de vida de los humanos. Al vivir en pequeñas poblaciones, muchas de estas enfermedades se limitaban a una región en concreto y no tenían la capacidad para expandirse por el globo. Los pequeños núcleos de población que padecían la enfermedad morían o se inmunizaban, limitando así la capacidad de propagación de las infecciones.

Con el paso del tiempo se han desarrollado epidemias y pandemias de menor o mayor relevancia. Algunas datan de antes de cristo y se han desarrollado durante siglos, como es el caso de la Peste, que finalmente acabó causando la muerte de unos 25 millones de personas tras su llegada a Europa. Ya en el siglo XX el mundo fue azotado por la gripe española, una pandemia que se calcula que produjo más de 40 millones de muertos en todo el mundo. Por último, desde que empezó el nuevo siglo se han sucedido 3 pandemias. El Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) y la actual pandemia del COVID-19 que está muy relacionada con el SARS y el MERS. Todas ellas comparten su dependencia en lo que se refiere a la interacción entre personas y animales, la densidad de población y la conexión entre las distintas regiones del planeta (Høiby, 2020).

En la actualidad, el crecimiento constante de la población (actualmente la cifra se acerca a los 8 mil millones de habitantes) facilita la propagación de los agentes infecciosos. Además, el fenómeno de globalización favorece la extensión de este tipo de enfermedades a nivel mundial. Por tanto, es de suponer que esta pandemia no será la última. Investigar nuevas formas de combatir este tipo de sucesos es crucial si se quiere minimizar el impacto que ocasionan. Es por ello que CRISPR se maneja como una prometedora herramienta de defensa frente a las futuras pandemias que queden por llegar.

El **objetivo principal** del trabajo reside en valorar el grado de desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas como herramienta diagnóstica y terapéutica frente a la enfermedad del COVID-19,

así como discutir acerca de su uso frente a los métodos convencionales que se están empleando a día de hoy.

Los **objetivos específicos** son:

- Comprender qué son y cómo funcionan los sistemas CRISPR/Cas.
- Analizar y valorar los sistemas CRISPR propuestos para el diagnóstico y la terapia antiviral frente al COVID-19.
- Discutir las ventajas y desventajas de estos nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos respecto a los actuales.

## 4. METODOLOGÍA

El procedimiento para la realización de este trabajo consiste en una **revisión bibliográfica** de artículos científicos centrados en el uso de la tecnología de Ingeniería Genética denominada como CRISPR, y más en concreto, sobre las aplicaciones que podría tener para hacer frente a la enfermedad por COVID-19.

Para obtener dicha información se ha hecho uso de múltiples buscadores científicos vía online (*PubMed*, *Google Scholar* o *Alcorze* entre otros). También se ha hecho uso de sitios web relevantes, siendo el más importante para el trabajo la página web oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Algunos de los artículos empleados han sido proporcionados por el tutor del trabajo.

Las **palabras clave** que han facilitado la búsqueda de información han sido: “COVID-19”, “SARS-CoV-2”, “CRISPR/Cas”, “CRISPR-based diagnostics”, “antiviral therapy”...

Finalmente, para la elaboración de las referencias y citas bibliográficas se ha empleado el estilo Harvard.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. DESCUBRIMIENTO DE CRISPR/CAS

En el año 1987 se describió, por primera vez, la presencia de una serie de secuencias de ADN repetidas y regularmente espaciadas en el genoma de la bacteria *Escherichia coli* (Ishino et al, 1987).

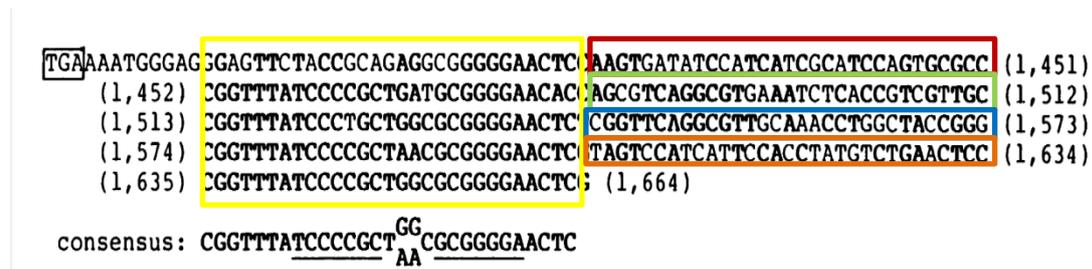


Figura 2. En amarillo se indican todas las secuencias repetidas en el genoma de *Escherichia coli*. Las secuencias espaciadoras se indican con el resto de colores. (Imagen extraída de Ishino et al, 1987).

Tras el descubrimiento de estas repeticiones se hallaron unas repeticiones muy similares a las de *E.coli* en el genoma de unos organismos muy distintos conocidos como arqueas (Mojica et al, 1993; 1995). Estos microorganismos que habitan las salinas, fueron los primeros en ser sometidos a un estudio dirigido a averiguar cuál podría ser la función de dichas secuencias (Mojica y Montoliu, 2016).

En el año 2000 se secuenciaron los genomas de una gran variedad de microorganismos procariontes, descubriendo así, la presencia de este tipo de repeticiones en la mayor parte de los organismos sometidos a estudio. Mojica y su grupo de investigación concluyeron que estos segmentos cortos y repetidos compartían una serie de características únicas, y que además, siempre se encontraban espaciados regularmente por secuencias diferentes entre sí. Las características descritas en este estudio hicieron que Mojica y su equipo acuñaran el término SRSRs, que es el acrónimo en inglés de “*Short Regularly Spaced Repeats*”, convirtiéndose en la primera denominación de este descubrimiento (Mojica et al, 2000).

En el año 2002 el científico holandés Ruud Jansen y su equipo de investigación acordaron, con el equipo de Francisco J.M. Mojica, usar el término CRISPR, que es el acrónimo en inglés de “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”, lo que se traduce en español como “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”. En el

mismo artículo en el que se nombraba por primera vez este término también se describía la presencia de los genes Cas asociados a CRISPR, lo cual evidenciaba la existencia de una relación funcional entre ambos elementos (Jansen et al, 2002).

Sin embargo, no fue hasta 2005 cuando se empezó a vislumbrar la función biológica de CRISPR en las bacterias. La relación entre CRISPR y la inmunidad de los organismos procariontes surgió tras observar que algunas de las secuencias espaciadoras eran homólogas a secuencias de ADN de virus o plásmidos, viendo así, que las bacterias portadoras de estas secuencias eran capaces de resistir el ataque de un fago que tuviera esa misma secuencia en su ADN (Mojica et al, 2005). El papel de CRISPR en la inmunidad bacteriana fue corroborado en 2007 después de demostrar, de forma experimental, la capacidad de que bacterias sensibles a bacteriófagos pudieran desarrollar resistencia contra estos mediante la incorporación de espaciadores derivados de la secuencia genómica del fago (Barrangou et al, 2007). Estos descubrimientos permitieron concluir que las bacterias presentaban una especie de sistema inmune adquirido.

En los años posteriores se realizaron numerosas investigaciones que permitieron describir detalladamente cada uno de los componentes de este sistema, y así obtener una mayor comprensión del mecanismo de acción de CRISPR/Cas.

Ya en el año 2012, una serie de estudios sobre el sistema CRISPR/Cas9, llevado a cabo por los laboratorios de Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, informaron sobre la sencillez de este mecanismo y la posibilidad de usarlo como una herramienta de edición del genoma (Jinek et al, 2012). Unos meses más tarde Feng Zhang y George Church demostraron que utilizando este sistema de defensa en células de mamíferos se podía modificar su genoma con una gran eficacia, haciendo realidad el uso de CRISPR/Cas como herramienta de edición genómica (Cong et al, 2013; Mali et al, 2013).

## **5.2. FUNDAMENTOS DE CRISPR/CAS**

Como ya se ha mencionado previamente, los sistemas CRISPR/Cas se encuentran de forma natural en bacterias y arqueas, constituyendo en ellas una especie de sistema inmune adaptativo que las protege frente a fagos invasores. CRISPR/Cas permite la incorporación, en el genoma de estos microorganismos, del material genético foráneo procedente del fago. De esta forma, si el virus o plásmido vuelve a atacar, será reconocido y destruido por este sistema.

La inmunidad de CRISPR en bacterias y arqueas se desarrolla en varias etapas.

Primero, el fago introduce su material genético en la célula huésped, iniciando la denominada fase de adaptación, durante la cual, la bacteria/arquea va a obtener una memoria celular del virus o plásmido invasor. Para ello, toma una copia de parte del material genético foráneo y la integra en la agrupación CRISPR como una secuencia espaciadora (Figura 3), lo cual confiere a la bacteria/arquea resistencia contra este fago.

Posteriormente, esta información contenida en la secuencia espaciadora se transcribe a una molécula de ARN guía (**gRNA** o **crARN**), la cual se acopla a la **proteína Cas** correspondiente. En caso de que se produzca reinfección, el ARN será el encargado de guiar a la proteína Cas hasta la secuencia invasora. Una vez el ARN reconozca la secuencia, la proteína Cas quedará activada y escindirá el material genético del fago (Thurtle-Schmidt y Lo, 2018).

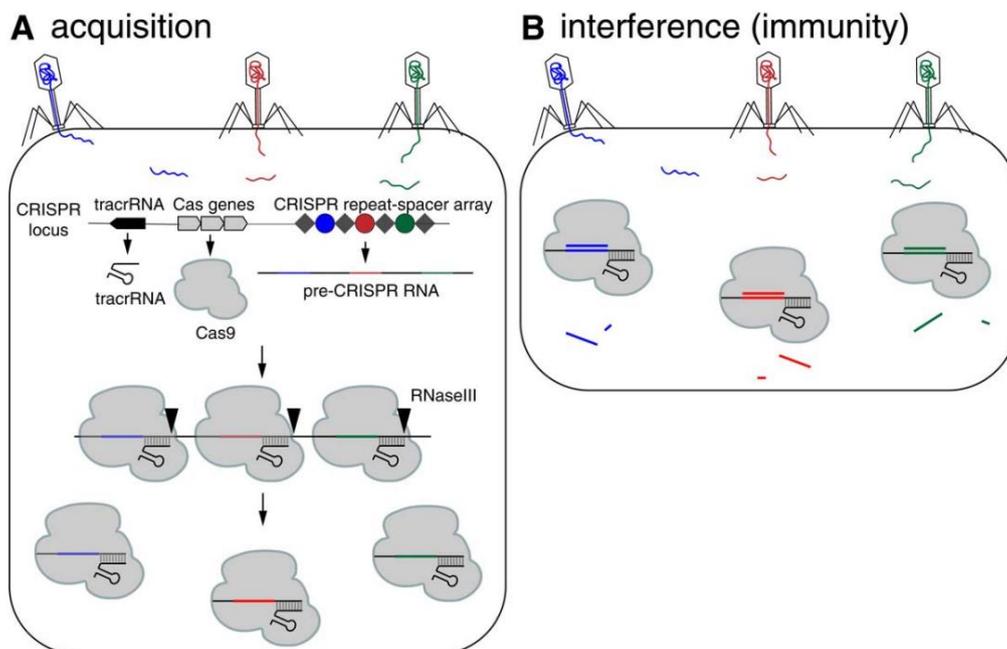


Figura 3. Funcionamiento de CRISPR/Cas9. Las secuencias de ADN del virus son integradas a la agrupación CRISPR como espaciadores (círculos de colores) que están flanqueados por secuencias repetidas (rombos grises). La unión del ARN transactivador a la molécula pre-CRISPR ARN favorece su maduración. Finalmente la ARNasa III permite formar ARN guía individuales (A), que junto con la proteína Cas9 reconocerán y destruirán el ADN invasor (B). (Imagen extraída de Thurtle-Schmidt y Lo, 2018).

### 5.3. CLASIFICACIÓN Y APLICACIONES DE CRISPR/CAS

Existe una gran variedad de sistemas CRISPR/Cas que difieren en el mecanismo molecular empleado para la detección y unión al material genético foráneo. Con el paso del tiempo, la cantidad y variedad de estos sistemas se ha incrementado.

En 2015, la clasificación incluía 2 clases de sistemas CRISPR con 5 tipos de sistemas y 16 subtipos. Ya en 2019 esta clasificación aumentó, identificando en las 2 clases 6 tipos de sistemas y hasta 33 subtipos (Makarova et al, 2019).

Los tipos I, III y IV, pertenecientes a la clase 1, necesitan de múltiples proteínas Cas (entre 4 y 7) para llevar a cabo su acción. Por el contrario, los tipos II, V y VI, pertenecientes a la clase 2, son sistemas que solo requieren de una proteína Cas para ejercer el mismo efecto. Los sistemas CRISPR/Cas de clase 1 son los más extendidos en bacterias y arqueas (Ishino et al, 2018).

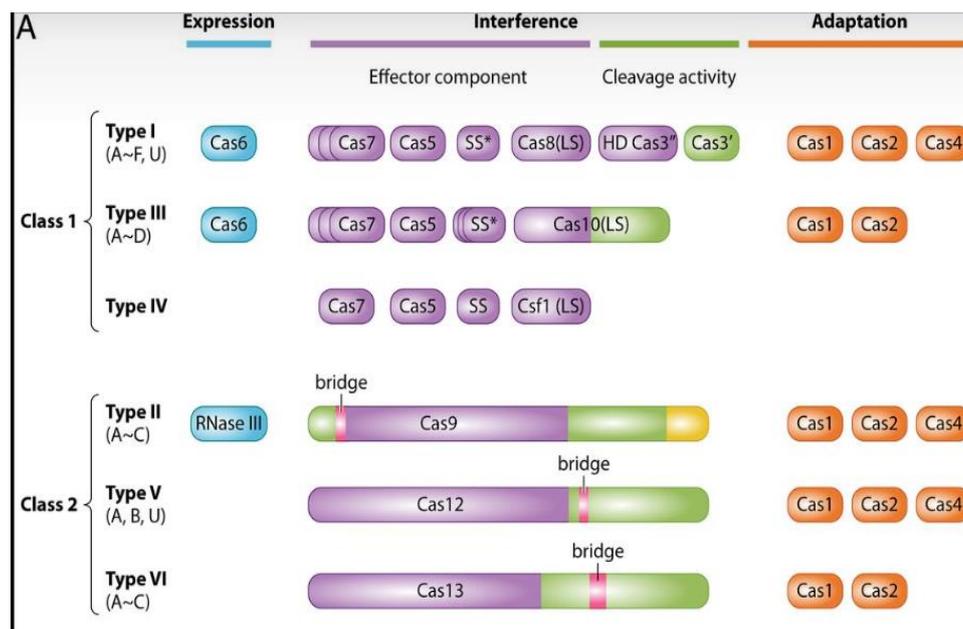


Figura 4. Proteínas Cas implicadas en cada etapa de la inmunidad CRISPR, según el tipo de sistema al que pertenezcan. (Imagen extraída de Ishino et al, 2018).

La sencillez de los sistemas CRISPR/Cas de clase 2 explica porque se escogieron para su uso como herramienta de edición genética, ya que, a la hora de transferir un sistema CRISPR/Cas bacteriano a células de otros organismos distintos, es más fácil hacer uso de aquellos sistemas con un menor número de genes.

Derivado de la diversidad de sistemas CRISPR/Cas existen una enorme cantidad de aplicaciones, las cuales ofrecen prometedoras contribuciones en áreas muy diversas.

Combatir las resistencias bacterianas, mejorar el rendimiento productivo en ganadería y agricultura, desarrollar terapias contra múltiples enfermedades, o idear nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas frente a agentes patógenos, son solo algunas de las muchas aplicaciones que ofrece una tecnología que con el paso de los años sigue creciendo y aumentando su potencial.

A continuación se exponen diferentes alternativas diagnósticas y terapéuticas basadas en CRISPR para hacer frente a la pandemia producida por el SARS-CoV-2.

## **5.4. DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

Desde la aparición del SARS-CoV-2 se han desarrollado numerosas pruebas diagnósticas con el objetivo de reducir la propagación del virus y así controlar la pandemia. Sin embargo, existen diversos desafíos que reducen el abanico de posibilidades a corto plazo. La insuficiente capacidad para la creación y realización de estas pruebas, la falta de suministro de las mismas, o el simple hecho de saber escoger la prueba adecuada según la situación de la enfermedad, son solo algunos de los muchos retos diagnósticos a los que se enfrentan los países de todo el mundo. A día de hoy se hace uso de tres pruebas de diagnóstico, que son las más relevantes para el manejo de los pacientes y el control de la pandemia (Peeling et al, 2021).

### **PRUEBAS DIAGNÓSTICAS CONVENCIONALES**

#### **Ag-RDT (TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS)**

Este test detecta en muestras nasofaríngeas las proteínas virales que el SARS-CoV-2 produce durante su replicación en las vías respiratorias. Un resultado positivo indicaría la presencia de SARS-CoV-2 y la alta probabilidad de que haya una infección en curso. Actualmente, estas pruebas están a la venta en farmacias para todo el público y requieren de una formación mínima para su uso, ofreciendo un resultado en aproximadamente 15 minutos (“World Health Organization 2021, Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection”).

#### **TEST DE ANTICUERPOS**

Esta prueba detecta en muestras de sangre la presencia de los anticuerpos IgM y/o IgG, los cuales se desarrollan entre 1 y 2 semanas después de la aparición de los síntomas. Por ello, y a

diferencia del test de antígenos, esta prueba no se emplea para el diagnóstico de la infección aguda sino para determinar si se ha producido o no infección en el individuo, ya que es un reflejo del desarrollo de la respuesta inmunológica frente a este (“Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2022, Información general sobre test de diagnóstico de COVID-19”).

### **RT-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA) EN TIEMPO REAL**

Es la primera prueba de diagnóstico molecular que se empleó para la detección del material genético del SARS-CoV-2. Este método detecta el ARN del virus, por lo que un resultado positivo implica la presencia del mismo en el individuo, y por ende una alta probabilidad de que exista una infección en curso. Las muestras que se recogen de los pacientes son tomadas en nasofaringe principalmente (“Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2022, Información general sobre test de diagnóstico de COVID-19”). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera esta técnica la más sólida y fiable en la detección del SARS-CoV-2, y es por ello que esta prueba se sigue manteniendo como el estándar de oro para el diagnóstico del COVID-19.

Pese a que estas tres pruebas son actualmente la referencia para el diagnóstico de COVID-19, ninguna de ellas es perfecta. Por ello, la comunidad científica sigue abriendo y desarrollando nuevas líneas de investigación con el objetivo de encontrar alternativas más eficientes, rápidas y baratas mediante la mejoría de los métodos ya existentes, y el uso de nuevas y prometedoras herramientas diagnósticas.

### **PRUEBAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN CRISPR/CAS**

Los recientes avances de los sistemas CRISPR/Cas han permitido el desarrollo de numerosas herramientas diagnósticas para la detección del SARS-CoV-2. Los diferentes métodos diagnósticos expuestos a continuación están basados en sistemas CRISPR de clase 2, siendo CRISPR/Cas12 y CRISPR/Cas13 (Figura 4) los más utilizados para la detección de patógenos en humanos.

La detección del virus por medio de los sistemas CRISPR/Cas suele comprender 5 pasos fundamentales (Figura 5), los cuales pueden presentar ligeras variaciones en función del tipo de prueba aplicada.

## **1. RECOGIDA DE MUESTRAS**

Primero se procede a la recogida de muestras mediante hisopado nasofaríngeo y/o orofaríngeo.

## **2. PREPARACIÓN DEL ARN VIRAL**

La muestra será procesada de diversas maneras con el objetivo de obtener un ARN viral de gran pureza, eliminando todos aquellos componentes que puedan interferir en el proceso diagnóstico.

## **3. AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DEL ÁCIDO NUCLEICO**

Mediante el uso de métodos isotérmicos se amplifica exponencialmente la secuencia objetivo, incrementando así la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica.

Los métodos más usados son:

- LAMP (amplificación isotérmica mediada por lazos): Esta técnica hace uso de una ADN polimerasa, y un conjunto de 4 cebadores diseñados para amplificar las cadenas del ADN diana de forma específica y eficiente. Esta herramienta trabaja a una temperatura constante de unos 65 °C y ofrece resultados en menos de una hora (Wong et al, 2018).
- RPA (amplificación por recombinasa-polimerasa): RPA puede amplificar de 1-10 copias del ADN diana en menos de 20 minutos. Además, al trabajar a bajas temperaturas (37-42°C) su aplicación en entornos de bajos recursos es más factible (Lobato y O'Sullivan, 2018).

Estos métodos se han planteado como una alternativa a la PCR, ya que no requieren de equipos de laboratorio tan costosos. Sin embargo, su uso por separado presenta algunas limitaciones como la aparición de falsos negativos. Dichas limitaciones se pueden sortear si combinamos estos métodos de amplificación con las herramientas CRISPR/Cas.

## **4. DETECCIÓN Y GENERACIÓN DE LA SEÑAL**

La molécula guía (gRNA o crRNA según los tipos de Cas), identifica la secuencia objetivo y dirige a la proteína Cas correspondiente para que escinda el material genético diana, provocando la liberación posterior de una señal detectable de diversas formas.

En el caso de Cas12, Cas 13, o alguna de sus variantes más utilizadas, el fundamento de detección y generación de la señal se basa en la actividad nucleasa de rotura colateral inespecífica de ácidos nucleicos en forma de DNA, ssDNA (Cas12) o RNA (Cas13). En

primer lugar el complejo CRISPR-Cas y el RNA guía (crRNA), reconoce de forma específica el genoma del patógeno presente en la muestra, provocando su rotura en “cis”. Como consecuencia de este reconocimiento molecular, se modifica el complejo CRISPR/Cas adquiriendo una “conformación activada” que es capaz de romper en “trans” de forma indiscriminada e inespecífica a otros ácidos nucleicos. En presencia de ssDNA sintéticos que incluyan un reportero o fluoróforo unido a un inhibidor de la fluorescencia o “quencher”, la rotura inespecífica en “trans” libera al reportero de su inhibidor, haciendo detectable su señal (Chen et al, 2018; Gootenberg et al, 2017).

## 5. LECTURA DE LA SEÑAL

La señal liberada tras la escisión del ARN viral será detectada mediante tiras de fluorescencia o de flujo lateral, obteniendo en la mayor parte de los casos un resultado cualitativo que indica si el ARN viral objetivo está o no presente en la muestra (Hernández-García et al, 2022).

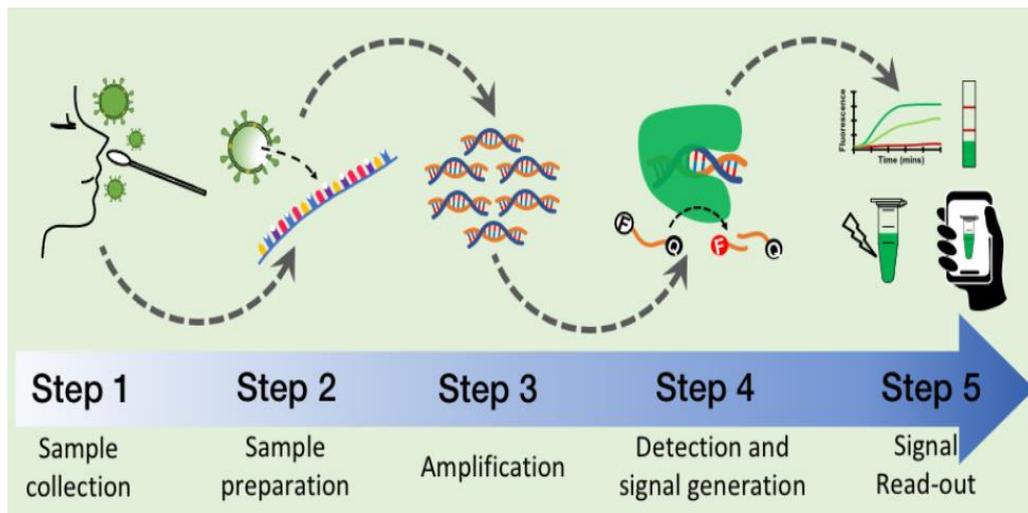


Figura 5. Flujo de trabajo CRISPR para la detección del SARS-CoV-2. (Imagen extraída de Hernández-García et al, 2022).

### a) PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN CRISPR/CAS13

#### SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing)

SHERLOCK es una herramienta diagnóstica basada en **CRISPR/Cas13a**, la cual fue desarrollada inicialmente para la detección de cepas de los virus del Zika y el Dengue. Así como la mayor parte de enzimas Cas se dirigen al ADN, Cas13 únicamente detecta y escinde moléculas de ARN monocatenarias, lo cual la convierte en una herramienta de interés para la detección directa de virus ARN (Gootenberg et al, 2017).

Tras la aparición del COVID-19 el laboratorio de Feng Zhang desarrolló un protocolo para la detección del material genético del SARS-CoV-2, basado en esta técnica. Dicho protocolo funciona en tres pasos y se puede completar en 1 hora. Una vez se ha extraído la muestra del paciente, se amplifica el material genético usando el kit de amplificación de polimerasa recombinasa (RPA). A continuación se detecta la secuencia de ARN viral amplificado con Cas13, para finalmente proceder a la lectura del resultado usando una tira reactiva (Zhang et al, 2020). La alta sensibilidad obtenida por esta prueba ha convertido a SHERLOCK en la primera herramienta diagnóstica basada en CRISPR en ser aprobada por la FDA (*"Food and Drug Administration"*) de Estados Unidos para el diagnóstico de COVID-19 (Uzay y Dinçer, 2022).

Con el paso del tiempo esta herramienta se ha ido optimizando con el objetivo de ampliar su uso y reducir sus limitaciones.

#### **CREST (Cas13-based, Rugged, Equitable, Scalable Testing)**

Esta plataforma basada en **CRISPR/Cas13** se diseñó para abordar problemas como la falta de accesibilidad a ciertos reactivos o la disponibilidad de equipos de laboratorio costosos. Para ello, hace uso de enzimas más disponibles en el mercado, termocicladores de bajo coste y visualizadores fluorescentes fáciles de interpretar. Se trata de una plataforma diagnóstica con una sensibilidad equivalente a la RT-qPCR, pero más rentable y accesible (Rauch et al, 2021).

#### **SHINE (SHERLOCK and HUDSON Integration to Navigate Epidemics)**

La combinación de SHERLOCK con HUDSON (*"Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases"*) es un método que emplea a **Cas13** para detectar su objetivo directamente en las muestras clínicas del paciente, ya que permite eliminar la fase previa de extracción del ARN del SARS-CoV-2. Para ello se aplica un tratamiento termoquímico sobre las muestras, que inactiva a las enzimas responsables de degradar el ARN objetivo (protocolo HUDSON). El producto resultante es sometido a un protocolo SHERLOCK optimizado en el que se realiza la amplificación y detección en un solo paso. Los resultados de esta prueba se pueden visualizar con lectura fluorescente en el tubo, y se pueden interpretar con una aplicación móvil desarrollada específicamente para ello (Arizti-Sanz et al, 2020).

#### **CARMEN (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids)**

Se trata de una prometedora técnica basada en **CRISPR/Cas13** que combina la estrategia SHERLOCK con la microfluídica, mediante el uso de dos tipos de nanogotas. Unas contienen las muestras clínicas codificadas con distintos colores y las otras portan a Cas13, crARN y otros

reactivos del sistema de detección. Estas nanogotas se mezclan en una serie de micropocillos, iniciando así múltiples reacciones que generan resultados fluorescentes, los cuales se pueden visualizar con microscopía fluorescente. Esta técnica puede analizar un gran número de muestras y también de patógenos, siendo su principal objetivo diagnosticar la presencia del SARS-CoV-2 en más de 1000 pacientes a la vez (Ackerman et al, 2020).

### **CRISPR/COVID**

Esta plataforma basada en **CRISPR/Cas13a** fue una de las primeras en desarrollarse para el diagnóstico de COVID-19. Los resultados obtenidos tras el estudio con muestras de ARN en pacientes sospechosos de infección por SARS-CoV-2, la posicionaron como una alternativa competitiva frente a la RT-qPCR en la detección del SARS-CoV-2 (Hou et al, 2020).

### **b) PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN CRISPR/CAS12**

#### **STOPCOVID (Sherlock Testing in One Pot)**

STOPCOVID es una herramienta basada en **CRISPR/Cas12** para el diagnóstico de COVID-19. Cas12 es una ADNasa guiada por ARN capaz de escindir el ADN objetivo, lo cual implica la transcripción inversa del material genético del SARS-CoV-2 para su detección.

Existen dos versiones de esta prueba que difieren en el método de extracción del ARN. La segunda versión utiliza un método de extracción más simple mediante el uso de perlas magnéticas, las cuales concentran el ARN viral simplificando todo el proceso. Tras la extracción del ARN se lleva a cabo la amplificación isotérmica y la detección mediada por CRISPR en un solo paso. Para la amplificación se escoge RT-LAMP, la cual funciona a 55-70 °C, por lo que la enzima Cas12 empleada debe ser termoestable, como es el caso de **Cas12b**. La segunda versión de STOPCOVID es capaz de detectar cargas virales de 0,033 copias/μl, con un tiempo medio de respuesta de entre 15 y 45 minutos (Joung et al, 2020).

#### **DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter)**

Esta prueba diagnóstica basada en **CRISPR/Cas12** detecta la presencia de los genes E (envoltura) y N (nucleocápside) del SARS-CoV-2 en el ARN de las muestras nasofaríngeas, tras su amplificación con RT-LAMP. La lectura se lleva a cabo con la tira de flujo lateral, que en caso de detectar ambos genes confirmaría la presencia del virus. Al igual que SHERLOCK, esta prueba también ha sido aprobada por la FDA de Estados Unidos para su uso de emergencia como prueba diagnóstica de COVID-19 (Chen et al, 2018; Broughton et al, 2020).

### **RCSMS (Rapid Coronavirus-Sensitive Monitoring from Saliva)**

Además, DETECTR ha servido de base para el desarrollo de RCSMS, una herramienta que aplica un tratamiento termoquímico de bajo coste para la preparación del ARN viral en muestras de saliva, omitiendo así el paso de extracción del ARN. Tras su validación clínica en pacientes peruanos, RCSMS demostró ser una prueba molecular capaz de detectar genes del SARS-CoV-2 en muestras de saliva, con un tiempo medio de respuesta de 40 minutos (Abugattás Núñez del Prado et al, 2021).

### **CRISPR-FDS**

Este método basado en **CRISPR/Cas12** también puede detectar el SARS-CoV-2 en muestras de saliva, las cuales se diluyen en tubos que contienen tampones de lisis bajo unas condiciones de temperatura y tiempo controladas. Posteriormente las muestras son añadidas a pocillos que contienen los reactivos necesarios para su amplificación y detección (RT-RPA+CRISPR/**Cas12a**). Para su lectura se usa un dispositivo portátil que contiene un diodo láser que permite visualizar los resultados con un teléfono inteligente. El tiempo medio de respuesta fue de tan solo 15 minutos, alcanzando un límite de detección de 0,38 copias/ $\mu$ L (Ning et al, 2020).

### **AIOD/CRISPR (All-In-One Dual CRISPR/Cas12a)**

Este método basado en **CRISPR/Cas12a** se caracteriza por hacer uso de dos crARN con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la prueba diagnóstica, empleada tanto para la detección del SARS-CoV-2 como del virus del VIH (Ding et al, 2020).

La combinación de varios crARN también fue empleada por el equipo de Fozouni, que a principios de 2020 comenzó a desarrollar un método basado en **CRISPR/Cas13a** para la detección de ARN viral, que tras una adecuada selección de varias de estas moléculas crARN permitía evitar la necesidad de amplificar el material genético del virus (Fozouni et al, 2020).

### **opvCRISPR (One-pot visual reverse transcription (RT)-LAMP CRISPR)**

Se trata de un sistema de detección visual de SARS-CoV-2 basado en **CRISPR/Cas12a** que integra RT-LAMP y la escisión llevada a cabo por Cas12a en un solo recipiente. Tras la escisión del ADN se genera la señal fluorescente, la cual es visible bajo luz azul (Wang et al, 2021).

Esta optimización del proceso de lectura de los resultados también se observa en las herramientas de detección de material genético **CASDETECT (CRISPR/Cas12b)** y

**CRISPR/Cas12a-NER**, en las cuales los resultados también se pueden visualizar directamente bajo iluminación led azul (Guo et al, 2020; Wang et al, 2020).

Aunque la mayor parte de las pruebas diagnósticas del COVID-19 se basan en sistemas CRISPR pertenecientes a la clase 2, también hay excepciones como es el caso de **CONAN**, una plataforma diagnóstica basada en un sistema CRISPR de clase 1, que utiliza a la proteína **Cas3** para la detección del SARS-CoV-2 (Yoshimi et al, 2020).

Asimismo, **VIGILANT (VirD2-dCas9 guided and LFA-coupled nucleic acid test)** es un ensayo de flujo lateral que combina las funciones de **CRISPR/Cas9** y la proteína VirD2 para así detectar el material genético del SARS-CoV-2 en muestras de pacientes (Marsic et al, 2021).

Las principales características de cada herramienta diagnóstica basada en CRISPR/Cas se resumen en la **Tabla 1 del Anexo**.

## **DISCUSIÓN**

Como ya se ha comentado anteriormente, la prueba RT-qPCR sigue siendo una clara referencia en el diagnóstico de COVID-19. Sin embargo, presenta una serie de limitaciones que pueden subsanarse haciendo uso de las herramientas diagnósticas basadas en CRISPR/Cas.

Estas herramientas presentan una serie de ventajas prácticas, así como una gran versatilidad. Pruebas como CRISPR-FDS y RCSMS hacen uso de la saliva como muestra para la detección de SARS-CoV-2, manteniendo una sensibilidad similar e incluso superior a la obtenida por medio del hisopado nasofaríngeo (Wong et al, 2020). Esto supone una gran ventaja, pues las muestras de saliva se pueden obtener fácilmente y pueden ser colectadas por el propio paciente, sin poner en peligro la salud del trabajador.

Una de las principales desventajas de la RT-qPCR es el prolongado tiempo de respuesta. La necesidad de disponer de equipamiento sofisticado y personal especializado conlleva que la prueba se tenga que realizar en laboratorios acreditados y no en el punto de atención al paciente. Esto, sumado al tiempo necesario para completar el procedimiento diagnóstico en el laboratorio (entre 2 y 8 horas), puede llegar a suponer un tiempo total de entrega de resultados de más de 24 horas. La optimización de procesos como el aislamiento y la amplificación del ARN permiten que estas plataformas basadas en CRISPR puedan llevarse a cabo en los puntos de recogida de muestras, reduciendo el tiempo de respuesta a una media

de 45 minutos (media extraída de los datos recogidos en la **Tabla 2 del Anexo**). A su vez, la paulatina simplificación de estos protocolos diagnósticos basados en CRISPR reduce el coste de estas pruebas. Los materiales necesarios para su realización no solamente son más baratos, sino que además son más fáciles de obtener en cualquier parte del globo, lo cual tiene mucha importancia de cara a su aplicación en áreas de bajos recursos. Pruebas como SHERLOCK se pueden desarrollar sin superar el dólar, mientras que la RT-qPCR puede llegar a costar más de 100 dólares (Böger et al, 2021).

Los métodos de interpretación de resultados también se han mejorado hasta el punto de desarrollar aplicaciones móviles que faciliten al paciente la lectura de los mismos, sin necesidad de tener que llevar a cabo este proceso con instrumentos de laboratorio.

Otro dato esperanzador para estas nuevas herramientas diagnósticas es la elevada sensibilidad y especificidad que presentan (**Tabla 2 del Anexo**), ya que los resultados obtenidos son muy similares a los aportados por la RT-qPCR, llegando a reportar en algunas pruebas hasta un 100% de sensibilidad y especificidad.

Finalmente, uno de los grandes problemas a los que se tienen que enfrentar las diferentes pruebas diagnósticas del COVID-19 es la continua aparición de nuevas variantes del virus, ya que estas pueden presentar mutaciones en los sitios de unión de los crARN, inutilizando así la técnica diagnóstica. No obstante, gracias a la versatilidad de los sistemas CRISPR/Cas, se puede sortear esta limitación mediante la combinación de diferentes crARN. De esta forma, si hubiera una mutación en alguno de los sitios de unión la señal fluorescente generada sería distinta, lo cual serviría de advertencia ante la posibilidad de que se trate de una variante del virus.

Aun a pesar de todas sus ventajas, las plataformas CRISPR/Cas para el diagnóstico de COVID-19 todavía no están disponibles en el mercado, y muy pocas han sido autorizadas para su uso de emergencia durante la presente pandemia. Esto se debe a que son pruebas con una escasa validación en pacientes, lo cual pone en duda su eficiencia de cara a su uso clínico masivo.

## **5.5. TERAPIA FRENTE AL COVID-19**

Una mayoría de las personas infectadas por SARS-CoV-2, desarrollan una enfermedad leve o moderada, con la replicación del virus limitada a la vías respiratorias superiores, mientras que en un porcentaje variable, progresan a una severa neumonía bilateral que puede terminar en el fallecimiento del paciente (ver Lamers y Haagmans, 2022, para una revisión reciente de la patogénesis asociada).

La estrategia inicial de tratamiento de la COVID-19 severa fue la oxigenoterapia, junto a tratamientos clínicos que han ido implantándose a medida que progresaba la pandemia y se adquiría experiencia hospitalaria en la mejora de los protocolos de actuación. Medidas para prevenir el tromboembolismo y la administración de medicamentos antiinflamatorios como la dexametasona, han sido esenciales para combatir la enfermedad en su manifestación más severa, caracterizada por la desmedida respuesta inmune del paciente (Gandhi et al, 2020).

No obstante, el principal medio para combatir la pandemia es la vacunación a escala mundial (Aileni et al, 2022). Esta herramienta de prevención activa el sistema inmunitario iniciando así la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Actualmente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha autorizado un total de cinco vacunas para su comercialización y administración en la población (ver información en <https://vaccination-info.eu/en/covid-19/covid-19-vaccines>). A su vez, también continúa revisando numerosas vacunas con el objetivo de disponer de datos suficientes para poder solicitar su aprobación para su uso en la Unión Europea ("Preguntas y respuestas sobre la vacunación contra la COVID-19 en la UE").

Sin embargo, las vacunas no son el único recurso frente a la pandemia. Desde la aparición de la enfermedad, se han desarrollado múltiples opciones terapéuticas dirigidas a combatir el SARS-CoV-2 en las diferentes etapas de su desarrollo. El uso de tratamientos antivirales y anticuerpos monoclonales en las fases tempranas de la infección permite combatir de forma más efectiva el virus, dificultando que se multiplique en el organismo y desarrolle formas clínicas graves (ver una revisión actualizada de tratamientos disponibles en "National Institutes of Health 2022, COVID-19 Treatment Guidelines").

Finalmente, más allá de las terapias convencionales que se siguen desarrollando e intentando adaptar para su uso clínico masivo, y a pesar de que la mayor parte de los estudios con CRISPR/Cas se han enfocado en el área del diagnóstico, estas herramientas vuelven a presentarse como una potencial alternativa para hacer frente al COVID-19, mediante su uso como agente antiviral.

#### **PAC-MAN (Prophylactic Antiviral CRISPR in huMAN cells)**

Esta estrategia basada en **CRISPR/Cas13d** hace uso de múltiples crARN dirigidos a regiones virales altamente conservadas del SARS-CoV-2. A través de un análisis bioinformático se demostró que un grupo de seis crARN podían cubrir más de un 90% de los coronavirus secuenciados, y con un grupo de 22 crARN el 100%. El estudio llevado a cabo por Abbott et al,

demonstró el potencial de este sistema CRISPR para localizar y degradar secuencias del virus en células epiteliales de pulmón (Abbott et al, 2020).

Además de PAC-MAN, se han desarrollado otras herramientas antivirales similares basadas en sistemas CRISPR. Este es el caso del sistema **CRISPR/Cas13a** desarrollado para combatir la infección por SARS-CoV-2 y el virus de la Influenza en ratones y hámsters. El diseño de crARN específicos dirigidos a ciertas regiones conservadas del SARS-CoV-2 consiguió reducir la replicación del virus así como los síntomas de la enfermedad (Blanchard et al, 2021). A su vez, la plataforma antiviral **CRISPR/Cas13b** también ha demostrado su capacidad para suprimir la replicación de este virus en células de mamíferos (Fareh et al, 2021).

Nalawansha y Samarasinghe (2020), sugirieron dos variantes de internalización de Cas13 en la célula en el curso de la infección. En el primero, denominado ABACAS (Antibody and Cas fusion), la fusión de Cas13 a anticuerpos que reconocen determinadas proteínas de SARS-CoV-2, permitiría la entrada del complejo junto con el virus en las células infectadas.

En el otro procedimiento, denominado PDCas13 (Peptidase Domain of ACE2 and Cas13) se sugiere sustituir el anticuerpo de ABACAS frente al virus, por el dominio peptidasa del receptor ACE2, que al unirse a la proteína S del virus, facilitaría la internalización del complejo CRISPR/Cas13 al interior de la célula infectada, haciendo posible la degradación del RNA del genoma viral.

Por otro lado, también se ha desarrollado una terapia antiviral basada en un sistema CRISPR de tipo III conocido como **TEAR-COV (Type III CRISPR Endonuclease AntiviRals for CoronaViruses)**, el cual también puede escindir el genoma viral (Lin et al, 2022).

Finalmente, otro de los campos donde se está desarrollando CRISPR (**CRISPR/Cas9** en concreto) es en la producción de vacunas antivirales, aunque es un enfoque que de momento se centra en animales (Najafi et al, 2022).

## **DISCUSIÓN**

El uso de CRISPR como plataforma de combate frente al COVID-19 se ha desarrollado mucho menos en comparación con las estrategias diagnósticas comentadas en el apartado 5.4 del presente trabajo. Sin embargo, su potencial como técnica terapéutica para hacer frente, no solo al COVID-19, sino también a otras infecciones virales, la han convertido en una alternativa a los tratamientos y vacunas antivirales convencionales.

La principal ventaja de estas novedosas herramientas es que son capaces de solventar el problema ocasionado por las continuas mutaciones del virus y la consiguiente aparición de variantes capaces de eludir las terapias convencionales. Estas plataformas CRISPR se dirigen a múltiples regiones muy conservadas del virus, evitando así el escape viral, ya que el virus tendría que acumular numerosas mutaciones en varias regiones que además podrían comprometer su viabilidad. También hay que tener en cuenta que estas herramientas son muy versátiles y pueden adaptarse fácilmente para controlar otros virus emergentes.

Sin embargo, todavía se deben abordar grandes desafíos como garantizar que CRISPR se administre lo más cerca posible de su lugar de acción. Para ello, se han desarrollado vectores virales (no patógenos para el ser humano) que tengan afinidad por los tejidos en los que debe actuar dicho sistema, y así aumentar la eficiencia de entrega. Estos vectores también tienen sus propias limitaciones y es por ello que se está estudiando la posibilidad de hacer uso de vectores no virales para realizar dicha tarea. Otro problema que debe solventarse es la actuación de CRISPR fuera del objetivo, para lo cual también se están desarrollando estrategias que todavía deben ser probadas si se quiere hacer uso de esta tecnología en entornos clínicos (Najafi et al, 2022).

## **6. CONCLUSIONES**

1. La pandemia producida por el COVID-19 ha generado un gran impacto socioeconómico y sanitario en todo el mundo, manifestando así la necesidad de desarrollar pruebas diagnósticas y enfoques terapéuticos rápidos, eficientes y específicos.
2. Los recientes avances en Ingeniería Genética han posicionado a los sistemas CRISPR/Cas como una prometedora alternativa para hacer frente al SARS-CoV-2, así como a otros agentes causantes de epidemias y pandemias.
3. Las pruebas diagnósticas basadas en CRISPR han demostrado ser rápidas, eficientes y económicas, permitiendo su fácil aplicación en el punto de atención al paciente, y en áreas de bajos recursos.
4. Tratamientos antivirales como PAC-MAN atacan regiones muy conservadas del genoma del virus, previniendo el escape viral ante la aparición de variantes mutantes del mismo. A su vez, estas terapias antivirales basadas en CRISPR pueden adaptarse para controlar otros agentes infecciosos emergentes.
5. Desafíos como la administración de los componentes CRISPR en pacientes, así como la escasa validación clínica de muchas de estas herramientas, son barreras que todavía

hay que superar para conseguir su aprobación oficial para su comercialización y uso en humanos.

## **6.1. CONCLUSIONS**

1. The pandemic produced by COVID-19 has generated a major socioeconomic and health impact worldwide, thus manifesting the need to develop rapid, efficient and specific diagnostic tests and therapeutic approaches.
2. Recent advances in genetic engineering have positioned CRISPR/Cas systems as a promising alternative to deal with SARS-CoV-2, as well as other agents causing epidemics and pandemics.
3. CRISPR-based diagnostic tests have proven to be rapid, efficient and cost-effective, allowing their easy application at the point of patient care, and in low-resource areas.
4. Antiviral treatments such as PAC-MAN target highly conserved regions of the virus genome, preventing viral escape in the presence of mutant variants of the virus. In turn, these CRISPR-based antiviral therapies can be adapted to control other emerging infectious agents.
5. Challenges such as the administration of CRISPR components in patients, as well as the scarce clinical validation of many of these tools, are barriers that still need to be overcome in order to obtain official approval for their commercialization and use in humans.

## **7. VALORACIÓN PERSONAL**

En mi opinión, la investigación de esta herramienta de Ingeniería Genética, junto con todas las aplicaciones que puede llegar a ofrecer, es algo fundamental para continuar progresando en un mundo cada vez más poblado e interconectado, en el que la aparición de ciertos agentes infecciosos puede llegar a poner en jaque la salud mundial.

En este sentido, ya he comentado todas las ventajas que ofrece CRISPR como herramienta diagnóstica y terapéutica frente a los métodos convencionales. La efectividad, aplicabilidad y versatilidad de CRISPR la convierten en una alternativa prometedora, no solo frente al COVID-19, sino también frente a otros muchos agentes infecciosos que azotan a buena parte de la población del planeta. Sin embargo, considero que hace falta una mayor validación clínica para garantizar su eficacia y seguridad en el ser humano.

Desde un enfoque académico, comprender el funcionamiento de una herramienta que hasta hace poco menos de un año no conocía en absoluto ha convertido este trabajo en un auténtico

reto. Es por ello que quiero agradecer la gran labor de mi tutor Pedro Muniesa, quién ha resuelto todas mis dudas y me ha ayudado a entender este complejo campo de investigación.

Finalmente agradecer a mi familia y amigos por el apoyo recibido durante los años vividos en la Facultad de Veterinaria.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, T. R. et al. (2020). "Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and Influenza". *Cell*, 181(4), pp. 865–876. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.020
2. Abugattás Núñez del Prado, J. et al. 2021. "Clinical validation of RCSMS: a rapid and sensitive CRISPR-Cas12a test for the molecular detection of SARS-CoV-2 from saliva". Hospital Nacional. MedRxiv. doi: 10.1101/2021.04.26.21256081
3. Ackerman, C. M. et al. (2020). "Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13". *Nature*, 582(7811), pp. 277–282. doi: 10.1038/s41586-020-2279-8
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. "Información general sobre test de diagnóstico de COVID-19". [Internet]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%9919/informacion-general-sobre-tests-de-diagnostico-de-covid-19/#antigenos>  
(Consultado el 21 de abril de 2022)
5. Aileni, M. et al. (2022). "Biotechnological perspectives to combat the COVID-19 pandemic: Precise diagnostics and inevitable vaccine paradigms". *Cells*, 11(7), 1182. doi: 10.3390/cells11071182
6. Aleem, A. et al. (2022). "Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19)". In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk570580>  
(Consultado el 13 de abril de 2022).
7. Arizti-Sanz, J. et al. (2020). "Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2". *Nature Communications* 11(1), 5921. doi: 10.1038/s41467-020-19097-x
8. Barrangou, R. et al. (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes". *Science*, 315(5819), pp. 1709–1712. doi: 10.1126/science.1138140

9. Blanchard, E. L. et al. (2021). "Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents". *Nature Biotechnology*, 39(6), pp. 717–726. doi: 10.1038/s41587-021-00822-w
10. Blum, P. et al. (2021). "Impact of the Covid-19 pandemic on orthopaedic and trauma surgery – A systematic review of the current literature". *In Vivo*, 35(3), pp. 1337–1343. doi: 10.21873/invivo.12386
11. Böger, B. et al. (2021). "Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19". *American Journal of Infection Control*, 49(1), pp. 21–29. doi: 10.1016/j.ajic.2020.07.011
12. Bong, C.-L. et al. (2020). "The COVID-19 pandemic: Effects on low- and middle-income countries". *Anesthesia & Analgesia*, 131(1), pp. 86–92. doi: 10.1213/ane.0000000000004846
13. Brooks, S. K. et al. (2020). "The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence". *The Lancet*, 395(10227), pp. 912–920. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30460-8
14. Broughton, J. P. et al. (2020). "CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2". *Nature Biotechnology*, 38(7), pp. 870–874. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4
15. Cano-Valderrama, O. et al. (2020). "Acute care surgery during the COVID-19 pandemic in Spain: Changes in volume, causes and complications. A multicentre retrospective cohort study". *International Journal of Surgery*, 80, pp. 157–161. doi: 10.1016/j.ijsu.2020.07.002
16. Cascella, M. et al. (2022). "Features, evaluation, and treatment of Coronavirus (COVID-19)". In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> (Consultado el 18 de marzo de 2022).
17. Chen, J. S. et al. (2018). "CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity". *Science*, 360(6387), pp. 436–439. doi: 10.1126/science.aar6245
18. Comisión Europea, web oficial. "Preguntas y respuestas sobre la vacunación contra la COVID-19 en la UE". [Internet]. Disponible en: [https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans/questions-and-answers-covid-19-vaccination-eu\\_es#vaccination](https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans/questions-and-answers-covid-19-vaccination-eu_es#vaccination) (Consultado el 9 de junio de 2022)
19. Cong, L. et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems". *Science*, 339(6121), pp. 819–823. doi: 10.1126/science.1231143

20. Ding, X. et al. (2020). "Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay". *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-18575-6
21. European Vaccination Information Portal. "COVID-19 vaccines". [En línea]. Disponible en: <https://vaccination-info.eu/en/covid-19/covid-19-vaccines> (Consultado el 14 de junio de 2022)
22. Fareh, M. et al. (2021). "Reprogrammed CRISPR-Cas13b suppresses SARS-CoV-2 replication and circumvents its mutational escape through mismatch tolerance". *Nature Communications*, 12(1). doi: 10.1038/s41467-021-24577-9
23. Fozouni, P. et al. (2020). "Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy". *Cell*, vol 184, pp. 323-333. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.001
24. Gandhi, R. T. et al. (2020). "Mild or moderate Covid-19". *New England Journal of Medicine*, 383(18), pp. 1757–1766. doi: 10.1056/nejmcp2009249
25. Gao, Z. et al. (2020). "A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(1), pp. 12-16. doi: 10.1016/j.jmii.2020.05.001
26. Gootenberg, J. S. et al. (2017). "Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2". *Science*, 356(6336), pp. 438–442. doi: 10.1126/science.aam9321
27. Guo, L. et al. (2020). "SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics". *Cell Discovery*, 6(1). doi: 10.1038/s41421-020-0174-y
28. Hernández-García, A. et al. (2022). "Diagnostics of COVID-19 based on CRISPR-Cas coupled to isothermal amplification: A comparative analysis and update". *Preprints 2022*, 2022030089. doi: 10.20944/preprints202203.0089.v1
29. Høiby, N. (2020). "Pandemics: Past, present, future". *Apmis*. doi: 10.1111/apm.13098
30. Hou, T. et al. (2020). "Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19". *PLOS Pathogens*, 16(8), Artículo e1008705. doi: 10.1371/journal.ppat.1008705
31. Hu, B. et al. (2021). "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19". *Nat Rev Microbiol* 19, pp. 141–154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
32. Ishino, Y. et al. (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversión in *Escherichia coli*, and identification of the gene product". *Journal of Bacteriology*, vol. 169, pp. 5429-5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987

33. Ishino, Y. et al. (2018). "History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology". *Journal of Bacteriology*, 200(7). doi: 10.1128/jb.00580-17
34. Jansen, R. et al. (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes". *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
35. Jinek, M. et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science*, 337(6096), pp. 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
36. Jones, E. A. K., Mitra, A. K. y Bhuiyan, A. R. (2021). "Impact of COVID-19 on mental health in adolescents: A systematic review". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2470. doi: 10.3390/ijerph18052470
37. Joung, J. et al. (2020). "Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing". *New England Journal of Medicine*, 383(15), pp. 1492–1494. doi: 10.1056/nejmc2026172
38. Kaye, A.D. et al. (2021). "Economic impact of COVID-19 pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives". *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, Volume 35, Issue 3, pp. 293-306. doi: 10.1016/j.bpa.2020.11.009
39. Lamers, M. M. y Haagmans, B. L. (2022). "SARS-CoV-2 pathogenesis". *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), pp. 270–284. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0
40. Lin, P. et al. (2022). "Type III CRISPR-based RNA editing for programmable control of SARS-CoV-2 and human coronaviruses". *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkac016
41. Lindert, J. et al. (2021). "The COVID-19 disaster and mental health—assessing, responding and recovering". *European Journal of Public Health*, Volume 31, Issue Supplement\_4, pp. 31–35. doi: 10.1093/eurpub/ckab153
42. Lobato, I. M. y O'Sullivan, C. K. (2018). "Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, pp. 19–35. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015
43. Makarova, K. S. et al. (2019). "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants". *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), pp. 67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
44. Mali, P. et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9". *Science*, 339(6121), pp. 823–826. doi: 10.1126/science.1232033

45. Marsic, T. et al. (2021). "Vigilant: An engineered VirD2-Cas9 complex for lateral flow assay-based detection of SARS-CoV2". *Nano Letters*, 21(8), pp. 3596–3603. doi: 10.1021/acs.nanolett.1c00612
46. Mojica, F.J.M. et al. (1993). "Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites". *Mol. Microbiol.* 9, pp. 613–621. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.
47. Mojica F.J.M. et al. (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". *Mol. Microbiology*, 17, pp. 85-93. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_17010085.x.
48. Mojica, F. J. M. et al. (2000). "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria". *Molecular Microbiology*, 36(1), pp. 244–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x
49. Mojica, F. J. M. et al. (2005). "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements". *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
50. Mojica, F. J. M. y Montoliu, L. (2016). "On the origin of CRISPR-Cas technology: From prokaryotes to mammals". *Trends in Microbiology*, 24(10), pp. 811–820. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.005
51. Najafi, S. et al. (2022). "Therapeutic potentials of CRISPR-Cas genome editing technology in human viral infections". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112743. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112743
52. Nalawansha, D. A. y Samarasinghe, K. T. G. (2020). "Double-Barreled CRISPR technology as a novel treatment strategy for COVID-19". *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(5), pp. 790–800. doi: 10.1021/acspsci.0c00071
53. National Institutes of Health. (2022). "COVID-19 Treatment Guidelines". [Internet]. Disponible en: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/> (Consultado el 14 de junio de 2022)
54. Nehme, M. et al. (2020). "COVID-19 symptoms: Longitudinal evolution and persistence in outpatient settings". *Annals of Internal Medicine*. doi: 10.7326/m20-5926
55. Ning, B. et al. (2020). "A smartphone-read ultrasensitive and quantitative saliva test for COVID-19". *Science Advances*, 7(2), Artículo eabe3703. doi: 10.1126/sciadv.abe3703
56. Peeling, R. W. et al. (2021). "Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control". *The Lancet*, Volume 399, pp. 757-768. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02346-1

57. Rauch, J. N. et al. (2021). "A scalable, easy-to-deploy protocol for Cas13-based detection of SARS-CoV-2 genetic material". *Journal of Clinical Microbiology*, 59(4). doi: 10.1128/jcm.02402-20
58. Singh, D. y Yi, S.V. (2021). "On the origin and evolution of SARS-CoV-2". *Exp Mol Med* 53, pp. 537-547. doi: 10.1038/s12276-021-00604-z
59. Thurtle-Schmidt, D. M. y Lo, T.-W. (2018). "Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates". *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2), pp. 195–205. doi: 10.1002/bmb.21108
60. Uzay, İ. A. y Dinçer, P. (2022). "CRISPR-based approaches for the point-of-care diagnosis of COVID19". *Acta Médica*, 53(1), pp. 1–14. doi: 10.32552/2022.actamedica.626
61. Wang, R. et al. (2021). "opvCRISPR: One-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection". *Biosensors and Bioelectronics*, 172, 112766. doi: 10.1016/j.bios.2020.112766
62. Wang, X. et al. (2020). "Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER". *Science Bulletin*, 65(17), pp. 1436–1439. doi: 10.1016/j.scib.2020.04.041
63. Weng, L.-M., Su, X. y Wang, X.-Q. (2021). "Pain symptoms in patients with coronavirus disease (COVID-19): A literature review". *Journal of Pain Research*, Volume 14, pp. 147–159. doi: 10.2147/jpr.s269206
64. Wong, S. C. Y. et al. (2020). "Posterior oropharyngeal saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)". *Clinical Infectious Diseases*, 71(11), pp. 2939–2946. doi: 10.1093/cid/ciaa797
65. Wong, Y. P. et al. (2018). "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms". *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), pp. 626–643. doi: 10.1111/jam.13647
66. World Health Organization (WHO). (2021). "Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: interim guidance". [Internet]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345948>  
(Consultado el 22 de abril de 2022)
67. World Health Organization (WHO). (2021). "WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part". [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>  
(Consultado el 15 de abril de 2022)

68. World Health Organization (WHO). "WHO coronavirus (COVID-19) dashboard". [En línea]. Disponible en: <https://covid19.who.int/>  
(Consultado el 17 de junio de 2022)
69. Wu, Z. y McGoogan, J. M. (2020). "Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China". JAMA, 323(13), pp. 1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648
70. Yoshimi, K. et al. (2020). "Rapid and accurate detection of novel Coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3". SSRN Electronic Journal. doi: 10.2139/ssrn.3640844
71. Zhang, F. et al. 2020. "A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics". Broad Institute, Vol 8.

## 9. ANEXOS

Tabla 1. Características de los test diagnósticos basados en CRISPR/Cas

TEST DIAGNÓSTICO	CRISPR	MUESTRA	AISLAMIENTO DE ARN	MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN	LECTURA	REFERENCIA
SHERLOCK	Cas13a	NF/OF	-	RT-RPA	FL	Uzay y Dinçer, 2022
CREST	Cas13a	NF	PEARL	PCR	F	Rauch et al, 2021
SHINE	Cas13a	NF/OF	IT	RT-RPA	F/FL	Arizti-Sanz et al, 2020
CRISPR/COVID	Cas13a	NF	-	RT-RPA	F	Hou et al, 2020
STOPCOVID v.2.	Cas12b	NF	PM	RT-LAMP	F/FL	Joung et al, 2020
DETECTR	Cas12a	NF/OF	-	RT-LAMP	FL	Broughton et al, 2020
RCSMS	Cas12a	SALIVA	IT	RT-LAMP	FL	Abugattás Núñez del Prado et al, 2021
CRISPR-FDS	Cas12a	SALIVA	LO	RT-RPA	F-SP	Ning et al, 2020
AIOD/CRISPR	Cas12a	HN	-	RT-RPA	F	Ding et al, 2020
Fozouni et al	Cas13a	-	-	NP	F-SP	Fozouni et al, 2020
opvCRISPR	Cas12a	NF	-	RT-LAMP	F	Wang et al, 2021
CASDETECT	Cas12b	-	-	RT-RAA	F	Guo et al, 2020
CRISPR/Cas12a-NER	Cas12a	NF	-	RT-RAA	F	Wang et, 2020
CONAN	Cas3	NF	-	RT-LAMP	FL	Yoshimi et al, 2020
VIGILANT	Cas9	NF/OF	-	RT-RPA	FL	Marsic et al, 2021

F: Fluorescencia. FL: Flujo Lateral. F-SP: Fluorescencia con lectura con Smart Phone. HN: Hisopado clínico no especificado. IT: Inactivación termoquímica. LO: Proceso de lisis optimizado. NF: Hisopo nasofaríngeo. NP: No hay preamplificación. OF: Hisopo orofaríngeo. PEARL: precipitation-enhanced analyte retrieval. PM: Perlas magnéticas.

**Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos basados en CRISPR/Cas en comparación con la RT-qPCR**

TEST DIAGNÓSTICO	TIEMPO DE RESPUESTA	LÍMITE DE DETECCIÓN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	REFERENCIAS
RT-qPCR	2-8 horas	1 copia/ $\mu$ L	-	-	Uzay y Dinçer, 2022
SHERLOCK	<60'	10-100 copias/ $\mu$ L	96%	100%	Uzay y Dinçer, 2022
CREST	2 horas	10 copias/ $\mu$ L	-	-	Rauch et al, 2021
SHINE	50'	10 copias/ $\mu$ L	90%	100%	Arizti-Sanz et al, 2020
CRISPR/COVID	40'	2,5-7,5 copias/reacción	100%	100%	Hou et al, 2020
STOPCOVID v.2.	15-45'	0,033 copias/ $\mu$ L	93,10%	98,50%	Joung et al, 2020
DETECTR	30-40'	10 copias/ $\mu$ L	95%	100%	Broughton et al, 2020
RCSMS	40'	5 copias/reacción	93,80%	99%	Abugattás Núñez del Prado et al, 2021
CRISPR-FDS	15'	0,38 copias/ $\mu$ L	98,70-100%	100%	Ning et al, 2020
AIOD/CRISPR	40'	4,6 copias/ $\mu$ L	100%	100%	Ding et al, 2020
Fozouni et al	<30'	100 copias/ $\mu$ L	-	-	Fozouni et al, 2020
opvCRISPR	45'	5 copias/reacción	100%	100%	Wang et al, 2021
CASDETECT	60'	10 copias/ $\mu$ L	-	-	Guo et al, 2020
CRISPR/Cas12a-NER	45'	10 copias/reacción	100%	100%	Wang et, 2020
CONAN	40'	5 moléculas/ $\mu$ L	90%	95%	Yoshimi et al, 2020
VIGILANT	36'	2,5 copias/ $\mu$ L	96,4%	100%	Marsic et al, 2021