



**Análisis retrospectivo de la técnica CRISPR-Cas: una herramienta metodológica con potencial para el diagnóstico de enfermedades virales**

**Monografía presentada como requisito parcial para optar al título de Profesional en Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Bogotá D.C. Julio 2019**



**Análisis retrospectivo de la técnica CRISPR-Cas: una herramienta metodológica con potencial para el diagnóstico de enfermedades virales**

**Monografía para optar al título de Profesional en Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Investigador Principal  
JEIMY TATIANA RODRÍGUEZ PINEDA**

**Asesor Interno  
MAURICIO HUMBERTO RODRÍGUEZ PANDURO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Bogotá D.C. Julio 2019**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

*Por sus bendiciones; guiarme en cada paso que doy, su infinita misericordia y amor, por dejarme siempre una nueva enseñanza y permitirme ver la vida de manera diferente, porque este es el siguiente paso que doy para iniciar una vida llena de nuevos retos y triunfos y todo es por él y gracias a él.*

### **A mi hija**

*María José*

*Por su motivación, paciencia, por su amor incondicional, por comprender el motivo de mis ausencias y valorar este proceso con el objetivo de mejorar nuestra calidad de vida.*

### **A mi familia**

*Especialmente a mi Madre, Padre, Hermanas y Tía*

*Por su inmensa colaboración en este proceso, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, por brindarme siempre palabras de aliento, por guiarme siempre, por creer en mí como persona y como profesional.*

*¡Mil Gracias!*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi asesor**

*Mauricio Panduro*

*Por ofrecerme las herramientas académicas y humanas para el desarrollo de este trabajo, por actuar de manera profesional exigiendo y pidiendo de mí lo mejor, por valorar lo poco y mucho que avanzaba y aprendía, por corregir mis errores, cosas que me enseñan a ser mejor cada día y me ayudan a crecer como persona y como profesional en mi carrera.*

### **A la directora del Programa**

*Johanna Moscoso*

*Por ser siempre ese ángel en mi vida, aconsejándome, apoyándome, brindándome siempre esa voz de aliento para no rendirme nunca, diciéndome - "Ya casi, falta poco" "ya mira donde estas"-, por brindarme las herramientas que me ayudaron a estar aquí y ahora.*

### **A mi Alma Mater**

*Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*

*Por ser parte fundamental en mi formación profesional*

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Nucleasas sitio- específicas utilizadas en edición genómica.....	24
<b>Tabla 2</b> <u>Nucleasas del sistema CRISPR-Cas, su papel en las fases de inmunidad y en qué clase del sistema han sido identificadas.</u> .....	31
<b>Tabla 3</b> Pruebas de diagnóstico viral .....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Proceso por el que el sistema CRISPR-Cas9 inactiva virus e integra parte de sus secuencias en el genoma de una bacteria.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 2</b> Línea de tiempo de los campos de investigación de ingeniería del genoma CRISPR-Cas, se muestran los principales acontecimientos en ambos campos. Los cuales se fusionaron en el 2012 con el descubrimiento de que Cas9 es una endonucleasa de ADN ARN- programable, lo que lleva que a partir del 2013 Cas9 se utilizara para la modificación de genes en células humanas, así como otros tipos de células y organismos. ....	22
<b>Figura 3</b> Esquematización comparativa de las diferentes etapas de funcionamiento en los distintos tipo de sistemas CRISPR-Cas (tipos I, II y III).....	28
<b>Figura 4</b> Componentes y etapas del sistema CRISPR de tipo II en cuanto a la defensa de la célula contra agentes invasores. ....	34
<b>Figura 5</b> Protocolo para el diagnóstico diferencial de Zika, Dengue y Chikungunya.....	42
<b>Figura 6</b> Métodos diagnósticos de Dengue .....	44
<b>Figura 7</b> Prueba ELISA basada en la detección de antígenos virales .....	44
<b>Figura 8</b> Representación esquemática de: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (La cadena recién formada se representa de color más claro.....	51
<b>Figura 9</b> Esquema de detección viral directamente en la muestra del paciente por medio de HUDSON y SHERLOCK.....	63
<b>Figura 10:</b> Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. K) Esquema de lectura de flujo lateral de detección de LwaCas13a mejorada con EiCsm6 de ssRNA de DENV. L) Detección de flujo lateral mejorada de EiCsm6 de ARN de DENV sintético en combinación con LwaCas13a sin preamplificación por RPA. Cuantificación de la intensidad de la banda.....	65
<b>Figura 11:</b> Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. A) Esquema de detección de flujo lateral con SHERLOCK. B) Detección de ARNss de ZIKV sintético	

utilizando SHERLOCK de flujo lateral con 1 hora de reacción LwaCas13a. C)	
Cuantificación de la intensidad de la banda a partir de la detección en (B).....	66
<b>Figura 12</b> Detección del virus de ZIKA dilución en orina, lectura en tiras de flujo lateral. La banda superior es la prueba y la banda inferior es el control. Una banda débil es visible en 10 copias por microlitro tanto en diluciones por PBS como en orina, una hora post detección. ....	67
<b>Figura 13:</b> Detección en tiras de flujo lateral de DENV a partir de muestras tratadas con tris(2-carboxietil) clorhidrato de fosfina (TCEP)- EDTA antes de ser calentadas.....	67
<b>Figura 14.</b> Idioma de publicación de los documentos consultados .....	78
<b>Figura 15</b> Bases de datos consultadas .....	78
<b>Figura 16</b> eje central de investigación .....	79

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
RESUMEN .....	16
1. INTRODUCCION .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo general .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. ANTECEDENTES .....	20
4. MARCO TEÓRICO.....	23
4.1. Edición génica.....	23
4.2 Nucleasas de dedos de Zinc (ZFN).....	25
4.3. Nucleasas de tipo activadores de la transcripción (TALENS) .....	26
4.4. REPETICIONES PALINDRÓMICAS CORTAS AGRUPADAS Y REGULARMENTE INTERESPACIADAS (CRISPR).....	26
4.4.1. SISTEMA CRISPR-Cas y su historia .....	26
4.5. Clasificación del sistema CRISPR-Cas .....	27
4.5.1. Proteínas asociadas (Cas) .....	30
4.6. Mecanismo de acción de CRISPR-Cas.....	32
4.7. Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas .....	34
4.7.1. Fibrosis quística .....	34
4.7.2. Enfermedades neuromusculares.....	35



4.7.3. Retinitis pigmentosa.....	36
4.7.4. Cáncer.....	36
4.7.5. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	37
4.8. Enfermedades virales de importancia en salud pública .....	38
4.8.1. Enfermedad por el virus del papiloma humano VPH.....	39
4.8.2. Cáncer cervical.....	40
4.8.3. Enfermedad por el virus de Zika .....	41
4.8.4. Enfermedad por el virus del dengue.....	43
4.8.5. Enfermedad por el virus de la fiebre amarilla .....	45
4.9. PRUEBAS EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES EN COLOMBIA .....	47
4.9.1. Cultivo celular.....	47
4.9.2. Amplificación de Acidos Nucleicos NAATS .....	48
4.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	49
4.9.4. RT-PCR.....	52
4.9.5. Secuenciación de Segunda generación NGS .....	52
4.9.6. Espectrofotometría de masas .....	<u>52</u>
4.9.7. Inmunoensayos.....	53
4.9.8. Inmunofluorescencia .....	53
5. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES....	57
6. CRISPR-Cas UNA HERRAMIENTA CON POTENCIAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES .....	59
7. SHERLOCK .....	60
7.1. Estudios realizados aplicando la herramienta de diagnóstico SHERLOCKv2.....	63
7.2. Preparación de las muestras.....	64

7.3. DETECTR .....	68
8. Estudios realizados aplicando la herramienta de diagnóstico DETECTR ..	69
9. IMPLICACIONES PARA COLOMBIA Y LA BACTERIOLOGÍA.....	72
10. METODOLOGÍA.....	75
11. RESULTADOS.....	77
12. RESULTADOS MÁS RELEVANTES DE LOS ARTÍCULOS REVISADOS .....	80
12.1 EDICIÓN GÉNICA.....	80
12.2. Diagnóstico de enfermedades virales .....	80
13. DISCUSIÓN .....	83
REFERENCIAS.....	<u>89</u>

## ABREVIATURAS

- **CRISPR:** Repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas y agrupadas. Sistema de inmunidad adquirida procariota basado en la adquisición de espaciadores para la defensa frente a un material genético extracelular.
- **CAS:** Son proteínas asociadas al sistema adaptativo CRISPR
- **ZFN:** Nucleasas de dedos de Zinc
- **TALENS:** Nucleasas de tipo activadores de la transcripción
- **NAAT:** Prueba de amplificación de ácidos nucleicos
- **NGS:** Secuenciación de segunda generación
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **RT-PCR:** Reacción en cade de la polimerasa en tiempo real
- **ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- **Espaciadores:** secuencias de origen exógeno presentes entre las repeticiones de la región CRISPR
- **Pre-crRNA:** Los loci de CRISPR se transcriben en largos fragmentos de ARN que después deben ser procesados en forma de crRNA para interaccionar con la molécula diana
- **crRNA:** ARN CRISPR. Posterior al procesamiento del pre-crRNA, se obtienen moléculas de ARN de un espaciador concreto que genera homología con su protoespaciador correspondiente
- **pre- espaciador:** Secuencia correspondiente a un fragmento de material genético exógeno tributario a convertirse en un espaciador durante la primera exposición.
- **Protoespaciador:** Material genético diana complementario al espaciador de crRNA. De origen exógeno
- **PAM:** Protospacer adjacent motifs (motivo adyacente al protoespaciador) secuencia de entre 2 y 5 nucleótidos inmediatamente adyacente al protoespaciador. Se considera un sistema de discriminación con el fin de evitar la respuesta autoinmune frente a los espaciadores
- **tracrRNA:** Trans-activating CRISPR RNA (ARNA trans activador de CRISPR). Molécula de ARN necesaria en algunos sistemas CRISOPR que interactúa con el crRNA. Suele ser complementaria a las repeticiones de las regiones del loci CRISPR

- **RNasa:** Ribonucleasa, enzima que cataliza el ARN en componente más pequeños
- **dsDNA:** ADN de doble cadena
- **FokI:** Esta enzima es una endonucleasa de restricción, presente naturalmente en *Flavobacterium okeanoikoites*
- **NHEJ:** Recombinación no homologa, es una ruta que repara rupturas en la doble hebra de ADN, de denominación no homologa porque los extremos rotos son directamente ligados sin necesidad de un molde homologo.
- **HDR:** Reparación dirigida por homología, mecanismo en que las células reparan lesiones de su ADN de doble hebra
- **DSB:** Rupturas de la doble hebra del material genético
- **RGENs:** Endonucleasas guiadas por ARN
- **SgRNA:** ARN de guía única. ARN elaborado a partir de la fusión de un tracr-RNA y un crRNA
- **Cas9:** Enzima endonucleasa de ARN guía asociada al sistema adaptativo CRISPR de inmunidad en *Streptococcus pyogenes*,
- **Cas12a:** Endonucleasa asociada a CRISPR capaz de generar un corte en las secuencias de ADN de manera más precisa que Cas9
- **Cas13:** Endonucleasa capaz de unir y dividir secuencias de ARN de manera programática
- **ARNm:** ARN mensajero, transfiere el código genético del núcleo de una célula a un ribosoma en el citoplasma, actúa como plantilla o patrón para la síntesis proteica
- **IPSCs:** Células madre pluripotentes inducidas
- **HR:** Recombinación homologa, es un tipo de recombinación en las que las secuencias de nucleótidos intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN
- **CFTR:** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)
- **DMD:** Distrofia muscular de Duchenne
- **RPGR:** Retinitis pirmentosa FTPase regulator. Gen encargado de enviar señales que activan la producción de la proteína esencial para la visión normal.
- **LTR:** Secuencia larga terminal
- **CPE:** Efecto citopático
- **SDA:** Amplificación de desplazamiento en cadena
- **SHERLOCK:** Specific High-Sensitivity enzymatic reporter unLOCKing

- **HUDSON:** Calentamiento de muestras de diagnóstico no extraídas para eliminar nucleasas
- **T7 RNA polimerasa:** Es una enzima polimerasa del bacteriófago T7 que cataliza la formación de ARN a partir del ADN en dirección 5´ a 3´
- **TCEP:** (tris(2-carboxietil) fosfina) agente reductor para romper enlaces disulfuro dentro y entre las proteínas
- **EDTA:** Acido etilendiaminotetraacético, es un agente quelante de iones de Calcio
- **FAM-RNA-BIOTINA:** molécula fluorescente, permite cuantificar los sitios de unión a biotina, o su concentración.
- **ANTI-FAM:** Anticuerpos policlonal de tipo IgG del gen FAM
- **SIKV:** Virus del Zika
- **DENV:** Virus del Dengue
- **VFA:** Virus de la Fiebre Amarilla
- **DETECTR:** DNA endonucleasa targeted CRISPR trans-reporter
- **VPH:** Virus del papiloma Humano



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

## **ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE CRISPR-Cas UNA HERRAMIENTA CON POTENCIAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES**

### **RESUMEN**

El descubrimiento de los sistemas CRISPR-Cas lleva una larga trayectoria desde su descripción inicial en 1987 con aplicaciones en el área de la edición genética con CRISPR-Cas9, en el área agrícola y específicamente en el diagnóstico de enfermedades virales. El sistema CRISPR-Cas13a y Cas12a brinda al Bacteriólogo y laboratorista clínico una herramienta para el diagnóstico de enfermedades virales, permitiendo la identificación de secuencias de ácidos nucleicos específicas de cualquier microorganismo de manera altamente eficaz, precisa y económica. Desde su descubrimiento como un sistema de inmunidad adaptativa en organismos procariontes, sus características estructurales y funciones han sido estudiadas y redefinidas hasta conocer como CRISPR-Cas13a y Cas12a incrementan la versatilidad del sistema para su empleo en el área de la salud e investigación. En el presente trabajo se realiza una revisión teórica de las características generales, estructurales y funcionales de CRISPR-Cas13a y Cas12a proteínas que juegan un papel fundamental en uso de la herramienta CRISPR-Cas para el diagnóstico de enfermedades virales, así como las aplicaciones que perfilan el sistema como una de las más novedosas y eficaces herramientas biotecnológicas conocidas.

**Palabras clave:** Edición génica, CRISPR-Cas13a, CRISPR-Cas12a, Enfermedades virales, Diagnóstico

## 1. INTRODUCCION

Los investigadores que centran sus estudios en edición génica se han enfocado en gran medida en encontrar mecanismos que permitan la edición de genes sin errores, de manera confiable y precisa. Desde el hallazgo de secuencias cortas y regularmente interespaciadas en bacterias como mecanismo de defensa ante invasiones por virus, se ha estudiado la capacidad de estas secuencias para editar genes en compañía de las proteínas asociadas al sistema (Cas) las cuales presentan diferentes aplicaciones, una de ellas el diagnóstico de enfermedades virales.

En la actualidad los métodos más usados para el diagnóstico de enfermedades virales son: Las líneas celulares, inmunoensayos, pruebas NAAT, NGS, espectrofotometría de masas, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunofluorescencia, ELISA, nefelometría cuantitativa, entre otros;(1) herramientas que permiten la amplificación de un fragmento de DNA de interés, detecta la presencia de Antígenos o anticuerpos en una muestra, etc (1).

Aunque estas herramientas presentan ventajas considerables, también son métodos costosos tanto para los materiales e implementos que requiere, como para las capacitaciones del personal y mantenimiento del equipo (1).

Adicionalmente se presentan en algunos casos baja especificidad y sensibilidad. Por ello, el sistema CRISPR surge a partir de la investigación del sistema de defensa de las bacterias, hallazgos utilizados posteriormente para la edición genética, herramienta que sería años más tarde una alternativa factible para la detección de ácidos nucleicos; de forma rápida, de bajo costo, específica y sensible, con la capacidad de brindar resultados en cuestión de minutos (tabla n°4) sin requerir el uso de equipos especializados. Por estos factores, CRISPR-Cas se ha convertido en uno de los sistemas con mayor potencial en el diagnóstico de enfermedades virales y actualmente se estudia para ser implementada con herramientas como SHERLOCKv2 y DETECTR (60).

Gracias a los beneficios que ofrecen estas herramientas de diagnóstico de enfermedades virales permiten que las comunidades de bajos recursos y habitantes de zonas de difícil acceso reciban tratamiento oportuno (2).

En este trabajo abordaremos este tema desde el descubrimiento de las secuencias CRISPR, hasta los resultados de las investigaciones que demuestran la efectividad del sistema para el diagnóstico de enfermedades virales. Finalizando con las implicaciones para Colombia y la bacteriología. En el primer capítulo hablaremos de la Edición génica; abordando dos técnicas anteriormente implementadas como son las Nucleasas de dedos de Zinc ZFN y las Nucleasas de tipo activadores de la transcripción TALENs. En el segundo Capítulo explicaremos el sistema CRISPR desde su descubrimiento como sistema de inmunidad adaptativa para bacterias y casi todas las Arqueas, que es, su clasificación, proteínas asociadas (Cas), sus mecanismos de acción y sus aplicaciones, haciendo énfasis en este último para dar un breve paso por las enfermedades en las que han venido trabajando, usando la proteína Cas9. Estas investigaciones dan lugar al descubrimiento de nuevas proteínas asociadas al sistema CRISPR, que con sus particularidades funciones y utilidades han demostrado tener potencial para ser usadas como herramientas para el diagnóstico de enfermedades virales. Para entender los beneficios que estas herramientas brindan, es necesario hablar no solo de las características de algunas de las enfermedades virales de importancia en salud pública (tercer capítulo) sino también conocer cuáles son las pruebas usadas actualmente para diagnosticarlas y las dificultades que presentan, tema que será tratado en el cuarto capítulo. A Continuación, en el quinto capítulo trata las dos herramientas implementadas recientemente para el diagnóstico de enfermedades virales como lo son SHERLOCK y DETECTR; explicando los estudios que se han realizado que permiten demostrar su efectividad y las expectativas a futuro. Y finalmente las implicaciones que estos avances científicos traen para colonia y la bacteriología.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Realizar un análisis retrospectivo del sistema CRISPR- Cas haciendo énfasis en su potencial como herramienta para el diagnóstico de enfermedades virales de importancia en salud pública.

### **2.2. Objetivos específicos**

– Trazar una línea de tiempo que indique la trayectoria del sistema CRISPR-Cas en cuanto a su descubrimiento, aplicaciones, resultados de las investigaciones realizadas, ventajas, desventajas y aplicaciones a futuro.

– Describir el funcionamiento de las nuevas técnicas de Diagnóstico de enfermedades infecciosas implementadas a partir del sistema CRISPR.

– Analizar las aplicaciones de la herramienta CRISPR-Cas12a y Cas13a, las dificultades que pueda presentar y los beneficios para el diagnóstico de enfermedades de tipo viral.

### 3. ANTECEDENTES

En 1953 los científicos de la Universidad de Cambridge James D. Watson y Francis Crick descubrieron que el ADN tiene una estructura de doble hélice enrolladas alrededor del mismo eje (3), una vez conocida su estructura se podrían utilizar protocolos experimentales que conducen a la transferencia de información genética de un organismo a otro, tecnología conocida como ADN recombinante (4). En 1982 se emplearon técnicas para edición genética como las nucleasas de dedos de Zinc (ZFN) y las nucleasas tipo activadores de la transcripción (TALENs) que presentan ciertos inconvenientes debido a que las enzimas que estas técnicas emplean para la edición de genes hay que diseñarlas, lo cual implica gran costo y tiempo. (1)

Hacia 1987 Ishino y sus colaboradores de la Universidad de Osaka, en Japón, descubrieron en una cepa de *Escherichia coli*, unas repeticiones regularmente espaciadas dentro de un fragmento de ADN; diferentes a cualquier otro tipo conocido (5).

En un estudio realizado entre 1993, y 1995, un grupo de investigación liderado por Francisco Mojica, descubren la repetición de secuencias en microorganismo procedentes de las Salinas de Alicante. En el transcurso de los años 90's se hallaron estas secuencias CRISPR en *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, entre otras especies (5).

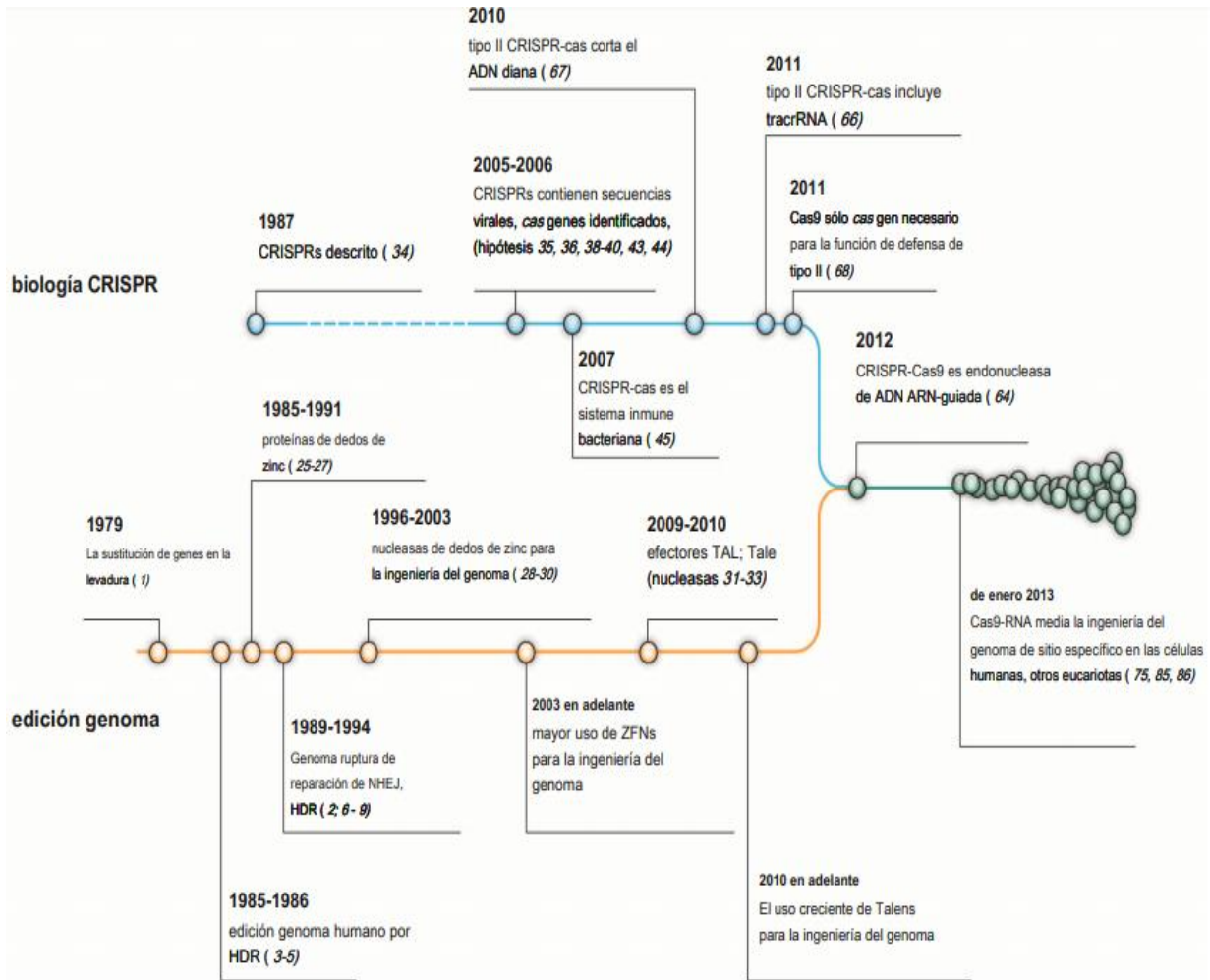
En el año 2000 denominaron estas secuencias SRSR (short regularly spaced repeats) y un año más tarde debido a la complejidad de la abreviatura denominarían secuencias CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)(6). En el 2002 Jansen realiza la identificación de los genes Cas (7). que conjugado con las proteínas asociadas el sistema (Cas), brinda una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la medicina, la industria agrícola, industria farmacéutica, entre otros. (8). A mediados de la década del 2000 en algunos laboratorios de microbiología y bioinformática se hicieron predicciones acerca de las funciones de CRISPR en la reparación de ADN o regulación de

genes (9,10) Para el 2005 se observaron que muchas de las secuencias espaciadoras dentro de CRISPR son de origen viral (11,12), junto con esto el hallazgo que los loci CRISPR se transcriben y a su vez se observó que los genes Cas codifican proteínas con dominios nucleasa y helicasa, estas proteínas asociadas al sistema Cas se encargan de ejecutar la acción del sistema (11). Se propuso desde ese momento que CRISPR-cas es un sistema de defensa adaptativa que podría utilizar ARN anti-sentido debido a la memoria del sistema inmune por invasiones previas. Para el 2007 los estudios de infecciones por *Streptococcus thermophilus* por fagos líticos llevada a cabo por el investigador Barrangou en una empresa de lácteos proporcionaron la primera evidencia de que CRISPR-Cas brinda inmunidad adaptativa (12).

En el 2008, los ARN maduros de CRISPR (crRNAs) sirven como guías en un complejo de proteínas Cas para interferir en la proliferación del virus en *Escherichia coli*.(13).

Aproximadamente desde el 2013 se está explorando el sistema de manera que sea posible desarrollar endonucleasa de ARN-guía o nucleasas de ingeniería (RGENs) que permiten la edición del genoma dirigida en células humanas cultivadas, en embriones de pez cebra y en bacterias. Desde entonces se ha utilizado exitosamente RGENs para modificar genomas de distintas especies, de manera que esté a la altura que sus precursores, nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs) (14).

A partir del 2012 se realizan estudios por dos grupos de investigación liderados por Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier y por otro lado el liderado por Feng Zhang abordando las proteínas asociadas al sistema como herramientas potenciales para el diagnóstico de enfermedades virales. Tema que desarrollaremos más adelante.



**Figura 1** Línea de tiempo de los campos de investigación de ingeniería del genoma CRISPR-Cas, se muestran los principales acontecimientos en ambos campos. Los cuales se fusionaron en el 2012 con el descubrimiento de que Cas9 es una endonucleasa de ADN ARN- programable, lo que lleva que a partir del 2013 Cas9 se utilizara para la modificación de genes en células humanas, así como otros tipos de células y organismos.

**Tomada de:** Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ) [Internet]. 2014 Nov 28 [cited 2019 Apr 27];346(6213):1258096–1258096. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430774> (15)

## **4. MARCO TEÓRICO**

Las enfermedades de base genética constituyen un grupo de patologías de gran importancia, no solo por su incidencia; alrededor de un 1% de los bebés nacen con algún tipo de anormalidad genética, sino por los problemas que producen; estas enfermedades comprometen la calidad de vida de los afectados, causando discapacidades intelectuales o físicas según el caso. A su vez, estas enfermedades pueden tener un carácter degenerativo que condicionan una mortalidad precoz (16). Es allí donde la Edición genética juega un papel fundamental para abordar esta problemática. De los estudios realizados respecto a la utilidad del sistema CRISPR-Cas en la edición de genes, se resaltan otras proteínas asociadas al sistema con capacidad para detectar secuencias específicas del genoma de virus, capacidad que sería de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades virales (17).

### **4.1. Edición génica**

La edición de genomas se refiere a un tipo de ingeniería genética capaz de manipular directamente secuencias en sitios específicos en el genoma. En general, se realiza a partir del corte de ADN en ambas cadenas en secuencias específicas y únicas del genoma. Esto seguido de procesos de reparación por recombinación homóloga (reorganización de genes dentro de los cromosomas el cual se produce entre secuencias de ADN idénticas o parecidas) o no homóloga (es una ruta que repara rupturas en la doble hebra de ADN, sin que las secuencias de ADN sean idénticas o parecidas) (18).

La edición de genómica es una técnica poderosa capaz de descifrar la función de un gen, la base genética de la enfermedad. Métodos de edición genética tradicionales, tales como mutagénesis dirigida y aleatoria basados en productos químicos o la integración aleatoria de secuencias de ADN, confieren cambios genéticos indiscriminados de una forma ineficiente que requiere la incorporación de secuencias sintéticas no deseables o el uso de condiciones de cultivo aberrantes (18).

En la necesidad de obtener mecanismos que permitan la edición de genes, las investigaciones han encontrado un sistema que permite hacerlo de manera específica, sencilla, a partir de secuencias CRISPRs que se encuentran en la mayor parte de las bacterias y casi todas las arqueas. Antes de llegar a ese punto se utilizaron técnicas como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), Nucleasas de tipo activadores de transcripción (TALENs) que presentan ciertas desventajas y complicaciones (19) (Figura 1).

Herramientas de edición genómica	Molécula implicada		Origen
	Reconocimiento de secuencia	Rotura de DNA de doble hebra	
<b>Nucleasas con dedos de Zinc</b>	<u>Proteína:</u> Proteína de dedos de Zinc (ZFP) ▪ 1 dedo de Zinc (3 Aminoácidos) → 3 bp	<u>Proteína</u> ▪ Nucleasa Fok1	Artificial
<b>TALEN (Nucleasas tipo activador de transcripción)</b>	<u>Proteína:</u> TAL effector ▪ 2 aminoácidos → 1 bp	<u>Proteína</u> ▪ Nucleasa Fok1	Natural
<b>CRISPR-Cas9</b>	<u>RNA</u> ▪ 1 ribonucleótido → 1 bp	<u>Proteína</u> ▪ Cas9	Natural

**Tabla 1** Nucleasas sitio- específicas utilizadas en edición genómica

**Tomado de:** Revolución CRISPR L. The CRISPR Revolution [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran de la Gala Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran%20de%20la%20Gala%20Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (20)

## 4.2. Nucleasas de Dedos De Zinc (ZFN)

Las nucleasas de dedos de Zinc se componen de dos partes: una son los dedos de zinc, los cuales son dominios de naturaleza proteica capaces de reconocer un trinucleótido de una secuencia específica. Estos pueden manipularse de manera modular para dirigir su unión a una secuencia en particular. Por otra parte, está la nucleasa FokI es una nucleasa de *Flavobacterium okeanokoites* que ha sido modificada para generar un corte secuencia- independiente (21). Los dominios de dedos de Zinc, fusionados a la nucleasa FokI trabajan en conjunto para unir secuencias específicas de 18pb (21).

Los dedos de zinc (ZFNs) son enzimas que se unen y cortan secuencias distintas de ADN de doble cadena (dsDNA) Una unidad de ZFN funcional consta de dos proteínas monoméricas individuales que se unen a un medio *in-situ* en el ADN de aproximadamente 15 a 18 nucleótidos. Cuando dos monómeros de ZNF se unen a sus sitios diana adyacentes a los dominios de escisión dimerizan y crean una ruptura en la doble hebra (DSB) en el ADN (18)

La introducción de DSBs mediadas por ZNF en el genoma establece una base para la edición del genoma altamente eficiente. La reparación imperfecta de DSBs en una célula a través de la vía de reparación del ADN no homólogo puede dar lugar a una pequeña inserción y supresión (indeles). La creación de indeles dentro del gen de secuencia de una célula de codificación puede resultar en un bloqueo funcional de marco de lectura y posterior de un locus del gen de alta eficiencia. Mientras que este protocolo describe el uso de ZFNs para crear un bloqueo de genes, la integración de transgenes puede llevarse a cabo a través de la reparación homóloga en el sitio de corte de ZFN (19).

### **4.3. Nucleasas de tipo activadores de la transcripción (TALENS)**

Son proteínas secretadas por la bacteria *Xanthomonas* que infectan plantas. Son introducidas directamente en el citoplasma celular y transportadas al núcleo de la célula vegetal. Al reconocer promotores específicos en el ADN inducen la activación de ciertos genes de la planta que facilitan la infección de la bacteria (21). Se pueden generar secuencias personalizadas de TALENs para reconocer secuencias genómicas únicas. A la secuencia de TALENs personalizada se puede fusionar la nucleasa FokI con el fin de generar el dímero funcional de corte (21).

TALENs implica la síntesis de la C-terminal con el tipo de enzima de restricción II, FokI, para producir los heterodímeros que forman un interruptor de doble trazado (DSB) en el ADN (22,23).

Este método se basa en la utilización de dos nucleasas dirigidos que consiste en un dominio ADN-obligatorio serie- específico combinado con un módulo regular del ADN (22,23).

Estas nucleasas consisten en los módulos de ADN- obligatorios programables y serie-específicos acoplados con un dominio hendido ADN regular que permita cambios genéticos exactos y eficientes estimulando los interruptores apuntados del doble cabo de ADN con el fin de inducir la reparación celular del ADN, incluyendo recombinación no homóloga NHEJ falible y HDR (22,23).

### **4.4. REPETICIONES PALINDRÓMICAS CORTAS AGRUPADAS Y REGULARMENTE INTERESPACIADAS (CRISPR)**

#### **4.4.1. SISTEMA CRISPR-Cas**

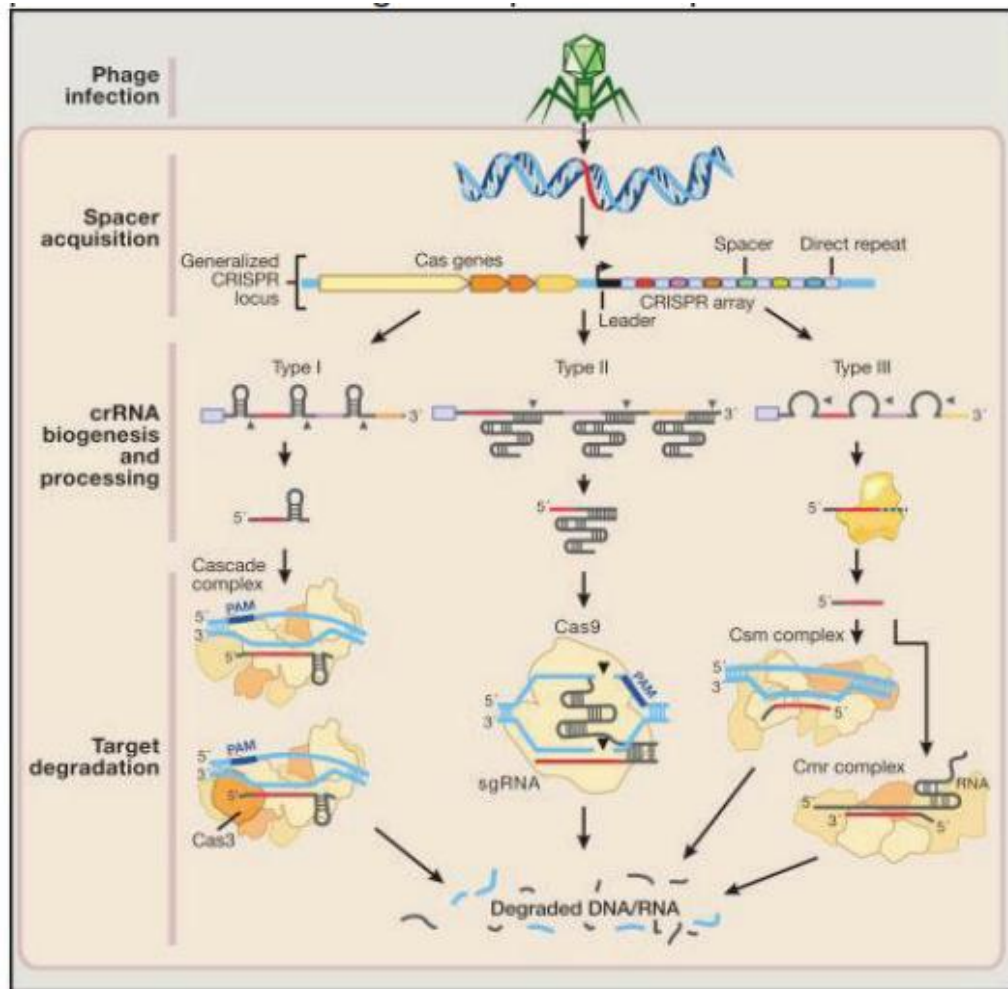
CRISPR-Cas es un sistema de inmunidad adaptativa procariota, presente en la mayor parte de bacterias y casi todas las arqueas. El sistema CRISPR actúa recopilando y almacenando fragmentos de material genético



de bacteriófagos y plásmidos invasores, que transcribe en forma de crRNAs. Son estos crRNAs los que actuarán como guía de las endonucleasas Cas de la célula hospedadora, que en procesos infecciosos posteriores degradan el ácido nucleico diana, siempre que esté presente una secuencia complementaria al crRNA (24).

#### **4.5. Clasificación del sistema CRISPR-Cas**

Existen diversos sistemas CRISPR que en la actualidad se encuentran clasificados en 2 clases, 5 tipos y 16 subtipos, de acuerdo con un criterio basado en la arquitectura de sus componentes y mecanismos de acción. En primer lugar, CRISPR de clase 1 y 2 son quienes llevan a cabo la escisión de los ácidos nucleicos invasores. De manera que, en la clase 1 se encuentran todos aquellos sistemas que requieren de un gran complejo de proteínas efectoras guiadas por ARN para llevar a cabo la escisión de ADN o ARN. Por el contrario, los sistemas de la clase 2 requieren de una única endonucleasa efectora, que guiada por ARN lleve a cabo la neutralización del genoma invasivo como lo es Cas9 y Cas12a. Dentro de estas dos clases se agrupan los siguientes tipos de sistemas CRISPR: Clase 1: tipos I, III y IV y clase: tipos II, V y VI (27)



**Figura 2** Esquematización comparativa de las diferentes etapas de funcionamiento en los distintos tipos de sistemas CRISPR-Cas (tipos I, II y III)  
**Tomado de:** Revolución CRISPR L. The CRISPR Revolution [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran de la Gala Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran%20de%20la%20Gala%20Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (20)

Los tres sistemas CRISPR-Cas (Tipo I, tipo II y tipo III) usan distintos mecanismos moleculares con el fin de lograr el reconocimiento del ácido nucleico y la escisión (Figura 3) (22,23). Todos ellos pueden coexistir en un mismo microorganismo. Los sistemas tipo I y tipo III utilizan el complejo de proteínas Cas para la orientación del crRNA, sin embargo, el sistema de tipo II solo requiere una sola proteína de reconocimiento de ADN ARN guía y la escisión. Esta propiedad resulta ser de gran utilidad para aplicaciones en la ingeniería genómica (25).

El sistema tipo I es reconocido por la presencia de Cas3, una proteína con los dominios helicasa y DNasa que son responsables de la degradación. En la actualidad se han identificado 6 subtipos del sistema clasificados de la A a la F con un número variable de genes Cas. El pre-crRNA es procesado por Cas5 o Cas6. Aparte de Cas1, Cas2 y Cas3, todos los sistemas tipo I requieren de un complejo multi-Cas para su funcionamiento (26).

El sistema tipo II usa un trans-activador (tracrRNA) para la maduración del crRNA el cual es complementario a las repeticiones en el pre-crRNA; en donde la endonucleasa Cas9 juega un papel fundamental en el corte después del guiado al ADN exógeno por el crRNA-tracrRNA y presenta dos subtipos (A y B). (26).

El sistema tipo III se asocia a la proteína Cas10, a su vez utiliza Cas6 para procesar el pre-crRNA. Las proteínas Cas se destinan a los complejos Csm o Cmr siendo estos similares a las proteínas cascada del tipo I (26).

Los sistemas tipo I y III, utilizan endonucleasas Cas especializadas para procesar el pre-crRNA y luego el crRNA maduro se asocia a un complejo multi-Cas, el cual reconoce y genera un corte en el ADN exógeno. Y en los sistemas tipo II la maduración del crRNA se produce por el tracrRNA y solo necesita Cas9 para el corte del ADN objetivo (26).

La inmunidad adaptativa se realiza en tres etapas: 1. Inserción de una secuencia corta del ADN invasor como una secuencia espaciadora en la matriz CRISPR. 2. La transcripción del precursor crRNA (pre-crRNA) que se comete a maduración para obtener crRNAs individuales, cada uno de los cuales está compuesto tanto por repeticiones como de un espaciador del agente invasor, y 3. la escisión del ácido nucleico extraño el crRNA dirigido por proteínas cas en sitios complementario a la secuencia espaciadora crRNA. La secuencia PAM (un protoespaciador adyacente) una pequeña

secuencia adyacente a la secuencia diana crRNA en el ADN invasor juega un papel fundamental en las etapas de adaptación e interferencia en el sistema CRISPR tipo I y tipo II (24).

#### **4.5.1. Proteínas asociadas (Cas)**

Existen cuatro genes asociados a CRISPR (Cas) que se encuentran solo en especies de bacterias y arqueas que contienen secuencias CRISPR, ubicados cerca de un locus de repetición, que generalmente se encuentran orientados de cabeza a cola del material genético de estos microorganismos como si fueran transcritos. El arreglo común de estos genes es *Cas3- Cas4- Cas1- Cas2*. La proteína *Cas3* es una helicasa, mientras que *Cas4* se asemeja a una familia de exonucleasas y contiene un dominio rico en cisteína. (Figura 3) En general *Cas1* es la única proteína que se encuentra en todas las especies que contienen el loci CRISPR, *Cas2* está pendiente por caracterizar (27).

Las familias de proteínas asociadas a CRISPR están involucradas en procesos que pueden incluir el mantenimiento de agrupación repetidas (7), la captura de nuevos elementos espaciadores (24) y expansión o contracción de grupos, propagación de secuencias líder y grupos de repetición dentro de un genoma (7), Transferencia de CRISPR y genes *Cas* juntos a nuevos genomas (9), e interacción de CRISPR/*cas* loci con la célula huésped (27). Las funciones de estas familias de proteínas son en gran parte desconocidas y los estudios posteriores tratan de descifrar las funciones y aplicaciones de estas proteínas.

**Tabla 2** Nucleasas del sistema CRISPR-Cas, su papel en las fases de inmunidad y en qué clase del sistema han sido identificadas.

<b>Proteína</b>	<b>Rol</b>	<b>Tipo</b>
<b>Cas1</b>	Adaptación	I, II, III, V, VI
<b>Cas2</b>	Adaptación	I, II, III, V, VI
<b>Cas3</b>	Adaptación/Interferencia	I
<b>Cas4</b>	Adaptación	I, II, V
<b>Cas5</b>	Expresión	I, III, IV
<b>Cas6</b>	Expresión	I, III, IV
<b>Cas7</b>	Interferencia	I, III, IV
<b>Cas8</b>	Interferencia	I, IV
<b>Cas9</b>	Interferencia / Adquisición	II
<b>Cas10</b>	Interferencia	III
<b>Cas12</b>	Expresión / Interferencia	V
<b>Cas13</b>	Expresión / Interferencia	VI

**Tomado de:** Revolución CRISPR L. The CRISPR Revolution [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran de la Gala Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran%20de%20la%20Gala%20Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (20)

CRISPR-Cas9 es una endonucleasa de ADN con un ARN guía asociado al sistema CRISPR que genera inmunidad para el *Streptococcus pyogenes* donde este microorganismo utiliza Cas9 para memorizar y posteriormente adherirse al ADN invasor, bien sea bacteriófagos o ADN plasmídico. De manera que, si el ADN invasor es complementario a la base de la región del espaciador del ARN guía, este sería un mecanismo de interferencia ante la reincidencia del agente invasor (28).

Tiene un efecto secundario inesperado que la clasifica como la enzima ideal para el diagnóstico de enfermedades simples, rápidas y precisas

Cas12a (antes llamada Cpf1) es una proteína de corte de ADN que fue descubierta en 2015 por Jennifer Doudna y su colega Emmanuelle Charpentier de UC Berkeley, es como la conocida proteína Cas9 convertida en una poderosa herramienta de edición de genes en 2012. Cas12a fue una adición a las herramientas de corte de genes, capaz de cortar ADN bicatenario en lugares en los que Cas9 no puede, es más fácil de usar cuando se inserta un nuevo gen en el corte de ADN (29).

Cas13a Es una proteína con la capacidad de unir y dividir el ARN de manera programática, protegiendo a las bacterias de infecciones por fagos y sirviendo como una plataforma para la manipulación de ARN (30).

#### **4.6. Mecanismo de acción de CRISPR-Cas**

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas CRISPR junto con las endonucleasas Cas son un sistema que inicialmente se consideró como un tipo de defensa bacteriana. Al ingresar un ADN invasor entre secuencias palindrómicas repetidas, generan un ARNcr al transcribirse. Cuando reincide la infección el ARNcr acoplado con una proteína Cas reconoce el patógeno y Cas degrada el ARNm (31).

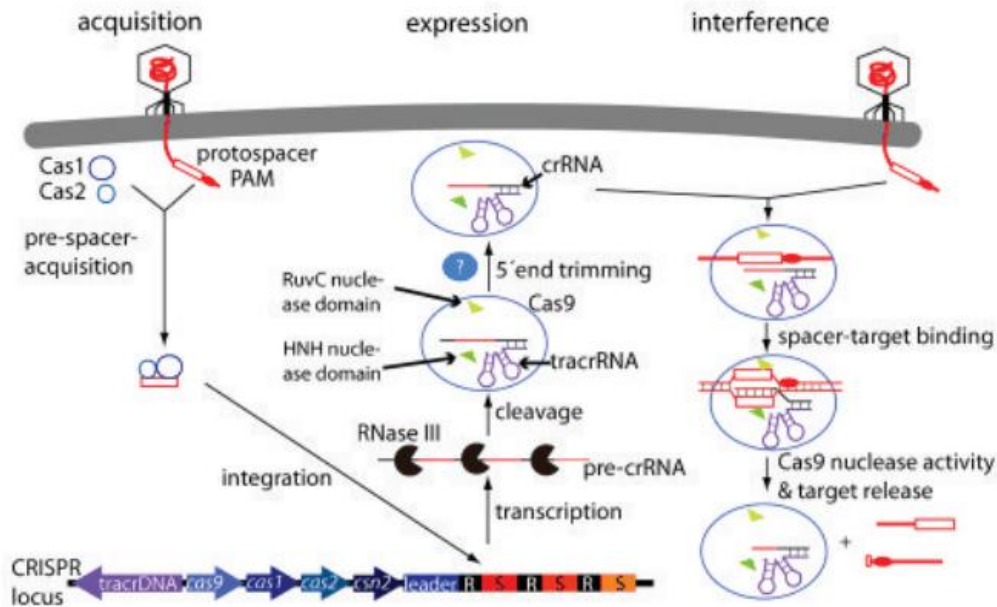
En general, el funcionamiento del sistema CRISPR se puede dividir en tres etapas: *Etapa de adquisición*, *Etapa de expresión* y *etapa de interferencia*. Cada uno de los tipos de sistemas CRISPR presenta particularidades propias, sin embargo, este trabajo se centrará en revisar el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas13a y Cas12a (32).

La *etapa de adquisición* tiene como objetivo la captación e incorporación de fragmentos de ácidos nucleicos ya sea ADN, ARN, plasmídico o vírico, al locus CRISPR de la célula hospedadora. Dentro de CRISPR los protoespaciadores serán insertados y por ende se denominan ahora espaciadores, entre las secuencias repetidas y en posición 5' respecto a la secuencia espaciadora y siempre tras la secuencia líder (32).

A continuación, *en la etapa de expresión*, CRISPR se transcribe dando lugar a un largo transcrito primario denominado pre-crRNA, que contiene al locus tracrRNA y a todos los espaciadores adquiridos en la etapa anterior separados por secuencias repetidas. Este pre-crRNA es procesado mediante la endonucleasa, dando lugar a secuencias de ARN constituidas por una región espaciadora flanqueada por una corta secuencia repetitiva, que servirá como zona de anclaje de la proteína Cas en la etapa posterior, a estas secuencias las denominaremos crRNAs (32).

En la *etapa de interferencia* el genoma de un organismo invasor reincidente intenta infectar nuevamente la célula. En esta etapa, el crRNA maduro se une a la secuencia activadora tracrRNA, formando el híbrido de RNA (tracrRNA: crRNA) el cual es necesario para dirigir a la endonucleasa hacia la secuencia diana del material genético invasor que debe degradar. Mediante el apareamiento de bases del crRNA con la secuencia diana del agente invasor formando un complejo (tracrRNA: crRNA: DNA o RNA) la endonucleasa logra la neutralización del agente invasor mediante la generación de una DSB en la secuencia diana de este (32).

El mecanismo de CRISPR está formado por una molécula de ARN guía que se une específicamente a una secuencia, ya sea de ADN o de ARN y por una Endonucleasa que corta el ácido nucleico indicado por el ARN guía. A medida que realizan investigaciones del sistema han hallado nuevas endonucleasas que forman parte del sistema CRISPR y que tienen distintas características, las cuales podrían ser de gran utilidad como herramientas en el laboratorio. Además de esto, de acuerdo con el genoma bacteriano, existen diferentes tipos de CRISPR, es por esto por lo que las aplicaciones para este sistema son muchas, principalmente en edición de genes, imágenes, diagnóstico y terapéutica (33).



**Figura 3** Componentes y etapas del sistema CRISPR de tipo II en cuanto a la defensa de la célula contra agentes invasores.

**Tomado de:** Kirchner M, Schneider S. CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2015 Nov 9 [cited 2019 Apr 28];54(46):13508–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26382836> (34).

## 4.7. Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas presenta una gran variedad de aplicaciones, a continuación, mencionaremos algunas de ellas

Como se mencionó anteriormente CRISPR-Cas9 tiene aplicaciones para la edición genómica que permiten tratar enfermedades raras de origen genético. Estudios realizados en ratones nos permite acercarnos a lo que sucede en el organismo humano (35). A continuación, se abordarán algunas de las enfermedades en las que se ha usado el sistema CRISPR-Cas9 demostrando su efectividad.

### 4.7.1. Fibrosis quística



En el 2014 Fei Xie y colaboradores, realizaron un estudio en el cual obtuvieron Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de un paciente con betatalasemia. Sobre estas iPSCs se realizaron técnicas de edición genética basadas en Cas9 con reparación del corte mediante HDR. Esto permitió corregir el estado heterocigoto de la mutación de las células del paciente y como resultado la ausencia de consecuencias clínicas (36).

La fibrosis quística es una enfermedad que deteriora considerablemente la calidad de vida del paciente que la padece. Esta patología se asocia a la mutación del gen CFTR regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. Usando Cas9 con un ARN guía (sgRNA) diana frente al gen mutado, posteriormente añaden el gen CFTR nativo del donante para su incorporación por HDR, demostrando así la corrección de la patología con alta especificidad en organoides basados en células madre intestinales (37). En el 2015 desarrollaron un modelo celular iPSC in vitro de un paciente con fibrosis quística homocigoto para la mutación CFTR. Usaron un plásmido que codifica para la proteína Cas9, un sgRNA y un DNA donante para corregir la mutación mediante HDR (38).

#### **4.7.2. Enfermedades neuromusculares**

Las enfermedades neuromusculares son de gran importancia para estudio con terapia génica, especialmente la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Combinaron en un estudio técnicas basadas en TALENs y CRISPR-Cas9 sobre iPSCs derivadas de fibroblastos de un paciente con DMD. Tras realizar tres modificaciones genéticas diferentes y la posterior diferenciación a células musculoesqueléticas, pudieron detectar la correcta expresión de la distrofia (proteína ausente en la DMD) (39). Otros estudios permitieron establecer la expresión de distrofina en células de un paciente

con DMD mediante edición genética multiplexada (varios sgRNAs con diferentes dianas) usando CRISPR-Cas9 (40).

Aun para el 2015 lograron corregir la mutación de JAK2 (causante de la enfermedad por deficiencia) mediante HDR vía CRISPR-Cas9, usando iPSCs de un paciente con inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID) (41).

#### **4.7.3. Retinitis pigmentosa**

En el 2016 realizaron estudios sobre la retinitis pigmentosa en iPSCs derivadas de un paciente con la enfermedad. Mediante Cas9, repararon el gen RPGR (*retinitis pigmentosa FTPase regulator*) usando HDR generando un 13% de células corregidas ya que estudios anteriores solo describen tasas de corrección del 1% (42).

#### **4.7.4. Cáncer**

El cáncer es una enfermedad compleja, raramente relacionada con la afectación de un solo gen. El sistema CRISPR-Cas es de gran utilidad para la generación de modelos de experimentación que permitan el estudio de procesos cancerígenos (43). En el 2014 el grupo de investigación liderado por Xue W. crearon un modelo murino de cáncer de hígado usando CRISPR-Cas9 introducido por inyección hidrodinámica con el fin de mutar los genes supresores de tumores Pten y p53 (43). Tanto en 2015 como en 2017 consiguieron generar modelos de la enfermedad de cáncer de colon humano a través de la aplicación de CRISPR-Cas sobre células madre intestinales cultivadas, permitiendo detectar los genes implicados en dicha patología (44,45). De los modelos oncogénicos más complejos está la obtención de reordenamientos entre cromosomas mediante CRISPR-Cas9 tal y como sucede en pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico (46).

CRISPR permite también modelizar el cáncer, entre las aplicaciones que presenta el sistema CRISPR existe la posibilidad de alterar cinco genes en un mismo ensayo y trabajar en modelos animales *in vivo*. En China se presentó el primer ensayo en el que inyectaron células con genes editados mediante la tecnología CRISPR-Cas9 a un paciente con cáncer de pulmón (35).

#### **4.7.5. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

CRISPR-Cas tiene la capacidad de interrupción o delección de los receptores de los linfocitos T humanos (CXCR4 y CCR5). En 2015 consiguieron alterar el gen CXCR4 logrando que las células fueran resistentes a la infección por VIH (47). Lograron producir células CCR5 $\Delta$ 32 resistentes a VIH a partir de iPSCs utilizando CRISPR-Cas9 Alcanzando la homocigosis en un 33% de las células (48). Obtuvieron la inactivación del gen CCR5 en células CD34+ precursoras hematopoyéticas, que conservaron esta característica en una diferenciación posterior (49).

Para el 2016 en el equipo de Kaminsky lograron erradicar las copias integradas en el genoma de linfocitos T CD4+ humanos, inhibiendo la capacidad de infección primaria por VIH. Mediante el reconocimiento por parte del sistema CRISPR-Cas9 de LTR (Secuencia larga terminal) una secuencia típica de retrovirus, posicionada en la forma próxima al promotor del VIH, integrada en el genoma hospedador (50). Este estudio ha servido de inspiración para realizar experimentos *in vivo* en ratones con el objetivo de erradicar la infección por VIH (51).

A pesar de los debates sobre límites éticos y legales de la modificación en embriones, ya se han realizado dos experimentos entre los años 2015 y 2016 en los que se han modificado embriones humanos que eran incompatibles con la vida por medio de la

tecnología CRISPR-Cas9. En el último de los equipos de investigación de la Universidad Médica de Cantón (en el sur de China) se alteraron cigotos para hacerlos inmunes al VIH. Además, en México nació un bebé con la técnica de los tres padres genéticos con el fin de evitar que heredara de su madre una rara enfermedad mitocondrial (35).

El sistema CRISPR-Cas9 ha sido usado para la corrección de una mutación conocida en el cromosoma X relacionada con la hemofilia tipo B y aunque presenta ciertas complicaciones se plantea realizar más estudios en esta enfermedad (52).

La tecnología CRISPR también se ha aplicado en industrias agrícolas y de alimentos para modificar cultivos probióticos y vacunar cultivos industriales contra los virus. También se utiliza en cultivos agrícolas para mejorar el rendimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía y mejorar las propiedades nutricionales de los productos (53).

#### **4.8. ENFERMEDADES VIRALES DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA**

De las enfermedades virales de importancia en salud pública, tales como VPH, Dengue, Zika y Fiebre amarilla, se resalta la ausencia de pruebas de diagnóstico específicas para la enfermedad lo cual implica que las pruebas para la detección de la patología se hagan cuando el paciente presenta deterioro en los órganos involucrados. Por esta razón es de vital importancia la implementación de pruebas que permitan la detección del virus desde que este ingresa al organismo (54). Para cumplir con este propósito las investigaciones de esa rama se han centrado en estudiar las proteínas asociadas al sistema CRISPR- Cas, teniendo en cuenta que cada una de ellas presenta funciones específicas. Para entender esta

herramienta es importante abordar inicialmente lo concerniente con cada enfermedad.

#### **4.8.1. Enfermedad por el virus del papiloma humano VPH**

El virus del papiloma humano VPH es una infección transmitida por contacto sexual. Actualmente se conocen más de 100 tipos del Virus, de los cuales alrededor de 40 tipos pueden infectar al área genital ya sea la vulva, vagina, cuello uterino, recto, ano, pene y escroto, así como la boca y garganta. Algunos tipos de VPH se evidencian comúnmente por medio de verrugas como verrugas en las manos y plantas de los pies, pero estas no se transmiten por contacto sexual (55).

Las infecciones genitales por VPH son muy comunes y se considera que casi todas las personas sexualmente activas se contagian con el VPH en algún momento de su vida. La mayoría de las personas con VPH no presentan síntomas (55).

La mayor parte de las infecciones por VPH no son agresivas y desaparecen por sí solas, aunque existen algunos tipos de VPH que pueden provocar verrugas genitales o cáncer.

- Los tipos de VPH 6 y 11 causan en su mayoría verrugas genitales, considerados de bajo riesgo ya que no provocan cáncer ni problemas de salud graves (55).
- Aproximadamente 12 tipos de VPH pueden provocar cáncer, los más comunes son los tipos 16 y 18, responsables de la mayoría de los casos y considerados de alto riesgo. El cáncer cervical es el más asociado al VPH, pero también puede causar cáncer de vulva, vagina, pene, ano, boca y garganta. (55).

Aunque en la mayoría de los casos el sistema inmunitario de la persona combate la infección por VPH antes de crear verrugas, cuando estas se presentan puede ser de tipos 4 tipos:

- Verrugas genitales: caracterizadas por ser lesiones planas en forma de coliflor que en mujeres aparecen en su mayoría en la vulva, aunque también pueden presentarse cerca del ano, cuello del útero o en la vagina (55).
- Verrugas comunes: se presentan como bultos duros y elevados, con presencia en manos, dedos o codos, que, aunque son antiestéticas, también pueden ser dolorosas o con tendencia a producir lesiones o sangrado (55).
- Verrugas plantares: son bultos duros y granuloso que aparecen generalmente en talones o en la parte delantera de los pies (55).
- Verrugas planas: son lesiones poco elevadas, planas y más oscuras que el tono de la piel. Pueden aparecer en cualquier lugar, aunque en niños aparece más comúnmente en el rostro, en los hombres en la barba y en las mujeres en las piernas (55).

#### **4.8.2. Cáncer cervical**

Se presenta en su mayoría en personas no vacunadas, como infecciones que inicialmente pasan desapercibidas pues en las fases tempranas del cáncer cervical no hay desarrollo de signos ni síntomas.

Cuando hay infecciones repetitivas de ciertas cepas del virus puede producir lesiones precancerosas, que si no son tratadas pueden volverse cancerosas (55,56).

El diagnóstico de infección por VPH se realiza por medio de la observación de las verrugas, que al no ser visibles requiere de los siguientes exámenes:

- prueba con solución de ácido acético; que al ser aplicado en el área genital de pacientes infectada por VPH se tornan blancas, lo cual ayuda a identificar lesiones planas (55,56).

- Papanicolaou: a partir de una muestra de células del cuello uterino o de la vagina, que revela anomalías en las células que revisten la parte inferior del útero (55,56).
- Prueba de ADN: donde se identifica el material genético de los tipos de VPH de alto riesgo vinculados con los tipos de cáncer genital (55,56).

Actualmente se recomienda a las mujeres entre 21 y 29 años a que se realicen la prueba de Papanicolaou cada 3 años, así como a mujeres entre 30 y 65 años también cada tres años o cada cinco años si se hacen un análisis de ADN del VPH al mismo tiempo. Para mujeres mayores a 65 años pueden dejar de hacerse el análisis si han tenido tres Papanicolaou normales seguidos o dos análisis de ADN del VPH y Papanicolaou sin resultados anormales (50).

#### **4.8.3. Enfermedad por el virus de Zika**

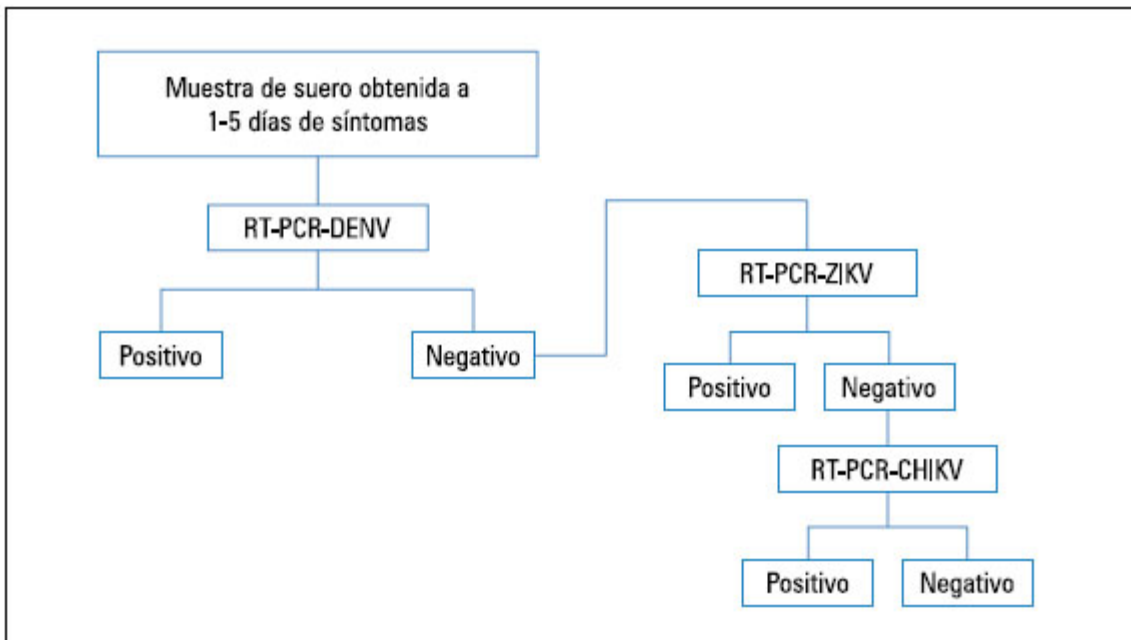
El virus de Zika es un Flavivirus transmitido por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes* en especial *Aedes aegypti* en regiones tropicales, siendo los mismos vectores que transmite el Dengue, la fiebre Chikungunya y la fiebre amarilla. Tras la exposición presenta un periodo de incubación de 3 a 14 días para la aparición de síntomas, las personas infectadas en su mayoría son asintomáticas, los síntomas generalmente tienen una duración entre 2 a 7 días que consisten en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefalea (57).

Las complicaciones de la enfermedad se pueden evidenciar; en mujeres embarazadas donde causa microcefalia y malformaciones congénitas, a su vez se asocia con complicaciones del embarazo como parto prematuro, aborto espontáneo y la muerte intrauterina, así como también puede transmitirse de la madre al feto, por contacto sexual, transfusión de hemocomponentes y trasplante de órganos (57).

También puede desencadenar el síndrome Guillain- Barré, neuropatía y mielitis, con predominancia en adultos y adolescentes.

La infección se sospecha a partir de los síntomas de la persona que reside o ha viajado a zonas endémicas. Sin embargo, el diagnóstico se hace con pruebas especiales en el laboratorio (57).

El diagnóstico de Zika cuenta con métodos directos para determinar el ARN viral como es la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o RT-PCR, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) y el aislamiento viral. Además, se puede realizar la determinación serológica de anticuerpo IgM e IgG mediante ELISA y Neutralización en placas. Sin embargo, la limitada disponibilidad de pruebas de diagnóstico de ZIKA presenta desventajas como la reacción cruzada con otros flavivirus tipo Dengue, virus del Nilo Occidental y Fiebre Amarilla, e incluso vacunación con otro flavivirus causa a menudo falsos positivos (58,59).



**Figura 4** Protocolo para el diagnóstico diferencial de Zika, Dengue y Chikungunya  
**Tomado de:** Cabezas C, García P. Diagnóstico de la infección por el virus zika. An la Fac Med [Internet]. 2017 May 16 [cited 2019 Apr 27];78(1):89. Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/13028> (60).



#### **4.8.4. Enfermedad por el virus del dengue**

Es una infección viral aguda causada por un arbovirus de la familia Flaviviridae y transmitida por la picadura de hembras de mosquitos del género *Aedes* principalmente *Aedes aegypti* (61).

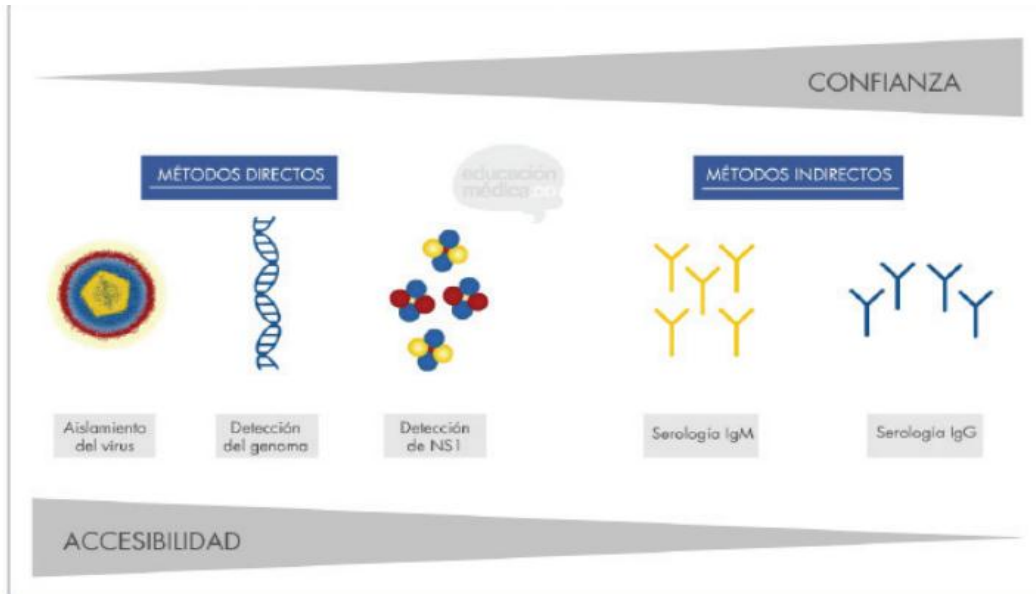
El virus posee cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), los cuales no desencadenan inmunidad cruzada, lo que significa que una persona puede infectarse y presentar hasta 4 veces la enfermedad (61).

El periodo de incubación gira alrededor de 7 días, para que haya lugar a una infección debe presentarse de forma simultánea, el virus, el vector y el huésped susceptible (61).

EL virus se multiplica en los ganglios linfáticos y luego se disemina a otros tejidos y órganos a través del sistema linfático y de la sangre (61).

Los primeros síntomas del dengue clásico son fiebre y cefalea asociado a mialgias, artralgias, astenia y adinamia. En etapa crítica hay alto riesgo de muerte si no se trata a tiempo, en otros casos los pacientes presentan forma atípicas y graves como son lesiones dirigidas a órganos como encéfalo, miocardio, riñón o hígado (61).

El diagnóstico definitivo de infección por Dengue depende del aislamiento viral, de la detección del antígeno viral o el RNA viral en el suero o tejido, o detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente. Una muestra sanguínea en la fase aguda debe tomarse, tan pronto sea posible, luego del inicio de la enfermedad febril. Una muestra sanguínea, idealmente debe ser tomada de 2 a 3 semanas después (62) (figura 6).



**Figura 5** Métodos diagnósticos de dengue  
**Tomado de:** Isaza S. Maldonado J. Boshell Samper J. Ministerio de Salud y Protección Social Memorias Dengue [Internet] (61).



**Figura 6** Prueba ELISA basada en la detección de antígenos virales  
**Tomado de:** -Colombia D. Ministerio de Salud y Protección Social-Federación Médica Colombiana [Internet]. 2012 [cited 2019 Apr 27]. Available from:

#### **4.8.5. Enfermedad por el virus de la fiebre amarilla**

La fiebre amarilla es una enfermedad viral causada por la picadura de mosquitos hematófagos, infectados previamente por el virus, es un Arbovirus perteneciente a la familia Flaviviridae (63).

El periodo de infección aparece de 3 a 5 días después de la picadura del mosquito, donde el paciente presenta fiebre, cefalea, náuseas, mareos, malestar general y dolor muscular, congestión facial y bradicardia, según los laboratorios el paciente presenta leucopenia con neutropenia relativa, aumento de transaminasas y albuminuria (63).

En el periodo de remisión, los síntomas ceden y el estado general de paciente mejora. el virus en esta etapa desaparece, este periodo puede durar de 2 a 48 horas (63).

Gran parte de los pacientes se recuperan en esta etapa, iniciándose la etapa de recuperación que dura entre 2 a 4 semanas, sin embargo, entre el 15 y el 25% de los casos, los síntomas reaparecen en forma más grave, el periodo de intoxicación, en el que predominan síntomas de insuficiencia hepática y renal con necrosis hepática, colestasis y presencia de albuminuria. En este periodo el paciente presenta ictericia, dolor epigástrico, manifestaciones hemorrágicas, alteraciones hepáticas y renales. En los casos fatales, puede presentar miocarditis y encefalitis (63).

El periodo de transmisibilidad; la sangre de los enfermos es infectante para los mosquitos desde 24 hasta 48 horas antes de aparecer la fiebre y durante los primeros tres a cinco días del cuadro (63).

Actualmente los exámenes de laboratorio que complementan el diagnóstico de fiebre amarilla son:

- Hemograma con plaquetas
- Hepatograma GOT, GPT, Bilirrubinas
- Función renal creatinina y urea (63).

La confirmación del diagnóstico de fiebre amarilla se hace por alguna de las siguientes técnicas:

Si la muestra es tomada antes de los 5 días de que el paciente presente síntomas; se hace aislamiento del virus de la fiebre amarilla, detección de secuencias genómicas virales. Si la muestra es tomada más de 5 días después de que el paciente presente síntomas; aumento de los títulos de anticuerpos IgG del virus de la fiebre amarilla 4 veces en muestras de suero obtenidas en fase aguda en pacientes sin historia reciente de vacunación y descartó de reacciones cruzadas con otros Flavivirus. Post mortem; se realiza detección del antígeno específico en tejidos por inmunohistoquímica (63).

Actualmente las técnicas usadas para el diagnóstico de enfermedades virales son procedimientos costosos, requieren de equipos especializados que no todos los centros de salud cuentan con ellos, así como presentan demoras para revelar un resultado, con baja especificidad y/o que requiere de un periodo de incubación del virus prolongado para ser detectadas o se hacen con pruebas adyacentes que determinan los daños sistémicos del patógeno en el organismo del individuo, lo que implica que el microorganismo haya ingresado al organismo con el tiempo suficiente para causar daño. Las consecuencias de un diagnóstico inoportuno podrían terminar en complicaciones dejan a su paso secuelas importantes, dañando la calidad de vida de las personas y aún más importante aquellas enfermedades que pueden terminar en la muerte del paciente (64).

Desde el 2012 se adelantan investigaciones sobre nuevas técnicas para el diagnóstico de enfermedades virales, en corto tiempo, a bajo costo, con alta especificidad y sensibilidad, y que sean de fácil accesibilidad. Es allí donde juega un papel importante una herramienta descubierta desde

1987 CRISPR que en conjunto con las proteínas Cas12a y Cas13 permitiría el diagnóstico de enfermedades virales (65).

CRISPR en general es una herramienta que promete mejorar la calidad de vida de los seres vivos, revirtiendo problemas genéticos, mejorando el sistema de respuesta de las células contra invasiones por otros microorganismos (35), entre muchas otras aplicaciones. El presente artículo tiene como finalidad recopilar información sobre las investigaciones realizadas hasta el momento sobre la utilidad del sistema, que lleven a la comunidad científica a determinar nuevas tecnologías para el diagnóstico de enfermedades.

Es decir, lo que se pretende es dar a conocer hasta dónde han llegado las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre el sistema CRISPR en cuanto a su uso como herramienta diagnóstica, así como, lo prometedor que puede ser esta herramienta para la vida y los aportes que puede llegar a hacer para la rama de la salud, no solo humana sino también animal y vegetal.

#### **4.9. PRUEBAS EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES EN COLOMBIA**

Para abordar el sistema CRISPR-Cas y sus aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades virales es importante conocer cuáles son las técnicas empleadas actualmente en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades virales en Colombia.

##### **4.9.1. Cultivo celular**

Es un método para el aislamiento viral utilizando líneas celulares, las cuales varían según el tipo de virus. Para evidenciar el crecimiento del virus se ve por medio del efecto citopático (CPE) que causa alteraciones celulares. La identificación del virus se realiza por tinción de

inmunofluorescencia (para detectar y localizar antígenos células mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos) (1).

**Desventajas:**

- No es recomendado el cultivo de células para virus no susceptibles al crecimiento de líneas celulares o que producen efecto citopático.
- Muestras de bajo volumen no permiten la inoculación de muchos tipos celulares
- Un cultivo celular requiere de semanas para lograr aislar un virus
- Requiere de una infraestructura adecuada y de personal especializado en la interpretación del efecto citopático en las células (1).

Usar técnicas de cultivo rápido tiene beneficios limitados, debido a que no se dirige a una amplia gama de virus y presenta una baja sensibilidad.

**4.9.2. Amplificación de Ácidos Nucleicos NAATS**

Pruebas de identificación de secuencias ácido nucleico-específicas del organismo de interés, que no solo detecta microorganismo en sangre, sino también en muestras vaginales, endocervicales, uretrales, tanto en hombres como en mujeres (1).

Estas pruebas presentan la habilidad de producir una señal positiva con una sola copia de ADN o ARN (1). Los métodos usados para desarrollar esta prueba son:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); qRT-PCR
- Amplificación de desplazamiento en cadena (SDA)

Como ventajas, presenta más de 90% de sensibilidad y más de un 98% de especificidad. Permite la utilización de especímenes no invasivos, como orina. Diagnóstico confiable tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos (66). Sin embargo, son pruebas de alto costo, con un alto

requerimiento en controles de calidad, facilidad de contaminación (reacciones falsas positivas) y problemas relacionados con la secuencia debido a que esta podría variar entre cepas (1).

#### **4.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada en 1983 por el Dr. Kary Mullis, consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico, para llevar a cabo este proceso es necesario conocer la secuencia del fragmento a amplificar ya sea un gen, parte de un gen, una región no codificada, entre otros, para posteriormente ser visualizados y utilizados en otras aplicaciones (67).

En un tubo de ensayo se dispone una muestra de ADN de la especie a estudiar. A continuación, se añaden oligonucleótidos que actuarán como cebadores para la ADN polimerasa, estos oligonucleótidos (cebadores o primers) delimitan la región a amplificar, específicamente estos deben ser complementarios a cada uno de los extremos 3' de la región a amplificar (67).

Adicionalmente es necesario añadir 4 tipos de dNTPs que componen el ADN (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), se añade la ADN polimerasa la cual debe ser capaz de resistir elevadas temperaturas para llevar a cabo la reacción, comúnmente la Taq-polimerasa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (67).

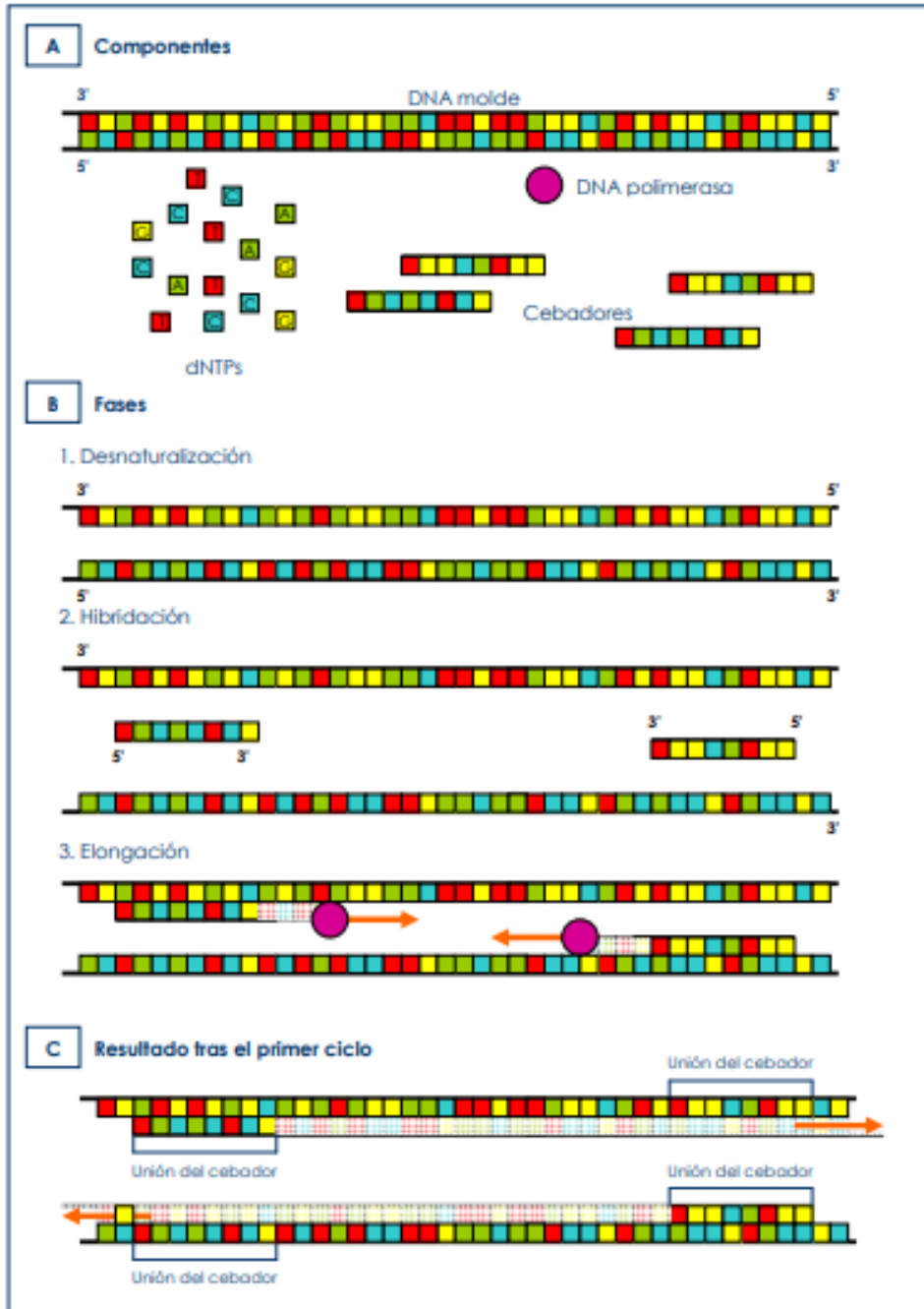
Una vez reunidos todos los componentes es necesario la desnaturalización de ADN. A continuación, permitir el alineamiento de los primers y por último facilitar que la Taq-polimerasa lleve a cabo la síntesis de ADN utilizando como cebadores los extremos 3' de los primers utilizados (67).

- **Desnaturalización:** es necesario elevar la temperatura hasta 94°C durante aproximadamente 1 minuto.

- **Alineamiento:** se desciende la temperatura hasta una temperatura que puede oscilar entre 40°C y 60°C durante aproximadamente 30 segundos y 2 minutos.
- **Extensión:** se aumenta nuevamente la temperatura hasta los 72°C y se deja actuar la Taq-polimerasa durante 1 o 2 minutos.

Estos tres pasos constituyen un ciclo, que debe repetirse unas 40 veces aproximadamente para obtener millones de copias del fragmento de interés. Este proceso se realiza de forma automatizada, aunque también puede hacerse de forma manual. Requiere el uso de un termociclador para realizar los 40 ciclos de amplificación (67).





**Figura 7** Representación esquemática de: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR B. Fases de la PCR C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (La cadena recién formada se representa de color más claro)

**Tomado de:** Pérez A. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) Universidad Politécnica de Valencia (62)

#### **4.9.4. RT-PCR**

PCR en tiempo real permite la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. El término cuantitativo hace referencia a la posibilidad de cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Sus variantes, qPCR utiliza ADN genómico. RT-qPCR es cuánto se obtiene primero el ADNc y luego se hace la PCR (68).

Una de sus principales ventajas, consiste en la detección en tiempo real y cuantificación de la secuencia blanco, además de ser un método que garantiza alta sensibilidad, especificidad y eficiencia para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos (1).

#### **4.9.5. Secuenciación de Segunda generación NGS**

Realiza la secuenciación simultanea de múltiples genes asociados con una enfermedad o fenotipo en partículas, así como de secuencias cortas de aproximadamente 100 pb, produciendo millones de lecturas al mismo tiempo. Una vez ensambladas dichas secuencias a un genoma de referencia se pueden secuenciar, en lugar de un gen, múltiples genes o incluso un genoma completo (69).

Las plataformas de secuenciación NGS ( ejemplo: nanoesferas unidas a una superficie de cristal, o a una placa de vidrio) tienen en común que la detección del ácido nucleico no es aplicable en una solo molécula, lo que indica que requiere de una previa amplificación del fragmento a secuenciar (por medio de una PCR) para poder obtener lecturas secuenciadas del mismo (1).

#### 4.9.7. Inmunoensayos

Son pruebas que usa inmunocomplejos cuando un anticuerpo se une a un antígeno como medio para generar un resultado perceptible. Utiliza un anticuerpo específico o en su defecto varios anticuerpos para detectar analitos de interés (70).

La prueba ELISA o ensayo inmunoenzimático es un método analítico que depende de la reacción Ag-Ac. Determina la concentración de Ag o Ac, mediante el uso de uno de ellos inmovilizado en fase sólida y el otro en solución, puede ser cualitativo o cuantitativo. Dependiendo del diseño se pueden usar Ags, haptenos o Acs marcados con una enzima para revelar Ags, Acs, hormonas o fármacos, presentes en fluidos corporales. El producto de la reacción puede ser detectado y amplificado mediante el uso de un marcador enzimático con un sustrato apropiado. Es un procedimiento de gran sensibilidad y especificidad, sencillo, bajo costo, reproducible y adaptable, requiere poca cantidad de muestra. Una de las desventajas más importantes es que para adaptar la prueba a analizadores automáticos se necesitan reactivos puros, lo que aumenta notablemente el costo de la prueba (71).

#### 4.9.8. Inmunofluorescencia

Es una técnica que se utiliza para la detección de estructuras subcelulares que nos permiten estudiarlas con el uso de anticuerpos acoplados a fluoróforos (72).

Es un conjunto de técnicas en donde se emplean anticuerpos con el fin de detectar y localizar antígenos específicos en células y/o tejidos, algunos de sus pasos son:

- **Fijación:** preserva la localización, composición y estructura del material biológico a analizar. Puede hacerse con glutaraldehído, paraformaldehído y/o metanol/acetona.

- **Permeabilización:** produce poros en las membranas celulares, lo que permite el ingreso de anticuerpos a la célula si el objetivo es la detección de estructuras internas de la célula.
- **Bloqueo:** impide interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico a analizar, generalmente se usa Albúmina bovina sérica o gelatina de pescado. El anticuerpo primario debe competir con la proteína bloqueante para así poder unirse al epítopo y poder detectar la estructura.
- **Inmunodetección:** los anticuerpos son proteínas con la capacidad de reconocer específicamente y unirse con alta afinidad a moléculas tales como antígenos (67).

PRUEBA	TIPO DE ENSAYO	QUE ENCUENTRA	TIEMPO DE REALIZACIÓN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>AISLAMIE NTO VIRAL</b>	<i>CULTIVO CELULAR</i>	EL VIRUS	48 DIAS O SEMANAS	BUENA, RELATIVA A LA MUESTRA	EXCELENTE	AMPLIO RANGO DE DETECCIÓN MAYOR SENSIBILIDAD QUE LAS PRUEBAS RAPIDAS INFORMA SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DETECTADO (73)	REQUIERE MAYOR TIEMPO, NECESITA CULTIVOS CELULARES, ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL O PERSONAL EXPERTO E INFRAESTRUCTURA COSTOSA (73)
<b>DETECCIO N DE ANTIGENO S</b>	<i>INMUNOENSAY OS</i>	FORMACIÓN DE ANTIGENO- ANTICUERPO MEDIANTE RECONOCIMIENT O Y UNION (1)	20 MINUTOS APROXIMANDAM ENTE	100%(74)	99.7%- 100%	ALTA VELOCIDAD Y RENDIMIENTO, METODO AUTOMATIZADO	DEBE CONFIAR EN LA GARANTIA DEL CONTROL DE CALIDAD ALTO RIESGO DE INTERFERENCIAS ALTO COSTO (73)
	<i>INMUNOFLUOR ESENCIA</i>	ANTIGENOS O ANTICUERPOS	2 a 6 HORAS	70% -80%(75)	EXCELENTE	RESULTADO RAPIDO	MENOS SENSIBLE QUE EL CULTIVO NECESITA EQUIPO ROBUSTO PERSONAL EXPERTO LIMITADO A TIPO VIRAL PUEDE PRESENTAR FALSOS POSITIVOS POR FACTOR REUMATOIDEO (73)

<b>DETECCION DEL GENOMA VIRAL1</b>	<i>PCR</i>	ADN-ARN VIRAL (1)	48 HORAS	>99.5	>99.5(74)	DETECTA VIRUS NO VIABLE DETECTA INFECCIONES MULTIPLES PUEDE INACTIVARSE EL PATOGENO PUEDE DETECTAR NUEVOS PATOGENOS (73)	REQUIERE EQUIPO VIGOROSO, PERSONAL ENTRENADO COSTO ELEVADO NO INFORMA LA INFECTIVIDAD NECESITA CONDICIONES ESTRICTAS DE ASTRINGENCIA. ALTO COSTO (73)
	<i>NAATS</i>	AMPLIFICACION Y DETECCION DE SECUENCIAL DEL GENOMA VIRAL (ADN O ARN) (1)	> 90 MINUTOS	90%- 100%	98% - 100%	GENOTIPODO, DETERMINACION DE LA CARGA VIRAL, NUEVOS FORMATOS COMPACTOS Y PORTATILES (73)	TIEMPO DE EJECUCION MAS LARGO REQUIERE CEBADORES ESPECIFICOS PARA LOS OBJETIVOS (73)
	<i>NGS</i>	POLIMERIZACION DE LA PLANTILLA DE ADN MEDIANTE LA INCORPORACION DE dNTP ETIQUETADOS Y FINALIZAR LA EXTENSION (1)	VARIABLE	EXCELENTE	EXCELENTE	IDENTIFICACION DE NUEVAS SECUENCIAS GENOMICAS, GENOTIPADO, DETECCION PRECISA DE MUTACIONES Y MUTACIONES RESISTENTES A FARMACOS (73)	ALTO COSTO, NECESITA HABILIDADES BIOINFORMATICAS PARA EL ANALISIS DE DATOS RETRASO EN EL USO PARA DIAGNOSTICOS CLINICOS DE RUTINA (73)

**Tabla n3:** Pruebas de diagnóstico viral  
**Tomado de:** Autor

## **5. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES**

La identificación rápida y precisa de enfermedades infecciosas permite optimizar la atención en salud y guiar el control de infecciones, así como las intervenciones en salud pública con el fin de limitar la propagación de enfermedades tanto en servicios de salud altamente especializados como en lugares remotos donde hay atención en salud básica. Una prueba de diagnóstico ideal es aquella que es económica, precisa y proporciona resultados en corto tiempo, donde se puede permitir su uso para diferentes tipos de muestras, sin necesidad de equipos especializados, lo que permite detectar y realizar el aislamiento oportuno de los casos, limitando la propagación de la enfermedad y facilitando la atención oportuna (54).

Un diagnóstico médico depende en muchas ocasiones de análisis clínicos de calidad, de manera que los resultados sean precisos y confiables, dando claridad al especialista sobre la enfermedad presente y del tratamiento indicado para el paciente (54).

Teniendo en cuenta los avances en ciencia y tecnología es posible lograr un diagnóstico certero en las primeras etapas de la enfermedad, disminuyendo de manera considerable las tasas de mortalidad (54).

Las pruebas de laboratorio no solo ayudan a detectar cuadros clínicos sino también a controlar enfermedades y a evaluar la efectividad del tratamiento. Tanto los médicos como los pacientes deben obtener pruebas que garanticen a ambos seguridad, debido al índice de falsos positivos y falsos negativos que retrasaría un tratamiento oportuno para un paciente o por el contrario se formularán tratamientos innecesarios (2).

Según expertos en el campo de la ciencia y la salud los exámenes de laboratorio se recomiendan tanto para personas que padecen alguna enfermedad como para personas aparentemente sanas, estos deben ser realizados por los menos una vez al año y periódicamente después de los 30 años (2).

Tanto los laboratorios como los hospitales deben contar con equipos de calidad que brinden beneficios tanto a los pacientes como a los médicos, laboratoristas y hospitales (54).

Los pacientes deben recibir un diagnóstico acertado y oportuno. Gracias a la eficiencia de los equipos que actualmente requieren de una mínima cantidad de muestra para realizar las pruebas, lo que resulta menos traumático especialmente para niños pequeños, recién nacidos, adultos mayores (2).

El conjunto de varias pruebas puede emitir en poco tiempo un diagnóstico confiable que permite tratar certeramente a los pacientes. De manera que los laboratorios realizan mejoras constantes en sus equipos para que estos realicen un amplio menú de pruebas (54).

Cuando un laboratorio cuenta con tecnología de punta, los hospitales aumentan su productividad, hay menos incidencia en la repetición de análisis, porque son pruebas más confiables y en caso de requerir repetir la prueba, se puede hacer con la misma muestra (2).

Los avances de la biología CRISPR-Cas está revolucionando en el campo del diagnóstico molecular para enfermedades infecciosas a través de la detección del virus de Zika, virus Dengue y VPH en muestras humanas (76).

Diversas estrategias basadas en edición génica usando el sistema CRISPR-Cas se han enfocado en la prevención de enfermedades infecciosas de alta prevalencia y morbilidad, mediante inactivación de genes del agente infeccioso o de la célula huésped (76).

En la actualidad se avanza investigaciones sobre diferentes tecnologías para el diagnóstico de enfermedades y el sistema CRISPR ofrece aportes prometedores para la salud a nivel mundial. Dos laboratorios líderes mundiales en ediciones genéticas como lo son Broad Institute y Howard Hughes Medical Institute han presentado dos plataformas para detección de enfermedades basadas en CRISPR, denominadas DETECTR y SHERLOCK usando proteínas como Cas12a y Cas13 respectivamente que cortan ADN y/o ARN de forma diferente a como lo hace Cas9 (29,65,77).



Algunas de las enfermedades en las que se espera evolucionar con herramientas de diagnóstico son VPH, Zika, Dengue, y Fiebre Amarilla. El potencial de diferentes versiones de CRISPR-Cas permite una nueva generación de pruebas diagnósticas que pueden estar disponibles y ser más rentables que las tecnologías actuales, sobre todo en países en vía de desarrollo.

## **6. CRISPR-Cas UNA HERRAMIENTA CON POTENCIAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES**

El desarrollo exitoso de las herramientas CRISPR se basa en la comprensión de las funciones de las proteínas asociadas (Cas) con potencial para ser usadas en edición génica. En partir del 2012 descubrieron los científicos e investigadores Feng Zhang, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier que las proteínas Cas12a (anteriormente Cpf1) y Cas13a (anteriormente C2c2) tienen la capacidad de reconocer fragmentos de ADN y/o ARN respectivamente y cortar un fragmento específico del ácido nucleico y que acompañado de una molécula señalizadora podría ser útil para el diagnóstico de enfermedades virales (29,65,77).

## 7. SHERLOCK

*SHERLOCK (Desbloqueo específico de reportadores enzimáticos de alta sensibilidad)* dirigido por investigadores del Broad Institute of MIT, laboratorio de Harvard y el Massachusetts Institute of Technology, este sistema tiene un potencial tan alto que haría aportes que transformarían la investigación y la salud pública a nivel mundial (77)

SHERLOCK es una plataforma para detectar moléculas de ácidos nucleicos, utiliza la misma filosofía tradicional del sistema CRISPR formado por una enzima nucleasa guiada por una molécula de ARN hacia su secuencia diana de ácidos nucleicos, SHERLOCK usa la nucleasa Cas13a, que tiene como característica que al activarse muestra actividad RNasa y fragmenta ARN (69).

El SHERLOCK original funciona en presencia de la molécula de ARN a detectar, el ARN guía interacciona con la misma y activa Cas13a, es allí donde la actividad RNasa de Cas13a hace que la nucleasa fragmente moléculas de ARN que liberan señales que pueden ser detectadas (69).

En el proceso de mejorar el sistema SHERLOCK los investigadores han creado un test en forma de tira de papel, que después de sumergirse en una muestra indica con una línea si el objetivo (ejemplo; el material genético del virus) se detectó o no, como un tipo de prueba rápida, teniendo en cuenta que esta herramienta no requiere de ningún equipo especial, sirve como prueba diagnóstica no sólo en lugares de bajos recursos sino también en caso de un desastre o si hubiese un falla en la electricidad, aun así se puede realizar la prueba, y lo mejor; estas tiras de papel solo cuestan un par de dólares (69).

El Sistema SHERLOCK es un método de diagnóstico sensible, fácil de usar y a bajo costo que permite detectar material de ácido nucleico como lo podría ser un virus, ADN tumoral, entre otros objetivos o dianas, que serían un gran avance para un diagnóstico acertado y una herramienta aplicada al mundo real (69).

En su proceso de demostrar la utilidad de este sistema y sus aplicaciones, el equipo de investigación del laboratorio de Harvard liderado por investigadores

del Broad usa SHERLOCK para detectar ADN tumoral libre de células en muestras de sangre en pacientes con cáncer de pulmón y para detectar el virus sintético Zika y Dengue simultáneamente (65). Adicionalmente, tendría también aplicaciones sanitarias, incluyendo el diagnóstico de infecciones y detección de mutaciones que confieren resistencia a fármacos o cáncer, también para aplicaciones industriales y agrícolas monitoreando las cadenas de suministro y así reducir el desperdicio y poder mejorar la seguridad. (65)

El éxito del sistema SHERLOCK se basa en la proteína Cas13a asociada a CRISPR la cual puede programarse de manera que esta se una a una fracción específica de ARN, donde esta fracción puede ser cualquier secuencia genética, incluidos genomas virales, genes que confieren resistencia a antibióticos en bacterias o mutaciones que desembocan en cáncer, al localizar su objetivo Cas13a lo corta y posterior a esta acción corta indiscriminadamente ARN cercanos, esta acción no esperada es la usada para crear SHERLOCK diseñando un sistema que pueda ser compatible tanto con ADN como con ARN (30,77).

El funcionamiento básicamente se enfoca en hebras adicionales de ARN sintético con el fin de crear una señal, Cas13a cortan este ARN después de cortar su objetivo original, este corte libera la molécula de señalización lo cual indica la presencia o ausencia del objetivo (30,77).

Estos avances en la investigación del sistema SHERLOCK demuestran la capacidad para detectar de forma rápida y precisa las formas genéticas, ADN tumoral en muestras, teniendo en cuenta que inicialmente sólo podía detectar una secuencia de ácido nucleico a la vez, pero ahora puede llegar a detectar hasta cuatro objetivos diferentes, gracias a un análisis que proporciona señales fluorescentes, lo que implicaría menos cantidad de muestra para pasar a través de los paneles de diagnóstico, como ejemplo se puede decir que la nueva versión de SHERLOCK puede determinar en una sola reacción si una muestra contiene el virus del Zika o partículas del virus de Dengue, que causan sintomatología similar en los pacientes, para este objetivo esta plataforma usa las enzimas Cas13 y Cas12a de diferentes especies de bacterias para generar señales adicionales (30,77).

Con el sistema SHERLOCK original es posible detectar una sola molécula en un microlitro, pero al usar también una enzima adicional asociada a CRISPR que amplifica la señal de detección, se hará una herramienta más sensible que su predecesora, lo que da como resultado que ahora podemos alcanzar una sensibilidad 100 veces mayor (33), al juntar diferentes tipos de enzimas CRISPR, se desencadena el ataque a diferentes fracciones de ADN y ARN haciendo este sistema una herramienta más sensible, estas nuevas características ayudan a SHERLOCK a ser un sistema más preciso. Para lograr el aumento de la sensibilidad de la prueba es necesario hacer unas implicaciones y transformaciones de ADN a ARN con la enzima T7 RNA polimerasa que actúa a 37°C, dando lugar a la posibilidad de no usar equipos si no que se pueda realizar simplemente calentando el tubo con las manos y así lograr la detección de una molécula de ARN entre un trillón de moléculas de ARN (33).

Uno de los aspectos más importantes de la plataforma SHERLOCK es que los reactivos necesarios para la detección pueden ser congelados y descongelados y se pueden integrar a las tiras de papel reactivo, y aunque aún no es preciso se cree que el costo del análisis de cada muestra está entre aproximadamente 61 centavos de dólar, sin adicionar al costo el detector de fluorescencia (33)

“Las mejoras de SHERLOCK brinda más información diagnóstica y nos acerca a una herramienta que puede ser utilizada para aplicaciones reales” Feng Zhang (77)

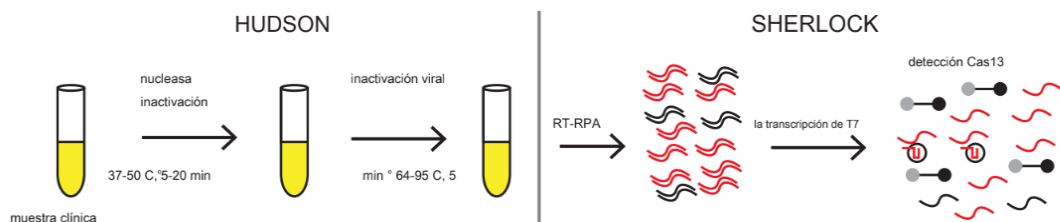
Debido a que en los centros de salud y en especial en aquellos ubicados en zonas rurales no cuentan con personal capacitado ni los recursos necesarios para realizar la amplificación del ácido nucleico procesos que dificultan la realización de la prueba en el campo. Se ha desarrollado HUDSON un método que junto con SHERLOCK permite detectar el ácido nucleico de interés directamente en la muestra del paciente (65).

## 7.1. Estudios realizados aplicando la herramienta de diagnóstico SHERLOCKv2

Para que la herramienta SHERLOCK sobresalga en la detección viral, debe ser empleada con métodos que permiten la detección directa en muestra de pacientes con una lectura visual.

Para probar el rendimiento de SHERLOCK en la detección del virus de Zika (ZIKV) y Dengue (DENV) en muestras de pacientes Feng Zhang y colaboradores desarrollaron HUDSON (calefacción sin extraer muestras de diagnóstico para obliterar nucleasas), un método que lisa las partículas virales e inactiva los altos niveles de ribonucleasas que se encuentran en los fluidos corporales con el uso de calor y reducción química, para permitir la detección rápida, sensible de ZIKV y DENV directamente de los fluidos corporales con una lectura colorimétrica. Esto se denominó SHERLOCKv2 (77,78).

Posterior a la inactivación de Rnasas por el medio HUDSON se procede a realizar el protocolo de SHERLOCK. Donde los productos de EPR se detectan en una mezcla de reacción que contiene T7 RNA polimerasa, Cas13a, un crRNA específico de la diana, y un RNA guía emite fluorescencia cuando es escindida (77,78).



**Figura 8** Esquema de detección viral directamente en la muestra del paciente por medio de HUDSON y SHERLOCK

**Tomado de:** Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from:

## 7.2. Preparación de las muestras

Se inactivaron las muestras de orina mediante la adición de TCEP y EDTA a unas concentraciones finales de 100mM y 1mM, respectivamente. Se utilizaron dos protocolos: 1. Etapa de inactivación a 95°C durante 10 minutos o la inactivación en dos pasos a 50°C durante 20 minutos, seguido de 95°C durante 5 minutos. Estas inactivaciones se realizaron utilizando un termociclador o un bloque de calor seco (70).

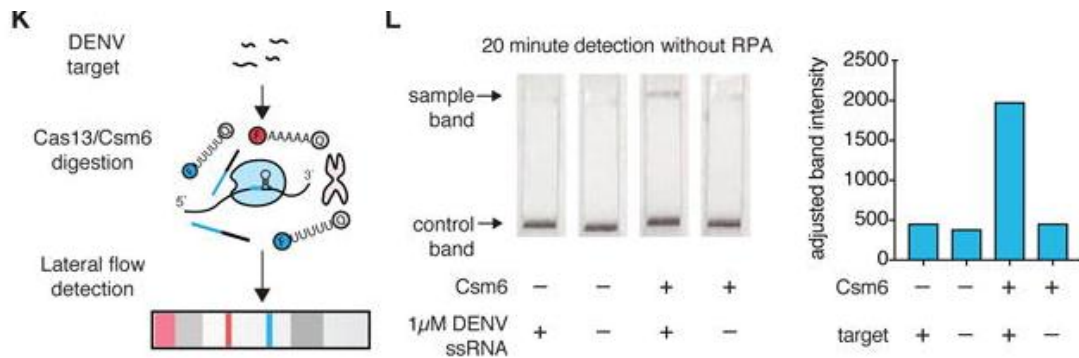
La inactivación de RNAsas de ZIKV en sangre, suero y las muestras de saliva total se realizó mediante la adición de TCEP/ EDTA a unas concentraciones finales de 100mM y 1mM, respectivamente. Se realizó una inactivación en 2 pasos a 50°C durante 5 minutos, seguido de 64°C durante 5 minutos para sangre o saliva, o 50°C durante 20 minutos, seguido de 95°C durante 5 minutos para orina (70).

La inactivación de RNAsas de DENV en sangre, suero y muestras de saliva se realizó mediante la adición de TCEP/EDTA a unas concentraciones finales de 100 mM y 1mM, respectivamente. Se realizó una inactivación en dos pasos. Uno a 42°C durante 20 minutos, seguido de 64°C durante 5 minutos. Las inactivaciones se realizaron utilizando un termociclador. (70).

La parte más difícil para ejecutar una reacción basada en Cas13a es purificar la proteína Cas13, la cual debe expresarse y purificarse de forma recombinante (30) Para la purificación de la proteína Cas13 acudieron a la casa comercial Genscript.

Para mejorar la detección y reducir la probabilidad de lectura falsa positiva, se combinó Csm6 con la detección de Cas13 en flujo lateral (65) (Figura 10). La proteína Csm6 asociada con CRISPR funciona como una RNasa independiente que degrada los transcritos de ARN invasores, esta

proteína requiere de un segundo ARN mensajero generando un complejo de interferencia de tipo III (65).



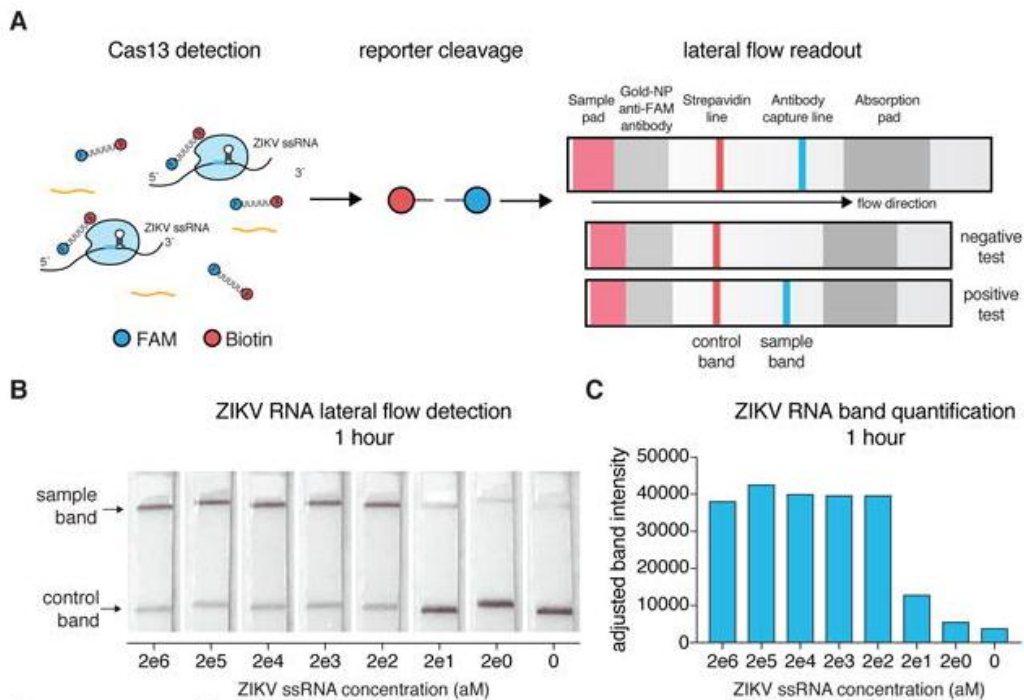
**Figura 9:** Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. K) Esquema de lectura de flujo lateral de detección de LwaCas13a mejorada con EiCsm6 de ssRNA de DENV. L) Detección de flujo lateral mejorada de EiCsm6 de ARN de DENV sintético en combinación con LwaCas13a sin preamplificación por RPA. Cuantificación de la intensidad de la banda.

**Tomada de:** Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):439–44. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaq017> (70).

EL objetivo de SHERLOCKv2 fue diseñar una lectura visual de la actividad que no requiere instrumentos adicionales. Primero se usó un reportero de RNasa colorimétrico basado en la degradación de conglomerados nanopartículas de oro, pero para lograr esta lectura se requería de una actividad de RNasa más alta que la generada por Cas13 (65).

Posteriormente se realizó la detección en tiras de flujo lateral basada en la destrucción de un reportero de FAM-RNA-biotina (65). Utilizando un oligonucleótido de sonda personalizada. El abundante ARN guía acumula conjugados de nanopartículas de anticuerpo anti-FAM en la primera línea de la tira, evitando la unión de los conjugados de anticuerpo y oro a la proteína. En la segunda línea la escisión de la información reduciría la acumulación en la primera línea y daría como resultado una señal en la

segunda línea (60). Las reacciones de detección Cas13 se diluyeron 1:5 en Hybridetect a continuación se insertaron las tiras y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se retiraron las tiras y se fotografiaron usando una cámara de celular (78).

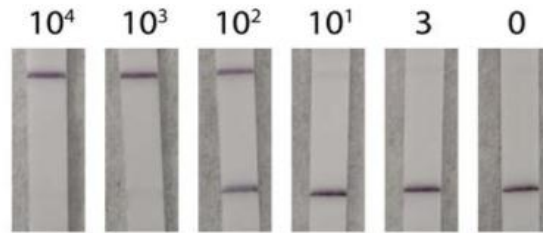


**Figura 10:** Adaptación de SHERLOCK para detección de flujo lateral. A) Esquema de detección de flujo lateral con SHERLOCK. B) Detección de ARNss de ZIKV sintético utilizando SHERLOCK de flujo lateral con 1 hora de reacción LwaCas13a. C) Cuantificación de la intensidad de la banda a partir de la detección en (B)

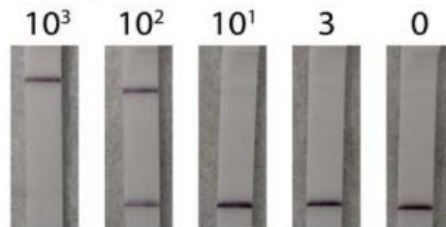
**Tomado de:** Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):439–44. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaq017> (70).



### ZIKV cp/ $\mu$ l (PBS dilutions)

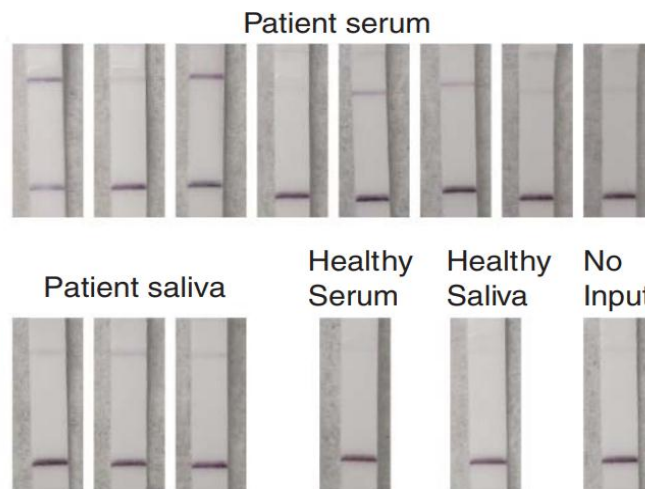


### ZIKV cp/ $\mu$ l (urine dilutions)



**Figura 11** Detección del virus de ZIKA dilución en orina, lectura en tiras de flujo lateral. La banda superior es la prueba y la banda inferior es el control. Una banda débil es visible en 10 copias por microlitro tanto en diluciones por PBS como en orina, una hora post detección.

**Tomada de:** Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aas8836> (69)



**Figura 12:** Detección en tiras de flujo lateral de DENV a partir de muestras tratadas con tris(2-carboxietil) clorhidrato de fosfina (TCEP)- EDTA antes de ser calentadas.

**Tomada de:** Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aas8836> (69)

El ensayo de ZIKV SHERLOCK se evaluó el rendimiento en 40 ADNc derivados de muestras recogidas durante la pandemia de ZIKV en 2015 y 2016, 37 de las cuales correspondían a pacientes con sospecha de infección por ZIKV y 3 de piscinas de mosquitos. Se realizó un estudio comparativo con 16 muestras de estos pacientes, frente a la prueba de amplificación de ácido nucleico Altona Realstar ZIKV. De las cuales 10 muestras positivas con la prueba de Altona fueron detectadas por SHERLOCK lo que se traduce en un 100% de sensibilidad; las otras 6 muestras fueron negativas para los dos ensayos, lo cual corresponde a un 100% de especificidad y 100% de concordancia. Posteriormente se evaluó la capacidad de SHERLOCK para detectar DENV, un flavivirus que causa síntomas similares a los de ZIKV; las 24 muestras positivas por RT-PCR para ARN de DENV fueron confirmadas después de 1 hora. SHERLOCK detecta ácidos nucleicos virales sensible y específicamente de muestras de pacientes con ZIKV y DENV (77).

Debido a que los flavivirus causan síntomas similares han desarrollado paneles multivirus se puede utilizar para diferenciar especies virales y serotipos; (77). Se utilizaron ZIKV, Virus del Nilo Occidental, DENV y el Virus de la fiebre amarilla (VFA) (77).

### **7.3. DETECTR**

*DETECTR (DNA endonucleasa targeted CRISPR trans reporter) creado en un laboratorio del instituto médico Howard Hughes, es un nuevo método que combina capacidades de CRISPR para detectar dos tipos de VPH en muestras humanas. Haciendo uso de la enzima Cas12a que no solo corta la cadena de ADN que ata, sino que corta otro ADN también, los investigadores describen que bajo ciertas circunstancias, la enzima se convierte en una máquina de “trituration” de ADN que corta cualquier ADN monocatenario cercano , para que comience esta acción, Cas12a tiene que cortar un ADN preciso, el cual se puede programar agregando una molécula*

guía que podría ser ARN fácilmente reprogramable según el fragmento de ADN que se quiera detectar (29).

Ya cuando Cas12a se bloquea y corta el objetivo, comienza a “triturar” todo el ADN monocatenario que encuentre a su paso. Para darle utilidad al sistema se necesita encontrar una forma de visualizar cuando Cas12a comience ese caos molecular, que indicaría que Cas12a encontró su objetivo, para identificar esa acción los investigadores usaron una molécula brillante, unida por una sola cadena de ADN a una molécula supresora que previene el brillo. Cuando cas12 se convierte, activa su función de corte; cortaría la cadena de ADN que une a estas dos moléculas, esto elimina el supresor y deja que brille la molécula señalizadora, para ser detectada (29).

## **8. Estudios realizados aplicando la herramienta de diagnóstico DETECTR**

El virus del papiloma Humano es causante de una enfermedad de transmisión sexual, una enfermedad difícil de curar que se manifiesta por medio de verrugas que surgen en la región genital después del contacto íntimo con un individuo infectado.

Algunas personas con VPH se curan solo si hay una remisión espontánea del virus. Lo cual puede ocurrir en un lapso de 4 semanas y 2 años (29).

Según la OMS el VPH es el agente causal del cáncer de cuello uterino, el cual ocupa el cuarto lugar entre los tipos más comunes de cáncer que afectan a mujeres, con alrededor de 266.000 muertes y 528.000 nuevos casos para el 2012, que dieron lugar en regiones menos desarrolladas (29).

Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, la infección genital por VPH que persiste puede causar cáncer de cuello uterino en mujeres. Casi el 99% de los casos de cáncer de cuello uterino están vinculados con la infección genital por VPH, que puede causar otro tipo de cáncer como el anogenital,

cánceres de la cabeza y del cuello y verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres (29).

Según estudios epidemiológicos realizados por el ministerio de salud con más prevalentes a nivel mundial, demostraron que los tipos de VPH pueden dividirse en dos grupos según su potencial oncogénico:

- VPH de bajo riesgo: tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44 y 61 responsables de lesiones benignas como condilomas- verrugas genitales y neoplasias intraepiteliales de bajo grado, las cuales presentan un riesgo mínimo de que estas lesiones progresan a lesiones de alto riesgo (55,79).
- VPH de alto riesgo: tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 58, 68, 73 y 82 que al presentarse infecciones recurrentes pueden conducir al cáncer. Los dos tipos comúnmente asociados a Cáncer Cervicouterino son los tipos 16 y 18 (55,79).

Actualmente para el diagnóstico de VPH se realizan las siguientes pruebas:

- Examen Macroscópico o físico: allí se realiza una observación directa de las verrugas genital, para lo cual se puede usar ácido acético que tiñe de blanco las lesiones, también se puede observar mediante colposcopia del cuello uterino y vagina previamente teñida con yodo o ácido acético (56).
- Examen microscópico: observación de células sospechosas con cambios coilocíticos en citologías de cuello uterino en mujeres, usando la tinción de Papanicolaou. Se pueden tomar biopsias de lesiones sospechosas y de verrugas genitales para ser analizadas (56).
- Detección directa del material genético del virus: por técnica de biología molecular PCR para amplificar el ADN del virus y permitir la identificación de los diferentes serotipos (56).

El grupo de investigadores puso a prueba el sistema DETECTR dirigido por el Dr. Joel Palefsky y su equipo de trabajo de la universidad de california, buscaron señales de ADN de dos tipos de VPH causantes de cáncer como lo son el tipo 16 y el tipo 18, para ello obtuvieron 25 muestras de ADN tomadas de

personas sin la infección por VPH, para VPH tipo 16 DETECTR hizo el procedimiento correctamente en las 25 muestras, para VPH tipo 18 DETECTR lo hizo correctamente con 23 de 25 muestras, en los que dio señales débiles que según Doudna se puede mejorar con diseños especiales de ARN guía (29).

Si comparamos los métodos actuales para detectar una infección por VPH, DETECTR es más simple, más rápido y no requiere equipos especializados, lo que sería de gran utilidad para clínicas o centro de salud con recursos limitados, lugares de difícil acceso e incluso en casos donde haya déficit en los servicios públicos. DETECTR no depende de ningún servicio público o herramientas para llevar a cabo su aplicación (29).

De acuerdo con la OMS en Estados Unidos más de 4000 mujeres mueren de cáncer de cuello uterino anualmente y HPV tipo 16 y tipo 18 son causantes del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino y lesiones precancerosas (79).

DETECTR que puede identificar la presencia del VPH en muestras clínicas e incluso en pequeñas cantidades de ADN, demostrando así que esta plataforma tiene una sensibilidad del 100%, es una técnica rápida, específica tanto para VPH16 y VP18 (23). En un estudio se logró probar que en un tubo que contenía ADN de células humanas infectadas, detectó VPH tipo 16 con una precisión del 100% y VPH tipo 18 con 92% de precisión, siendo estos los dos tipos de VPH más peligrosos, responsables de causar cáncer en hombre y mujeres (29).

DETECTR podría aplicarse a otros tipos de infecciones virales o bacterianas e incluso a marcadores de cáncer, anomalías cromosómicas u otras señales genéticas (29).

El sistema DETECTR puede analizar células, sangre, saliva, orina y heces para detectar mutaciones genéticas, resistencia al cáncer y antibióticos, así como diagnosticar infecciones tanto bacterianas como virales (29).

DETECTR cuesta menos de un dólar y demora aproximadamente una hora. Por lo que ahora su equipo de investigación busca desarrollar un hardware adecuado que permita a las personas leer fácilmente la señal fluorescente, a su

vez se busca probar que el sistema funciona no solo en sangre sino también en saliva, orina y otro tipo de muestras humanas (29).

Los dos sistemas requieren aún más investigaciones, deben asegurarse de que sean altamente precisos para ser usado en pacientes de forma *in vitro*, pero estas pruebas tienen un potencial tan alto que pueden tener un gran impacto para la salud humana y por ende para la sociedad (29).

## **9. IMPLICACIONES PARA COLOMBIA Y LA BACTERIOLOGÍA**

La detección precoz de enfermedades por medio de una prueba diagnóstica persigue la identificación presuntiva de la enfermedad, deficiencia o rasgo desconocido en una persona durante el periodo asintomático o subclínico de la enfermedad. Se han incorporado a la asistencia médica, la prevención de las enfermedades crónicas a través de la de la detección precoz en personas asintomáticas, con el deseo de intervenir médicamente en estadios en los que anteriormente no eran reconocidas las enfermedades, deficiencias o los estados de riesgo de enfermar. Es la prevención secundaria de las enfermedades, por medio de la realización de pruebas diagnósticas en personas aparentemente sanas, que darían el mismo rendimiento en el diagnóstico de personas con alguna patología (80).

En Colombia se evidencia la gran magnitud e importancia que hay que darles a las principales enfermedades transmitidas por vectores, siendo este un problema prioritario de salud pública en zonas tanto rural como urbanas. Desde el punto de vista epidemiológico, estas enfermedades presentan un comportamiento edemoepidemiológico persistente y focalizado, aunque con una amplia dispersión y patrones variables de intensidad de la transmisión en las áreas endémicas del territorio nacional (81). Las áreas tropicales y subtropicales son aquellas que presentan más número de casos de personas infectadas. Así como el aumento en los niveles de lluvia, cambios climáticos, entre otros (82). En cuanto a Dengue

estos son algunos de los Departamentos que presentan mayor número de casos (Norte de Santander, Magdalena, Tolima, Cesar, Antioquia, Meta, Huila, Córdoba, Putumayo, entre otros) (83). Para Fiebre amarilla, aunque los últimos casos reportados no son dentro del territorio nacional, los departamentos donde se reportaron aproximadamente 2.5 casos anuales para la década de los 90's fue en (Meta, Vichada, Guaviare, Amazonas, Caquetá) (74).

En zonas urbanas del país situado a menos de 2200 msnm, las enfermedades endemo-epidémico transmitidas por *Aedes aegypti* como Dengue y las emergentes como Chikungunya y Zika presentan gran riesgo para el rededor de 28'344.991 personas (73).

Aunque en las zonas rurales de Colombia las enfermedades que predominan son las parasitarias, existe un algo riesgo de adquirir enfermedades transmitidas por vectores.

En cuanto a la economía en Colombia, se vería beneficiada en gran proporción por el ahorro generado al no tener que asumir los gastos comprando equipos especializados, reactivos, mantenimiento de los mismo, insumos básicos para el montaje de la muestra en el equipo, capacitación del personal para el uso del equipo, entre otros.

En Colombia existen laboratorios con distintos grados de complejidad como lo son el tipo I, II y III nivel.

**a) Laboratorio clínico de bajo grado de complejidad:** Es aquel que cuenta con recursos humanos, infraestructura física y la tecnología requerida que le permita realizar por lo menos las pruebas básicas en el laboratorio apoyando el diagnóstico de los problemas de salud en su área de influencia, pudiéndose valer de los sistemas de referencia y contrarreferencia (84).

**b) Laboratorio clínico de mediano grado de complejidad:** Es aquel que cuenta con recursos humanos, la tecnología e infraestructura física que le permite realizar por lo menos los exámenes debajo y medio grado de complejidad dirigidos a apoyar el diagnóstico de los problemas de salud de su área de influencia, pudiéndose valer de los sistemas de referencia y contrarreferencia (76).

**c) Laboratorio clínico de alto grado de complejidad:** Es el laboratorio clínico de mayor complejidad que cuenta con los recurso humano especializado, tecnología avanzada e infraestructura física requerida para realizar de baja, mediana y alta complejidad dirigidos a apoyar el diagnóstico de los problemas de salud en su área de influencia, apoyando del sistema de referencia y contrarreferencia. (76).

Todos los laboratorios deben estar en capacidad de apoyar la vigilancia epidemiológica de la población en su área de influencia.

Debido a que no todos los centros de salud cuentan con los recursos necesarios para realizar pruebas confirmatorias es necesario implementar pruebas rápidas, específicas, que no requieren equipos especializados, de bajo costo, que permitan diagnóstico de enfermedades virales en el menor tiempo posible. Para cumplir este propósito la implementación de pruebas de diagnóstico de enfermedades virales como es el caso de SHERLOCKv2 basado en el sistema CRISPR-Cas13a daría a los servicios de salud la capacidad brindar tratamiento oportuno a pacientes enfermos, evitando que el agente causal genere un daño sistémico, deterioro del estado general del paciente, reflejando una disminución en las tasas de mortalidad en Colombia.

En cuanto al ámbito de la Bacteriología y el laboratorio clínico la importancia de implementar esta nueva tecnología radica en el papel fundamental que cumple el diagnóstico en el laboratorio clínico como herramienta de apoyo para que el médico pueda tomar la conducta adecuada frente al tratamiento del paciente.

Un proceso analítico en el laboratorio comprende tres fases; La fase preanalítica, que incluye todos los procesos desde la solicitud del análisis por el parte médico, hasta el procesamiento de la muestra. La fase analítica, que abarca todos los procedimientos relacionados directamente con el procesamiento de la muestra y La fase post analítica, que se fundamenta en la validación de resultados, elaboración y emisión del informe por parte del laboratorio (85).

Podríamos resaltar que, aunque la fase preanalítica requiere que las muestras sean tomadas en las condiciones adecuadas según la normatividad, como la preparación del paciente, la obtención de muestras e identificación de



especímenes, se recomienda el uso de materiales e instrumentos de calidad, con un adecuado transporte y almacenamiento de las muestras. En la fase analítica exige el uso de tecnologías que permitan emitir un resultado confiable y oportuno (77).

En cuanto al uso de la tecnología CRISPR-Cas para el diagnóstico de enfermedades virales, se resalta la capacidad que tendría un laboratorio de cualquier nivel en Colombia a brindar un resultado diagnóstico reemplazando equipos especializados de costo elevado para lo que abarca el procesamiento de la muestra, tiempos prolongados para emitir un resultado, dicho lo anterior, el paciente tendría un tratamiento acorde a su patología en el menor tiempo posible, evitando comprometer los órganos del paciente, por ende su estado de salud y su vida (65)

Esta sería una herramienta de gran utilidad para poder procesar gran cantidad de muestras en poco tiempo, reduciendo el tiempo de emisión de un resultado y agilizando la atención en los servicios de salud.

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1. Tipo de investigación**

La presente investigación es de tipo documental, que corresponde a un estudio descriptivo en la se realizó una clasificación de la información recopilada a partir de artículos científicos, libros y diferentes investigaciones. Se tomaron estudios realizados por investigadores en el tema como referencia para la extracción de puntos clave que permitan el desarrollo asertivo y a profundidad sobre el tema, adicionalmente es de tipo cualitativo, pues se enumeran las características, fracciones, tipos y métodos que la herramienta CRISPR podría facilitar para un diagnóstico rápido y sencillo de enfermedades, de manera que al revisar este artículo,

el lector pueda hacerse a la idea de la infinidad de aportes que traerá para mejorar la calidad de vida de los seres vivos a partir del diagnóstico de enfermedades.

### **10.1.1 Búsqueda**

- **Periodo de tiempo:** Esta revisión bibliográfica se realizó entre octubre de 2017 y mayo de 2019
- **Términos de búsqueda:** CRISPR-Cas, Edición génica, nucleasas de dedos de Zinc, nucleasas TALENs, diagnóstico de enfermedades virales usando CRISPR-Cas, Cas12a, Cas13, SHERLOCK, DETECTR, HUDSON, SHERLOCKV2, Historia CRISPR, Aplicaciones CRISPR, Funcionamiento sistema CRISPR, técnicas de diagnóstico de enfermedades virales
- **Bases de datos:** Pubmed, Scielo.

## **10.2. Recopilación de la información**

### **10.2.1. Revisión de artículos**

Para el desarrollo de este artículo de revisión bibliográfica se tomaron artículos de revistas como Science, Genética Médica, Dciencia, Scielo, Scicats, Medium, The Verge, Science Daily, Reportes de la OMS, Guías de la secretaría de salud en Colombia, Artículos de universidades como Universidad Politecnica de Valencia, Universidad de la Coruña, Universidad de Cantabria, Proyectos como World mosquito program, Publicados desde 1987 en adelante con datos relevantes sobre la herramienta CRISPR como herramienta para diagnóstico de enfermedades virales.

## **10.3. Criterios de inclusión**

- Artículos científicos e investigaciones que incluyan los métodos usados anteriormente para edición génica, basados en las herramientas Dedos de Zinc y TALENs
- Artículos científicos e investigaciones que aborden el sistema CRISPR-cas desde su descubrimiento en 1987 hasta la fecha.
- Artículos científicos e investigaciones que aborden enfermedades virales de importancia en salud pública en Colombia como Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, VPH y los problemas con el diagnóstico de estas.

#### **10.4 Criterios de exclusión**

- Artículos científicos e investigaciones que aborden la edición génica desde el aspecto Ético y moral y no su fundamentación y aplicaciones.
- Artículos que aborden otras enfermedades virales que no sean las anteriormente mencionadas.

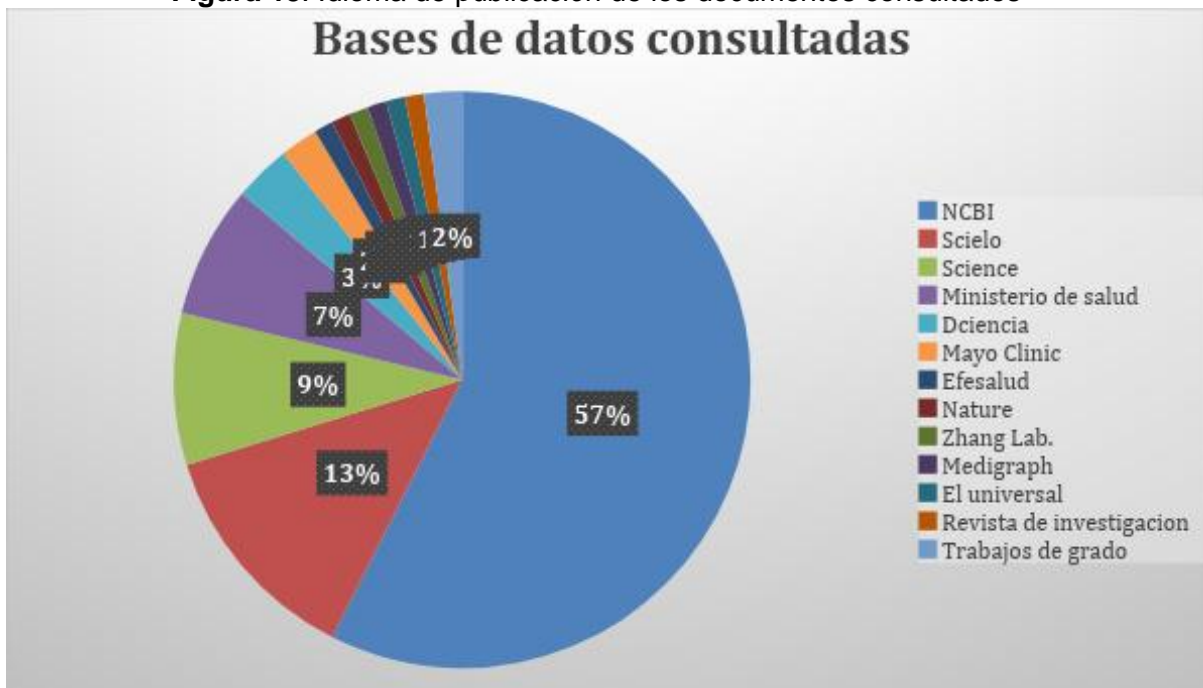
## **11. RESULTADOS**

Se revisaron un total 105 de documentos, de los cuales 84 cumplían con los requisitos de inclusión y exclusión propuestos en la metodología, estos documentos corresponden a artículos científicos que enmarcan las investigaciones realizadas en países como Estados Unidos, España, Mexico, Japón, entre otros, de los cuales 57 se extrajeron en idiomas inglés y 27 en idioma español. Los artículos científicos fueron extraídos de las bases de datos PubMed y Scielo. Adicionalmente fue posible recopilar información procedente de tesis y proyectos de grado de estudiantes de la Universidad de Cantabria, Universidad de coruña. Todos estos artículos científicos y demás documentos revisados contienen datos que hacen alusión a las herramientas usadas para edición génica desde antes del descubrimiento del sistema CRISPR-Cas y su variedad de aplicaciones en el

campo de la salud, la agricultura y la industria. A continuación, se describen los resultados obtenidos de esta revisión.



**Figura 13.** Idioma de publicación de los documentos consultados



**Figura 14** Bases de datos consultadas

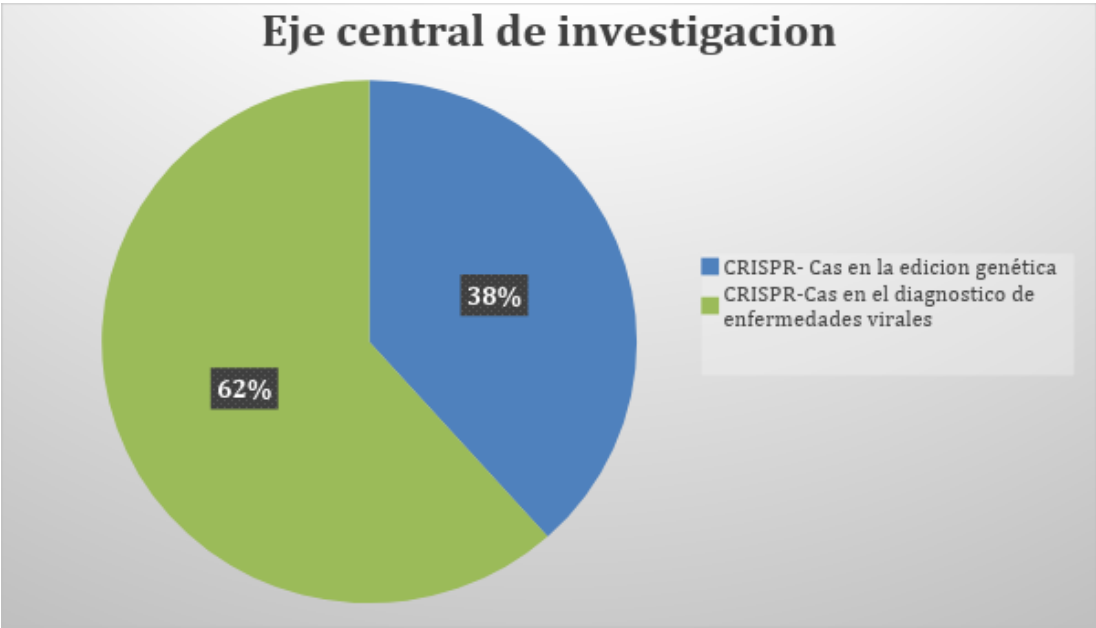


Figura 15 eje central de investigación

## 12. RESULTADOS MÁS RELEVANTES DE LOS ARTÍCULOS REVISADOS

En 1987 Ishino describe unas secuencias repetidas a lo largo del genoma de *E.coli* a cierta distancia una de la otra(5), separadas por secuencias de ADN únicas, este hallazgo junto con el realizado por F. Mojica en un estudio realizado en las salinas de Alicante en España, dieron partida a estudiar esta familia de repeticiones que F. Mojica denominarían para el año 2000 secuencias CRISPR(6). Para el 2002 Jansen reporta la identificación de los genes Cas quienes se encargan de sintetizar las proteínas asociadas al sistema (cas)(7). En el año 2005 F. Mojica al estudiar estas secuencias unidas de ADN que intercalaban las secuencias CRISPR descubre que estas son de origen viral(24), debido a que la bacteria al ser infectada por un virus, toma copia de su material genético e integra una fracción del mismo en su material genético, denominando así al sistema CRISPR-Cas un sistema de inmunidad adaptativa de las bacterias que se transmitía de generación en generación(22). A partir del 2012 se inician investigaciones de las aplicaciones del sistema desde la edición génica(17) hasta el diagnóstico de enfermedades virales(65).

### 12.1 EDICIÓN GÉNICA

Existen herramientas de edición génica, tales como las Nucleasas de dedos de Zinc (ZFN), las Nucleasas de tipo activadores de la transcripción (TALENs) y las nucleasas de secuencias palindrómicas repetidas inversas (CRISPRs-Cas), que permiten el corte de ambas cadenas de ADN en secuencias específicas y únicas del genoma, seguido de procesos de reparación por recombinación homóloga o no homóloga. La dificultad más importante de las dos primeras herramientas es que requiere el uso de enzimas fabricadas, que no solo es de alto grado de dificultad, sino que también implica un alto costo y tiempo para lograr dicho propósito.

Se han realizado gran variedad de estudios usando el sistema CRISPR-Cas9 para edición genética que demuestran el amplio rango de aplicabilidad de esta herramienta en áreas como la Salud, la agricultura y la industria.

## **12.2. Diagnóstico de enfermedades virales**

Los investigadores Jennifer Doudna y Emanuelle Charpentier, Feng Zhang, estudian las proteínas Cas12a y Cas13 respectivamente, siendo estas endonucleasas con preferencia de corte de ADN (Cas12a) y ARN (Cas13). Para determinar sus funciones, utilidades, una de estas el diagnóstico de enfermedades virales. Crean dos plataformas en las que actualmente se sigue estudiando, DETECTR y SHERLOCK.

Las técnicas de amplificación isotérmica a una temperatura constante y baja reemplazan los métodos estándar de Reacción en cadena de la polimerasa permitiendo herramientas de diagnóstico portátiles que se pueden implementar en condiciones de campo donde los laboratorios no cuenten con equipos especializados.(41)

El estudio realizado en 2018 por el grupo de investigación de Chen JS y colaboradores demuestra la capacidad de Cas12a de escindir en una cadena sencilla de ADN mediante la tecnología DETECTR que acopla la amplificación isotérmica con un ARN guía marcado con la proteína Cas12a, este hallazgo permitió la detección precisa de dos genotipos distinto del virus del papiloma humano en muestras de pacientes (63).

CRISPR es una herramienta viable para su uso en el diagnóstico de enfermedades virales. La investigación adicional de la endonucleasa Cas13a ha facilitado mejoras sustanciales a SHERLOCK al combinar la tecnología SHERLOCK y HUDSON dio lugar a la versión SHERLOCKv2 que usando la proteína Cas13a permite la detección de ácidos nucleicos específicos

directamente en las muestras de los pacientes sin la necesidad de equipos especializados para su procesamiento.

SHERLOCKv2 puede usar simultáneamente varios ARN<sub>g</sub>uia, cada uno de ellos programado a generar un corte en secuencias específicas dentro del genoma con el objetivo de detectar múltiples secuencias de ARN y ADN dentro de una sola muestra (67).

HUDSON es un método que permita lisar las partículas virales e inactiva los niveles de ribonucleasas presentes en los fluidos por medio del uso de calor y reacciones químicas.

En el estudio realizado por el equipo de Myhrvold C, tomaron muestras de Sangre, suero, orina, las cuales se les agregó TCEP/EDTA con el fin de inactivar las RNasas de ZIKV, DENV y luego se expusieron al método HUDSON y tras varios intentos lograron una lectura visual usando una molécula reportera a base de FAM-RNA-biotina, donde 5 minutos más tarde se evidenció la reacción en tiras de flujo lateral.

Al realizar estudios comparativos para determinar el rendimiento de SHERLOCK frente a pruebas de amplificación de ácidos nucleicos como Altona Realstar, demuestran que SHERLOCK proporciona un 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% de concordancia.

Al combinar Csm6 con la detección de Cas13 en tiras flujo lateral demuestra una disminución en el tiempo de lectura de 1 hora a 20 minutos.

SHERLOCK puede usarse para diferenciar entre varias cepas de un mismo virus. Desarrollaron paneles multivirus para diferenciar especies virales y serotipos utilizando ZIKV, Virus del Nilo Occidental, DENV y el Virus de la fiebre amarilla (67).

Si se compran las pruebas de diagnóstico virales que se utilizan actualmente con las herramientas de diagnóstico viral que usa el sistema CRISPR-Cas; se observan porcentajes considerables de sensibilidad y especificidad para los dos



casos, por otro lado, las pruebas convencionales presentan grandes desventajas en cuanto a costos, maquinaria, capacitación del personal, son dependientes de las casas comerciales. Punto a favor para el sistema CRISPR-Cas debido a que se mitigan al máximo estas debilidades o desventajas, permitiendo de esta manera que estas pruebas puedan ser implementadas en laboratorio de I, II, III y IV nivel, llegando a los lugares más remotos. Todo esto da la posibilidad a la población de tener un diagnóstico oportuno, en corto tiempo, agilizando la atención, tratamiento y que a fondo no se vería beneficiada únicamente la población, si no la economía puesto que se disminuyen costos de hospitalización, alimentación, entre otros recursos que pueden ser utilizados para atender a más personas en menos tiempo.

### **13. DISCUSIÓN**

En los artículos científicos revisados y analizados, se evaluó el uso del sistema CRISPR-Cas para el diagnóstico de infecciones de carácter viral, pruebas específicas para la detección de virus que actualmente no se encuentran implementadas en los servicios de salud en Colombia.

Actualmente las técnicas usadas para el diagnóstico de enfermedades virales son procedimientos costosos, requieren de equipos especializados que no todos los centros de salud cuentan con ellos, así como presentan demoras para revelar un resultado, con baja especificidad y/o que requiere de un periodo de incubación del virus prolongado para ser detectadas o se hacen con pruebas adyacentes que determinan los daños sistémicos del patógeno en el organismo del individuo, lo que implica que el microorganismo haya ingresado al organismo con el tiempo suficiente para causar daño. Las consecuencias de un diagnóstico inoportuno podrían terminar en complicaciones dejan a su paso secuelas importantes, dañando la calidad de vida de las personas y aún más importante aquellas enfermedades que pueden terminar en la muerte del paciente.

Desde el 2012 se adelantan investigaciones sobre nuevas técnicas para el diagnóstico de enfermedades virales, en corto tiempo, a bajo costo, con alta especificidad y sensibilidad, y que sean de fácil accesibilidad. Es allí donde juega un papel importante una herramienta descubierta desde 1987 que lleva grandes avances hasta el momento, sobre sus diferentes aplicaciones, una de estas es la posibilidad de usar el Sistema CRISPR para el diagnóstico de estas enfermedades virales.

CRISPR es una herramienta que promete mejorar la calidad de vida de los seres vivos, revirtiendo problemas genéticos, mejorando el sistema de respuesta de las células contra invasiones por otros microorganismos, entre muchas otras aplicaciones.

Es decir, lo que se pretende es dar a conocer hasta dónde han llegado las investigaciones realizadas hasta la sobre CRISPR en cuanto a su uso como herramienta diagnóstica, así como, lo prometedor que puede ser esta herramienta para la vida y los aportes que puede llegar a hacer para la rama de la salud, no solo humana sino también animal y vegetal.

SHERLOCK una de las herramientas en estudio demuestra ser un método sensible y específico para la detección de ácido nucleico, al ser usado en diferentes estudios de investigación para la detección de ZIKV y DENV son prueba clave de la sensibilidad de SHERLOCK, puesto que estos virus son difíciles de detectar en pacientes con bajos títulos virales o degradación de la muestra.

Actualmente se ha diseñado HUDSON una plataforma que combinada con SHERLOCK permite la detección sensible del ácido nucleico viral a partir de una muestra de sangre total, orina, saliva, suero con un tiempo de respuesta menor de 2 horas de lectura fluorescente y colorimétrica.

El uso conjugado de Cas13a con Csm6 permite reducir el tiempo de respuesta de una prueba que era anteriormente de 1 hora a solo 20 minutos, acercándose al

objetivo de ser SHERLOCKv2 una prueba rápida para el diagnóstico de enfermedades virales.

Existen estudios recientes que evidencian la capacidad del sistema para identificar en paneles múltiples los serotipos o multivirus que determinan la diversidad de secuencias de ARN del virus que están relacionadas lo que conlleva al diseño de una prueba capaz de identificar el virus o el serotipo del virus presente en el organismo de un paciente sin necesidad de hacer diagnósticos diferenciales, de manera que el tratamiento sería brindado al paciente de oportunamente, reduciendo tasas de mortalidad y secuelas irreversibles

En comparación con las técnicas convencionales que se emplean para el diagnóstico de enfermedades de tipo NAATS, NGS e inmunoensayos. SHERLOCKv2 No requiere equipos costosos, no presenta interferencias por su alta eficiencia, no requiere de un tiempo de ejecución prolongado, ni habilidades bioinformáticas para el análisis de datos.

Las fortalezas del sistema se basan en su capacidad para detectar la presencia de secuencias del genoma del virus de interés con una pequeña cantidad de muestra, así como la posibilidad de detectar la presencia de varios virus en un mismo paciente, esclareciendo el agente invasor como recurso que brinda al médico la información oportuna para que tome la conducta adecuada en menos tiempo que con otras pruebas.

De las limitaciones que presenta el uso del sistema con más relevancia, se encuentra que las proteínas Cas deben ser purificadas de sus precursores, por ende, requiere de procesos previos, generando un aumento en el costo de la prueba final. (7)

## 14. CONCLUSIONES

La trayectoria del sistema desde su descripción inicial en 1987 por el grupo de investigación liderado por Ishino, hasta los resultados de investigaciones publicados en el primer semestre del 2019 dan claridad a que es el sistema, como se conforma, las utilidades que tienen algunas de las proteínas asociadas al sistema (Cas) y aunque se hacen estudios simultáneamente de las variantes del sistema, aún queda una infinidad de aplicaciones por descubrir.

Los sistemas CRISPR-Cas han proporcionado herramientas revolucionarias para la edición del genoma. El descubrimiento de las proteínas asociadas al sistema (Cas) con diversas actividades ha permitido herramientas sensibles para la detección de ácidos nucleicos. Recientemente se aprovechan estas nuevas tecnologías con potencial para desarrollar herramientas de diagnóstico prácticas y de bajo costo para la detección de diversos virus.

Las proteínas Cas tienen una preferencia de corte específica para ARN como lo es para Cas13a y para ADN Cas12a tras localizar la secuencia homóloga al ARN guía. La actividad de la proteína Cas13a funciona de manera similar a Cas9 utilizando un ARN guía para codificar la especificidad del objetivo. Tras localizar su objetivo estas proteínas se enloquecen y empezaban a cortar indiscriminada e inespecíficamente todas las moléculas de ARN que encontraban a su paso, sin embargo, investigadores como Feng Zhang adaptaron el sistema de manera que incluyeron moléculas de ARN unidas a fluorocromos que al ser cortadas son capaces de emitir luz sistema que se denominó SHERLOCK. De manera independiente en el laboratorio de Jennifer Doudna usan la proteína Cas12a que en un principio corta ADN de doble cadena guiada por una molécula de ARN complementaria al gen que se desea editar, pero una vez esta proteína localiza el gen diana también corta indiscriminadamente cualquier ADN de cadena sencilla presente en la muestra. Lo que este laboratorio propone es incluir en la muestra a

analizar moléculas de ADN de cadena sencilla indicadoras, unidad a compuestos fluorescentes que empiecen a emitir luz una vez la proteína Cas12a haya realizado algún corte, a esta prueba la denominaron DETECTR.

Ahora si bien las dos propuestas han sido de utilidad para la detección de ZIKV, DENV, VPH y otros virus. El proceso denominado HUDSON o calentamiento de muestras de diagnóstico extraídas para eliminar nucleasas. Consiste en un tratamiento químico- térmico rápido usado en las muestras para inactivar ciertas enzimas de modo que degradaron las dianas genéticas. Posteriormente las muestras deben analizarse mediante SHERLOCK y los resultados finales de dicha detección, ya sean negativos o positivos podrán evidenciarse en tiras de papel. De manera que sea fácil, rápida y confiable la identificación ácidos nucleicos o elementos de degradación de estos en muestras como Sangre total, Suero, Saliva y Orina.

El estudio de las funciones de las endonucleasas Cas contribuye al objetivo de convertir CRISPR en un sistema de diagnóstico rápido y fácil de usar, de manera que puede ser empleado fácilmente en cualquier lugar. Como evidencia de lo anterior, el uso de Cas13a conjugado con Csm6 para la detección de ZIKV y DENV demostró la capacidad del sistema para reducir su tiempo de respuesta de 1 hora a 20 minutos por medio de la prueba SHERLOCKv2 en tiras de flujo lateral.

Las mejoras del sistema hacen que cada vez sea más fácil y rápido distinguir entre múltiples especies virales relacionadas tales como Zika, Dengue, Nilo Occidental y Fiebre amarilla) entre sí, lo que es de utilidad cuando los pacientes tienen sintomatologías generales para determinar si la patología causada de se debe a más de un virus.

Aunque una dificultad que presenta SHERLOCK para ejecutar la reacción es en sí la necesidad la purificación de la proteína Cas13a a partir del vector de la proteína típicamente LwaCas13a. Dificultad sobre la cual están trabajando, siendo CRISPR es un sistema que muestra avances continuamente.

La implementación de las pruebas de diagnóstico viral a partir del sistema CRISPR en Colombia beneficia a la población colombiana en lo que respecta a la capacidad de cualquier servicio de salud a realizar el diagnóstico específico de la enfermedad, que, al ser apoyado por la conducta médica, reduciría sustancialmente las tasas de mortalidad y morbilidad dado que los tratamientos serían brindados al paciente de manera oportuna, se agilizarían los servicios en salud, aumentando la capacidad para atender más personas en menos tiempo y utilizando los recursos antes usados en gastos de hospitalización, alimentación, entre otros, para brindar el tratamiento adecuado a cada individuo.

En la misma instancia sería de gran utilidad para el área del laboratorio clínico y en especial para la Bacteriología, porque teniendo en cuenta que las pruebas CRISPR demuestran 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% de concordancia con respecto a otras pruebas con las que se evaluó la efectividad del sistema, los profesionales en el área tendrían la disponibilidad para realizar mayor número de pruebas con resultados confiables en menos tiempo.

## REFERENCIAS

1. Souf S. Recent advances in diagnostic testing for viral infections. *Biosci Horizons* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Apr 29];9. Available from: <https://academic.oup.com/biohorizons/article-lookup/doi/10.1093/biohorizons/hzw010>
2. Ojanguren S. El Universal - Estilos - La importancia de un adecuado análisis clínico [Internet]. El universal Estilos. 2008 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://archivo.eluniversal.com.mx/estilos/60670.html>
3. Watson J, Crick F. Estructura molecular de los ácidos nucleicos [Internet]. [cited 2019 Jun 24]. Available from: [http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/pdf/Estructura molecular de los ácidos nucleicos.pdf](http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/pdf/Estructura%20molecular%20de%20los%20ácidos%20nucleicos.pdf)
4. Mateos P. TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE IN VITRO [Internet]. [cited 2019 Jun 24]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/261983463\\_TECNOLOGIA\\_DEL\\_DNA\\_RECOMBINANTE\\_IN\\_VITRO](https://www.researchgate.net/publication/261983463_TECNOLOGIA_DEL_DNA_RECOMBINANTE_IN_VITRO)
5. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* [Internet]. 1987 Dec;169(12):5429–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316184>
6. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2019 Apr 27];36(1):244–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
7. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* [Internet].

- 2002 Mar [cited 2019 Apr 28];43(6):1565–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952905>
8. Cordero P. Zika o papiloma humano, nuevos objetivos de las CRISPR [Internet]. Saludigital. 2018 [cited 2019 Apr 27]. Available from: [https://www.consalud.es/saludigital/100/enfermedades-raras-zika-o-papiloma-humano-objetivos-de-las-crispr\\_47698\\_102.html](https://www.consalud.es/saludigital/100/enfermedades-raras-zika-o-papiloma-humano-objetivos-de-las-crispr_47698_102.html)
  9. Makarova KS. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002 Jan 15 [cited 2019 Apr 27];30(2):482–96. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.2.482>
  10. Guy CP. A novel nuclease-ATPase (Nar71) from archaea is part of a proposed thermophilic DNA repair system. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Nov 29 [cited 2019 Apr 27];32(21):6176–86. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh960>
  11. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2019 Apr 27];151(8):2551–61. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28048-0>
  12. Hao M, Cui Y, Qu X. Analysis of CRISPR-Cas System in *Streptococcus thermophilus* and Its Application. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 25];9:257. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515542>
  13. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* (80- ) [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2019 Apr 27];321(5891):960–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1159689>
  14. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome



editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2019 Apr 27];24(6):1012–9. Available from: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.171322.113>

15. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ) [Internet]. 2014 Nov 28 [cited 2019 Apr 27];346(6213):1258096–1258096. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430774>
16. Navarre (Spain). Departamento de Salud. D, García Fuentes M. ENFERMEDADES DE BASE GENÉTICA [Internet]. Vol. 31, *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud; 2008 [cited 2019 Apr 28]. 105–126 p. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272008000400008](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000400008)
17. Mora A. ¿Qué es la tecnología CRISPR/Cas9 y cómo nos cambiará la vida? | *Dciencia* [Internet]. *Dciencia*. 2015 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/>
18. Hansen K, Coussens MJ, Sago J, Subramanian S, Gjoka M, Briner D. Genome Editing with CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases (ZFNs). *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Jun 14 [cited 2019 Apr 27];(64):e3304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732945>
19. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Feb 6 [cited 2019 Apr 27];93(3):1156–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577732>
20. Revolución CRISPR L. The CRISPR Revolution [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran de la Gala Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14357/Herran_de_la_Gala_Dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

21. Jorge Y, Ramírez P, Campeche E. EDICIÓN DE GENOMAS CON NUCLEASAS SITIO-DIRIGIDAS CONTENIDO [Internet]. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientas-ensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/Ed-genomas-nucleasas-dirigidas.pdf>
22. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Apr 27];14(1):49–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23169466>
23. Moore R, Chandrabhas A, Bleris L. Transcription Activator-like Effectors: A Toolkit for Synthetic Biology. *ACS Synth Biol* [Internet]. 2014 Oct 17 [cited 2019 Apr 27];3(10):708–16. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/sb400137b>
24. Mojica FJM, Daez-Villaseñor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2019 Apr 27];60(2):174–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-004-0046-3>
25. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80- ) [Internet]. 2012 Aug 17 [cited 2019 Apr 27];337(6096):816–21. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1225829>
26. Canet López D, Castiñeira IO. CRISPR-Cas9: Técnicas y aplicaciones [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 24]. Available from: <http://openaccess.uoc.edu/webapps/o2/bitstream/10609/63825/6/dacalo4TFM0617memoria.pdf>
27. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-

- associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Comput Biol [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 Apr 28];1(6):e60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16292354>
28. Biología GE. Ingeniería genómica mediante sistemas CRISPR-Cas. 2014 [cited 2019 Jun 25]; Available from: [https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/49146/1/Ingenieria\\_genomica\\_mediante\\_sistemas\\_CRISP\\_LOPEZ\\_MANCHENO\\_YAIZA\\_ARACELI.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/49146/1/Ingenieria_genomica_mediante_sistemas_CRISP_LOPEZ_MANCHENO_YAIZA_ARACELI.pdf)
  29. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):436–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar6245>
  30. Abudayyeh, Omar. Gootenberg J. Cas13 — Zhang Lab [Internet]. Zhang Lab. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://zlab.bio/cas13>
  31. Fernanda Lammoglia-Cobo M, Lozano-Reyes R, Daniel García-Sandoval C, Michelle Avilez-Bahena C, Trejo-Reveles V, Balam Muñoz-Soto R, et al. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas [Internet]. Vol. 5. [cited 2019 Apr 27]. Available from: [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
  32. Pardo Piñón M. Grado en Biología Memoria do Traballo de Fin de Grao Overview of the CRISPR-Cas system and design of sgRNAs (single guide RNAs) for genomic DNA editing in yeast [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 27]. Available from: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19673/PardoPinon\\_Marta\\_TFG\\_2017.pdf.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19673/PardoPinon_Marta_TFG_2017.pdf.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
  33. Moran A. Nuevos usos de la tecnología CRISPR: El diagnóstico | Dciencia [Internet]. Dciencia. 2018 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.dciencia.es/nuevos-usos-de-la-tecnologia-crispr-el-diagnostico/>
  34. Kirchner M, Schneider S. CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune

- System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2015 Nov 9 [cited 2019 Apr 28];54(46):13508–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26382836>
35. Belinchón A maria. Tecnología CRISPR: aplicaciones y límites de la edición genómica [Internet]. EFE: SALUD. 2017 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.efesalud.com/edicion-genomica-humanos/>
  36. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res* [Internet]. 2014 Sep [cited 2019 Apr 28];24(9):1526–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096406>
  37. Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013 Dec 5 [cited 2019 Apr 28];13(6):653–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315439>
  38. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2019 Apr 28];12(9):1385–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299960>
  39. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports* [Internet]. 2015 Jan 13 [cited 2019 Apr 28];4(1):143–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434822>
  40. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat*

Commun [Internet]. 2015 Dec 18 [cited 2019 Apr 28];6(1):6244. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692716>

41. Chang C-W, Lai Y-S, Westin E, Khodadadi-Jamayran A, Pawlik KM, Lamb LS, et al. Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Sep 8 [cited 2019 Apr 28];12(10):1668–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26321643>
42. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2019 Apr 28];6(1):19969. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814166>
43. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* [Internet]. 2014 Aug 6 [cited 2019 Apr 28];514(7522):380–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119044>
44. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* [Internet]. 2015 Mar 23 [cited 2019 Apr 28];21(3):256–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25706875>
45. Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, Mizutani T, Sasaki N, Sasselli V, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science* (80- ) [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2019 Apr 28];358(6360):234–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28912133>
46. Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han Y-C, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* [Internet]. 2014 Dec 22 [cited 2019 Apr 28];516(7531):423–7. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337876>

47. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Dec 20 [cited 2019 Apr 28];5(1):15577. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481100>
48. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 $\Delta$ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2019 Apr 28];111(26):9591–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927590>
49. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2014 Nov 6 [cited 2019 Apr 28];15(5):643–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517468>
50. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Apr 4 [cited 2019 Apr 28];6(1):22555. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep22555>
51. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Mol Ther* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2019 Apr 28];25(5):1168–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28366764>
52. Guan Y, Ma Y, Li Q, Sun Z, Ma L, Wu L, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Apr 27];8(5):477–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26964564>

53. Regalado A. Los cultivos modificados genéticamente mediante CRISPR llegarán al mercado en cinco años | MIT Technology Review [Internet]. MIT Technology Review. 2015 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.technologyreview.es/s/5252/los-cultivos-modificados-geneticamente-mediante-crispr-llegaran-al-mercado-en-cinco-anos>
54. Irizarry guash. La importancia de los exámenes de laboratorio clínico de rutina o de prevención – Laboratorio Clínico Irizarry Guasch [Internet]. Laboratorio clinico irizarry guash. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.milaboratoriopr.com/la-importancia-de-los-examenes-de-laboratorio-clinico-de-rutina-o-de-prevencion/>
55. Mayo clinic. Infección por VPH - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. Mayo clinic. 2018 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/hpv-infection/symptoms-causes/syc-20351596>
56. Mayo clinic. Infección por VPH - Diagnóstico y tratamiento - Mayo Clinic [Internet]. Mayo clinic. 2018 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/hpv-infection/diagnosis-treatment/drc-20351602>
57. OMS. Enfermedad por el virus de Zika [Internet]. Organización Mundial de la Salud . 2018 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
58. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis [Internet]. 2008 Aug [cited 2019 Apr 28];14(8):1232–9. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article.htm)
59. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. 2016 Jun 3 [cited 2019 Apr

- 28];65(21):543–6. Available from:  
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6521e1.htm>
60. Cabezas C, García P. Diagnóstico de la infección por el virus zika. An la Fac Med [Internet]. 2017 May 16 [cited 2019 Apr 27];78(1):89. Available from:  
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/13028>
61. Ministerio de Salud y Protección Social-Federación Médica Colombiana. Memorias Dengue [Internet]. 2012 [cited 2019 Apr 27]. Available from:  
[https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias\\_dengue.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_dengue.pdf)
62. Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera (Costa Rica) I, Avila ML. Diagnóstico clínico y de laboratorio del paciente con dengue [Internet]. Vol. 34, Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera; 1999 [cited 2019 Apr 28]. 33–41 p. Available from:  
[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100004](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100004)
63. enfermedades infecciosas fiebre amarilla Diagnóstico de Fiebre Amarilla GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD 2da. edición [Internet]. [cited 2019 Apr 27]. Available from:  
<http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000064cnt-01-guia-fiebre-amarilla.pdf>
64. del Pilar Crespo M, microbióloga B, Fundación Valle del Lili C. El diagnóstico viral por el laboratorio. 2000 [cited 2019 Jun 24];31:17. Available from:  
<http://www.redalyc.org/pdf/283/28331306.pdf>
65. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):439–44. Available from:



<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aag0179>

66. C BD. Revisión sistemática de la literatura sobre la efectividad de las pruebas de Ácido Nucleico (NAT) para la detección de los virus de hepatitis B, hepatitis C y Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en donaciones de sangre Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 25]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/Revisión-sistemática-nat-donaciones-sangre.pdf>
67. Garrido m. PCR [Internet]. PCR. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>
68. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Jun 25];8(4):234–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645596>
69. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS). [cited 2019 Jun 25]; Available from: [www.cggenetics.com](http://www.cggenetics.com)
70. De Biotecnología I. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO [Internet]. [cited 2019 Jun 25]. Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
71. ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY Dra. Nora Fernández-2007 [Internet]. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>
72. Inmunofluorescencia [Internet]. [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>
73. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. MA. influenza A H1N1 de origen porcino, metodos diagnosticos [Internet]. Vol. 58, Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia; 2010 [cited

2019 Jun 27]. 44–59 p. Available from:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112010000100005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112010000100005)

74. Rodríguez Iglesias M, Pernía AT. Capítulo 6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH [Internet]. [cited 2019 Jun 27]. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio\\_vih/documentos/Acceso\\_al\\_diagnostico/1\\_Diagnostico\\_en\\_ITS\\_VIH\\_Sida/b.Proceso\\_diagnostico/pruebas\\_dx\\_vih.pdf](https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/Acceso_al_diagnostico/1_Diagnostico_en_ITS_VIH_Sida/b.Proceso_diagnostico/pruebas_dx_vih.pdf)
75. Daniela Sandin M. METODOS DE ESTUDIO Y DIAGNOSTICO VIRAL [Internet]. [cited 2019 Jun 27]. Available from: <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 8.pdf>
76. Chertow DS. Next-generation diagnostics with CRISPR. *Science* (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):381–2. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aat4982>
77. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80- ) [Internet]. 2018 Apr 27 [cited 2019 Apr 27];360(6387):444–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aas8836>
78. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Supplementary Materials for Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* (80- ) [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 28];360:444. Available from: [www.sciencemag.org/content/360/6387/444/suppl/DC1](http://www.sciencemag.org/content/360/6387/444/suppl/DC1)
79. Orden BEATRIZ LONDOÑO SOTO L, Lucía Ospina Martínez M, Julio Muñoz Muñoz N, LUBÍN BURGOS BERNAL Secretario General G, Gonzalo López Casas J. LINEAMIENTOS TÉCNICOS Y OPERATIVOS PARA LA VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) [Internet]. Colombia; 2012 [cited 2019 Apr 27]. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Lineamientos\\_VPH.pdf](https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Lineamientos_VPH.pdf)

80. Navarre (Spain). Departamento de Salud. JJ. La efectividad de la detección precoz de enfermedades [Internet]. Vol. 30, Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud; 2007 [cited 2019 Apr 28]. 11–27 p. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272007000100002](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000100002)
81. Padilla JC, Lizarazo E, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Transmisión de las ETV en Colombia, 1990-2016 ARTÍCULO ORIGINAL. Biomédica [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 28];37(2):27–40. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37s2/0120-4157-bio-37-s2-00027.pdf>
82. GEOGRAFÍA Y SALUD EN COLOMBIA [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [http://www.lasalle.edu.co/site\\_vice-](http://www.lasalle.edu.co/site_vice-)
83. BES Boletín Epidemiológico Semana. Semana epidemiológica 1 [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
84. Rodriguez, Martha. Peña C. Manual tecnico para laboratorios clinicos republica de colombia [Internet]. Ministerio de Salud. 1997 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://es.slideshare.net/stejadac/manual-tecnico-para-laboratorios-clinicos-republica-de-colombia>
85. usuario. CAPÍTULO 5 Procedimientos de Laboratorio [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/4821/fichero/MEMORIA%252FCAPITULO+5.pdf>

