



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Técnicas diagnósticas basadas en sistemas CRISPR/Cas. CRISPR-Chip como ejemplo

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2026

Autor: David Ripoll Penadés

Modalidad: Revisión Bibliográfica

Tutor/es: Encarnación Rodríguez Cazorla, Juan José Ripoll Samper

A mi familia y a mis padres, por alentarme a escoger esta carrera y brindarme siempre su apoyo incondicionalmente.

A mi novia, que día a día me empuja a ser una mejor versión de mí mismo.

Y en especial a mi hermano, mi referente y mi mejor amigo. Una relación que la consanguinidad por sí sola no puede explicar. Gracias por creer siempre en mí.

Sin vosotros nada de esto habría sido posible, gracias a todos.



ÍNDICE

Glosario de abreviaturas	2
Resumen/Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. ¿Dónde nace lo que hoy conocemos como CRISPR?	4
1.2. Diversidad del sistema CRISPR	8
1.3. Adaptación del sistema CRISPR como técnica de ingeniería genética y CRISPR como herramienta diagnóstica	9
1.3.1. Adaptación a sistemas eucariotas	9
1.3.2. CRISPR como técnica diagnóstica	12
1.3.3. Tipos de técnicas diagnósticas	15
1.4. Ventajas de estos sistemas frente a tecnologías tradicionales (PCR)	21
2. Objetivos	22
3. Resultados y discusión.....	23
3.1. ¿Qué es CRISPR-Chip?	23
3.2. Aplicaciones que tiene actualmente CRISPR-Chip.....	26
3.2.1. Confirmación de la especificidad de CRISPR-Chip	26
3.2.2. Aplicaciones actuales de CRISPR-Chip	29
3.3. Ventajas de CRISPR-Chip frente a otros métodos diagnósticos	30
3.4. Limitaciones del sistema frente a otras plataformas diagnósticas	32
4. Conclusiones.....	35
5. Bibliografía	36

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Cas: CRISPR-associated proteins

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA: CRISPR RNA

dCas9: dead Cas9

dRNP: dead Cas9 ribonucleoprotein complex

DSB: rotura de doble cadena

dsDNA: DNA de doble cadena

gFET: transistor de efecto de campo de grafeno

HDR: reparación dirigida por homología

Indels: inserciones y deleciones

MBs: perlas magnéticas carboxiladas

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

NHEJ: unión de extremos no homólogos

PAM: Protospacer Adjacent Motif

sgRNA: single guide RNA

SNPs: Polimorfismos de Nucleótido Único

ssDNA: DNA monocatenario

tracrRNA: trans-activating CRISPR RNA

Resumen

La tecnología CRISPR/Cas constituye uno de los avances más revolucionarios de la biología molecular en las últimas décadas. Desde su descubrimiento como sistema inmunitario adaptativo en bacterias y arqueas, CRISPR ha transformado áreas como la ingeniería genética, la medicina y el diagnóstico molecular gracias a su elevada especificidad, facilidad de diseño y capacidad para reconocer secuencias génicas específicas. Su desarrollo ha permitido crear herramientas de edición genética cada vez más precisas y accesibles.

En este trabajo se revisa la historia del descubrimiento del sistema CRISPR y su adaptación para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Asimismo, se ofrece una visión general de las principales plataformas diagnósticas basadas en CRISPR desarrolladas actualmente, como SHERLOCK, DETECTR, NASBACC, FLASH y CRISPR-Chip, destacando su potencial como métodos rápidos, sensibles y específicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y genéticas.

Abstract

CRISPR/Cas technology represents one of the most revolutionary advances in molecular biology in recent decades. Since its discovery as an adaptive immune system in bacteria and archaea, CRISPR has transformed fields such as genetic engineering, medicine, and molecular diagnostics through its high specificity, programmability, and ability to recognize specific genetic sequences. Its development has enabled the creation of increasingly precise and accessible genome-editing tools.

This paper reviews the history of CRISPR discovery and its adaptation for biotechnological and biomedical applications. In addition, it provides an overview of the main CRISPR-based diagnostic platforms currently available, including SHERLOCK, DETECTR, NASBACC, FLASH, and CRISPR-Chip, highlighting their potential as rapid, sensitive, and highly specific methods for diagnosing infectious and genetic diseases.

1. Introducción

1.1. ¿Dónde nace lo que hoy conocemos como CRISPR?

En este Trabajo de Fin de Grado se desarrollará el fundamento biológico y tecnológico del sistema CRISPR, en qué consiste y cómo lleva a cabo su funcionamiento, y qué aplicaciones podría tener, en este caso, en el marco de las técnicas diagnósticas de diversas enfermedades.

En 1987, el Dr. Francis Martínez Mojica, microbiólogo en la Universidad de Alicante, estudiaba la calidad de las aguas en las salinas de Santa Pola cuando descubrió que, en el genoma de la bacteria *Haloferax mediterranei* (1), existían secuencias que se repetían en intervalos fijos. Además, descubrió que estas secuencias estaban separadas por segmentos de longitud similar a los que denominó *spacers* (2).

Casi quince años después, el grupo de investigación del Dr. Francis Martínez Mojica bautizó estas repeticiones como CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). No fue hasta el año 2007 que Rodolphe Barrangou (3) junto a más investigadores descubrió la naturaleza de estas regiones. Mediante análisis *in silico* de la bacteria *Streptococcus thermophilus* (utilizada en industria para hacer quesos y yogures), detectaron que el locus CRISPR estaba formado por las repeticiones palindrómicas no contiguas y, entre ellas, secuencias compatibles con DNA extraño a la bacteria. Mediante experimentos con esta bacteria y diferentes fagos, se crearon cepas mutantes resistentes a estos y, tras el experimento, se analizó su locus CRISPR para confirmar que, efectivamente, las bacterias habían asimilado parte del material genético de los fagos entre sus secuencias repetidas.

En paralelo, se descubren una serie de genes asociados a estas secuencias que codifican las proteínas Cas (*CRISPR-associated proteins*). Al principio se creyó que estaban involucradas en la reparación del material genético de la bacteria, pero tras inactivar dos de los genes que codificaban proteínas Cas (Cas5 y Cas7) se observó la pérdida de resistencia frente a los fagos, por lo que se concluyó que, efectivamente, estaban involucrados en los procesos de defensa bacteriana (3). En la figura 1 se muestran los componentes básicos de un locus CRISPR genérico. Ahora se detallará

la función de cada uno de los componentes del sistema y, posteriormente, se hará hincapié en su funcionamiento (4,5).

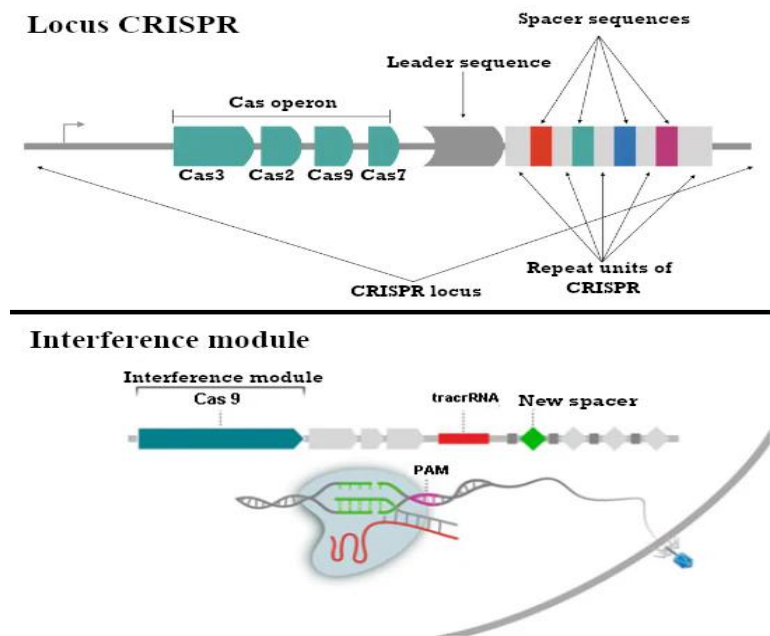


Figura 1: estructura del locus CRISPR y su fase de interferencia. Modificado de Chauhan et al. (2021) (6) y León (2019) (7).

- **Secuencia líder:** contiene los promotores para la transcripción de los RNA del complejo y dirige la incorporación de nuevos *spacers*.
- **Repeats:** normalmente palindrómicas y son secuencias cortas (entre 20 y 40 nucleótidos) que se repiten en el locus. Al ser palindrómicas, permiten que el RNA resultante forme estructuras de horquilla. Sirven como señales para el procesamiento del transcrito.
- **Spacers:** fragmentos del DNA viral provenientes de una infección previa a la bacteria.
- **Genes Cas:** codifican diferentes proteínas Cas.
- **crRNA (8):** la secuencia de *repeats* y *spacers* se transcribe completa (pre-crRNA) y contiene múltiples guías potenciales en una sola molécula. Sus *repeats* se pliegan formando estructuras de *stem-loops* (horquillas), estructuras secundarias de RNA que se forman cuando una secuencia de nucleótidos se aparea consigo misma. Estas sirven como señal de reconocimiento para las proteínas Cas y marcan dónde va a cortarse el pre-

crRNA. La proteína Cas procesadora de cada sistema se une al *stem-loop*, la coloca en el sitio catalítico y corta en un punto específico dentro del *repeat*. Tras este corte, cada unidad de crRNA maduro queda formada por el *spacer* completo y fragmentos de las repeticiones adyacentes a cada extremo.

- **tracrRNA** (9): es una cadena complementaria al crRNA que permite su reconocimiento por parte de la nucleasa. Eso es posible gracias a su estructura en *stem-loops* (horquillas). Estas tienen dos partes diferenciadas: el *Stem* (tallo), regiones complementarias y apareadas de RNA, y el *Loop* (bucle), una región sin aparear que conecta ambos extremos del tallo. Consta de 3 partes (Figura 2):

- Región *antirepeat* (anti-repetición): secuencia de nucleótidos que hibrida con el crRNA, con un tallo superior, uno inferior y *protuberancias* entre ambos (nucleótidos no apareados, similares a los bucles, que actúan como una bisagra molecular). Dan flexibilidad a la estructura del RNA y orientan correctamente el complejo para que la Cas9 pueda acomodar el tracrRNA en sus dominios
- Nexus: primera horquilla del tracrRNA, necesario para la actividad de interferencia del sistema, ya que interactúa con ambos dominios de la proteína y estabiliza la conformación activa de la nucleasa
- Región distal: conformada por un terminador rho-independiente con 2 partes. Primero, una o varias horquillas ricas en Guanina y Citosina, que estabilizan el segmento porque ambas bases se unen mediante 3 puentes de hidrógeno y ralentizan la RNA polimerasa. Después, una cola poli-uracilo en el extremo 3'. Como las uniones entre los pares U-A del RNA y del DNA son más débiles, cuando la RNA polimerasa se detiene tras el *stem-loop*, el tracrRNA se desprende fácilmente..

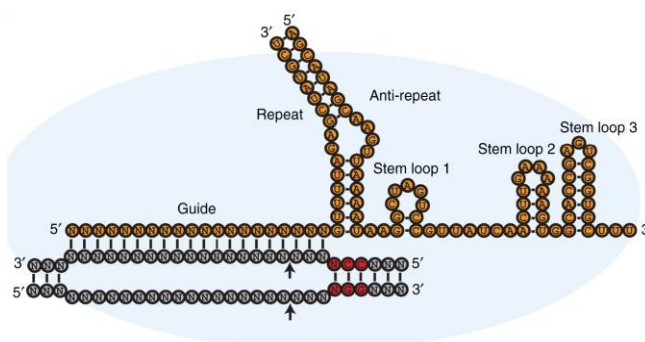


Figura 2: Estructura en dúplex del crRNA y el tracrRNA hibridados. Aquí se aprecia el dúplex crRNA-tracrRNA, con las regiones anteriormente descritas. Ambas moléculas de RNA hibridan y, aunque se trate de una imagen bidimensional, las horquillas contribuyen a que el dúplex adopte una estructura tridimensional que estabiliza la conformación activa de la nucleasa que produce la escisión del DNA vírico. Modificado de Mir et al. (2018) (10).

- **Proteínas Cas:** nucleasas codificadas por los genes Cas contiguos a la secuencia líder y son las encargadas de capturar el DNA viral para procesarlo como espaciadores (*spacers*), procesar el crRNA y cortar el DNA invasor. Contiene los dominios nucleasa HNH y RuvC (las dos regiones funcionales de la proteína Cas9 que cortan la secuencia de DNA diana y su complementaria, respectivamente) que son los encargados de producir una rotura de doble cadena. El primero corta la hebra de DNA no complementaria al RNA guía y el segundo la hebra de DNA complementaria al RNA guía, actuando gracias al reconocimiento de la secuencia PAM. Las de mayor uso en edición génica son Cas9, Cas12a y Cas13.
- **PAM (Protospacer Adjacent Motif):** es una secuencia corta de DNA que debe estar junto a la secuencia objetivo (*spacers*) para que las nucleasas corten el DNA viral. No está presente en el DNA bacteriano, sino que forma parte del material genético vírico y permite diferenciar el DNA propio del extraño para la bacteria, evitando la autólisis.

En los sistemas bacterianos, todos estos componentes actúan en un proceso dividido en 3 pasos:

1. **Adaptación (7):** la bacteria integra fragmentos del material genético del virus/fago que la infecta gracias al complejo Cas1-Cas2-Csn2. El complejo se compone por: la Cas1, que es la enzima integrasa (integra el nuevo *spacer* en el locus), la Cas2, un cofactor estructural para aportar mayor estabilidad y la proteína Csn2, la encargada de capturar el segmento de DNA.
2. **Expresión:** transcripción del locus por parte de la RNA polimerasa, procesamiento en pequeños RNA CRISPR (crRNA) y formación del complejo CRISPR/Cas. Para el procesamiento de pequeños crRNA maduros, el tracrRNA se aparea con las repeticiones del pre-crRNA; la RNasa III reconoce este último y procede al corte en fragmentos de crRNA con el *spacer* entero rodeado por *repeats*.
3. **Interferencia (7):** el complejo CRISPR/Cas reconoce y escinde la secuencia del DNA viral. Se pone el foco en la parte inferior de la Figura 1, donde se muestra el módulo de interferencia del sistema CRISPR/Cas9. El crRNA

(verde) es el encargado de reconocer la secuencia objetivo. El tracrRNA (rojo) forma un dúplex con *stem-loops*, reconoce la secuencia objetivo y, en una posición de 3 a 7 nucleótidos posterior al PAM, se produce la escisión del DNA. Al romperse dos enlaces fosfodiéster (uno por cadena), la hebra de DNA vírico pierde su función y se inutiliza (11).

1.2. Diversidad del sistema CRISPR

Los sistemas CRISPR (12,13) se dividen en dos grandes clases según la arquitectura de su complejo efector. La clase 1 comprende los tipos I, III y IV y es menos utilizada porque su complejo efector está formado por varias proteínas Cas, como el complejo Cascade que cuenta con cinco. Por otra parte, la clase 2 ha sido más explotada porque sus sistemas dependen de una única Cas y es más fácil experimentar con ellos. Se subdivide en los tipos II (Cas9), V (Cas12a) y VI (Cas13).

- Cas9

La herramienta más usada en ingeniería genética por su alta especificidad, facilidad de diseño y eficiencia. Su reconocimiento altamente específico permite desarrollar métodos diagnósticos que detectan mutaciones puntuales, variantes genéticas o secuencias patogénicas en muestras biológicas. Tiene especificidad para distinguir cambios de tan solo 1 nucleótido entre dos secuencias de material genético.

- Cas12a

También llamada Cpf1 (14), reconoce y corta dsDNA guiada por RNA, pero presenta una característica adicional que la distingue de Cas9: tras reconocer su secuencia objetivo, la proteína adquiere una actividad de corte colateral (15). Tras el primer reconocimiento de la secuencia diana, esta nucleasa corta indiscriminadamente moléculas de ssDNA cercanas. Esto ha permitido crear métodos diagnósticos como DETECTR o HOLMES, que se verán más adelante.

- Cas13

La proteína Cas13 (16) ha adquirido gran relevancia en aplicaciones diagnósticas. A diferencia de Cas9 y Cas12, que reconocen DNA, Cas13 se especializa en el

reconocimiento y degradación de RNA monocatenario. Cuando Cas13 reconoce su RNA objetivo, se activa y adquiere actividad de degradación colateral de RNA, similar a la observada en Cas12a con el ssDNA. Como con la Cas12a, gracias a esta propiedad se han desarrollado los métodos diagnósticos SHERLOCK y CARMEN-Cas13 que también aparecerán en puntos posteriores.

	Cas9	Cas12	Cas13
Tipo de sistema CRISPR	Tipo II	Tipo V	Tipo VI
Molécula diana	dsDNA	dsDNA + ssDNA	RNA
Tipo de actividad nucleasa	Corte específico de DNA	Corte de DNA + actividad colateral sobre ssDNA	Corte de RNA + actividad colateral sobre RNA
Reconocimiento de PAM	Sí	Sí	No requiere PAM
Ventaja principal	Alta especificidad para reconocer mutaciones puntuales	Alta sensibilidad por la actividad colateral	Muy útil a la hora de detectar RNA viral
Campo más destacado	Diagnóstico genético y microbiológico	Diagnóstico rápido de patógenos	Diagnóstico de infecciones virales

Tabla 1: Comparación de las tres proteínas Cas más usadas hasta la actualidad en diagnóstico clínico

1.3. Adaptación del sistema CRISPR como técnica de ingeniería genética y como herramienta diagnóstica

1.3.1. Adaptación de CRISPR a sistemas eucariotas

El sistema siguió siendo investigado hasta que dos nombres clave lo convirtieron en el inicio de la ingeniería genética CRISPR: Jennifer A. Doudna y Emmanuelle Charpentier. En su artículo junto a otros investigadores “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity” (2012) (17), demostraron que la proteína Cas9 es una nucleasa programable guiada por un RNA y que el

sistema podía reducirse a la propia nucleasa y a un solo RNA guía (sgRNA) sintético para la edición de un genoma eucariótico. Esto facilitó mucho su uso tanto *in vitro* como *in vivo* en el laboratorio. Estos descubrimientos y su impacto fueron las razones para que en 2020 fueran galardonadas con el Premio Nobel de Química.

- Adaptación del sistema CRISPR a un sistema *in vitro*

Para reconstruir el sistema fuera de la célula procariota (*in vitro*), se siguió este orden: se purificó la proteína Cas9, se sintetizaron artificialmente el crRNA y el tracrRNA y se mezclaron las nucleasas y el material genético en un tubo de ensayo. Tras esto observaron que el complejo Cas9-RNA cortaba exactamente la secuencia complementaria al crRNA.

Por tanto, se concluyó que tan solo los 3 componentes mencionados eran necesarios para el funcionamiento del sistema y que se podía prescindir de los demás factores bacterianos.

- Simplificación de crRNA + tracrRNA en single guide RNA (sgRNA)

Los investigadores estudiaron por separado las hebras de RNA: el crRNA contiene el *spacer* (región guía) de aproximadamente 20 nucleótidos y el *repeat*, derivado del locus CRISPR. Por otra parte, el tracrRNA se encargaba de 2 cosas: hibridar con el crRNA y formar una estructura secundaria que permite que la Cas9 se una y se active.

Bajo estas premisas nació el *single guide RNA* (sgRNA) (18), que combinaba ambas hebras en una sola molécula formada por 2 regiones:

- Región guía: corresponde al crRNA y es variable. Consta también de unos 20 nucleótidos y determina la secuencia de DNA que se cortará.
- Región estructural: es el símil del tracrRNA y es constante para la nucleasa que emplee el sistema.

Gracias a este avance se pudo trasladar la tecnología CRISPR a sistemas eucarióticos, incluidos plantas, animales y hongos. Ahora para diseñar el RNA necesario para cada sistema sólo era necesario cambiar 20 nucleótidos, facilitando la edición de genes de forma programable y sencilla.

En células eucariotas, tras la rotura de doble cadena del DNA mediada por el sistema CRISPR/Cas9 o Cas12, se activan internamente los mecanismos de reparación del DNA para reparar ese corte (19–21). Se pueden poner en marcha dos sistemas diferentes de reparación del material genético: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación dirigida por homología (HDR) (Figura 3)

- [illegible]

- 11 -

1.3.2. CRISPR como herramienta diagnóstica

En el campo del diagnóstico basado en CRISPR, el desarrollo de un producto suele seguir una serie de etapas que van desde la prueba de concepto (POC, *proof of concept*) hasta la obtención del producto final listo para su implementación clínica o comercial. Inicialmente, se identifican biomarcadores o secuencias diana relevantes y se diseñan sistemas CRISPR específicos (por ejemplo, Cas9, Cas12 o Cas13) capaces de reconocerlas con alta sensibilidad y especificidad. Desde las primeras fases de desarrollo, es fundamental que el diseño experimental, los procesos de validación y la generación de datos tengan en cuenta los requisitos establecidos por las agencias reguladoras, a fin de facilitar posteriormente la transferencia clínica y la aprobación del producto. Tras la validación analítica mediante ensayos *in vitro*, en los que se evalúan parámetros como sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y robustez, se avanza hacia el desarrollo del prototipo diagnóstico integrando formatos compatibles con aplicaciones clínicas o *point-of-care* (POC devices). Finalmente, el producto atraviesa estudios con muestras reales, procesos de escalado industrial, validación regulatoria y controles de calidad bajo estándares clínicos, culminando en la generación de una plataforma diagnóstica CRISPR apta para su comercialización y uso biomédico. El proceso diagnóstico general se desarrolla en las siguientes etapas:

I. Obtención y preparación de la muestra biológica.

Es el primer paso en toda prueba diagnóstica (23) y, dependiendo de qué se trate, se precisan unas u otras. Suelen ser hisopados naso/orofaríngeos, sangre o suero, saliva u orina o muestras fecales. Tras la recolección, es el turno del proceso de preparación o la extracción de ácidos nucleicos. Esto incluye la lisis celular o viral (para romper membranas celulares o cápsides virales), la purificación y la concentración del material genético.

II. Amplificación isotérmica del ácido nucleico diana (RPA o LAMP).

Puesto que la cantidad de material genético en la muestra puede ser muy baja para la detección de patologías, habitualmente se recurre a amplificaciones isotérmicas (a T^a constante) como RPA y LAMP. Con ello se amplifica la muestra (secuencia diana)

para poder así estar por encima de los límites de detección de la plataforma empleada en cada caso. (24)

- RPA (Recombinase Polymerase Amplification)

Técnica que se realiza a 37-42°C que requiere: cebadores, recombinasa, para que los cebadores se unan a la secuencia diana de DNA, y DNA polimerasa. Ocurre en 3 pasos: la recombinasa guía a los cebadores hacia la secuencia diana, los cebadores ocupan la doble hélice de DNA y la DNA polimerasa los extiende y sintetiza nuevas copias de DNA. Amplifica el DNA en pocos minutos y es ideal para pruebas diagnósticas rápidas.

- LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Técnica de amplificación de DNA ampliamente utilizada que se lleva a cabo entre 60 y 65 °C. Este método emplea entre cuatro y seis cebadores específicos que reconocen distintas regiones de la secuencia diana, junto con una DNA polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, capaz de sintetizar nuevas hebras de DNA mientras separa las cadenas previamente formadas. El proceso continúa de manera cíclica y eficiente, produciendo grandes cantidades de DNA amplificado en un período de tiempo relativamente corto.

- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

Técnica que trabaja a 41 °C y utiliza tres enzimas fundamentales: transcriptasa inversa, RNA polimerasa T7 y RNasa H. En primer lugar, la transcriptasa inversa sintetiza una cadena de DNA complementaria a partir del RNA diana; posteriormente, la RNasa H degrada el RNA original y se sintetiza una segunda cadena de DNA que incorpora un promotor para la RNA polimerasa T7. Finalmente, esta polimerasa produce múltiples copias de RNA a partir del DNA sintetizado. Será relevante más adelante.

III. Reconocimiento específico por el complejo CRISPR-sgRNA

El complejo formado por la proteína Cas del sistema y su RNA guía se une, o no (dependiendo de si contiene la secuencia diana) al material genético que se quiere analizar

IV. Activación de la actividad colateral en caso de que la nucleasa la posea

Cuando nucleasas como la Cas12a y la Cas13 se unen al ácido nucleico diana, desencadenan una actividad colateral que consiste en el corte indiscriminado de ácidos nucleicos monocatenarios. En el caso de Cas12, es ssDNA (*single-stranded DNA*, DNA monocatenario), aunque también se ha observado que provoca la degradación de moléculas de RNA. En el caso de Cas13, se trata de moléculas de RNA. En los sistemas diagnósticos se introducen moléculas reporteras artificiales diseñadas para ser cortadas por esta actividad colateral.

V. Liberación de la señal detectable (fluorescencia, flujo lateral o luminiscencia)

Las moléculas reporteras mencionadas anteriormente son un pequeño fragmento de DNA o RNA marcado con dos componentes: el fluoróforo (que emite luz) y el *quencher* (que apaga la señal fluorescente, también denominado supresor de señal). Con la molécula intacta el quencher inhibe la fluorescencia, pero, cuando la nucleasa corta el material genético, ambos componentes se separan y el fluoróforo emite luz. Las 3 vías más utilizadas son:

1. Fluorescencia: el corte produce una emisión de luz detectable mediante un fluorímetro, lo que permite una detección rápida y una medición cuantitativa.
2. Flujo lateral o *lateral flow assay*: es similar a un test de embarazo. Cuando la molécula reportera se corta, se liberan fragmentos que fluyen por una tira reactiva y aparecen bandas visibles indicando el resultado.
3. Luminiscencia: por el uso de reporteros que generan señales lumínicas mediante reacciones enzimáticas. Miden la luz con un luminómetro y ofrecen alta sensibilidad, pero los medios necesarios para llevarla a la práctica no son tan accesibles como la fluorescencia o el flujo lateral.

Bajo este principio se ha dado lugar a plataformas diagnósticas como DETECTR, SHERLOCK, HOLMES o CARMEN-Cas13, que suponen un gran avance por su alta especificidad y sensibilidad.

1.3.3. Tipos de técnicas diagnósticas

❖ Sistemas basados en Cas12a

➤ HOLMES (One-Hour Lowcost Multipurpose Highly Efficient System)

HOLMES (25) fue una de las primeras plataformas que explotó sistemáticamente la actividad colateral de Cas12a. A diferencia de DETECTR (ver más adelante), fue diseñada inicialmente para la detección de DNA genómico, la identificación de SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Único) y el genotipado rápido. Su flujo técnico es:

1. Extracción de DNA o RNA (si se trata de este último, primero deberemos realizar una conversión a DNA complementario o cDNA)
2. Amplificación previa (PCR o RPA)
3. Incubación con Cas12a
4. Activación colateral
5. Señal fluorescente

Se emplea para la identificación de mutaciones hereditarias, el diagnóstico viral experimental y la edición genética confirmatoria. Con la aparición de DETECTR o SHERLOCK, queda obsoleto. Su principal utilidad fue ser el precursor metodológico de las dos plataformas anteriores.

➤ DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter)

DETECTR (25) se basa en la nucleasa Cas12a. Puesto que posee actividad colateral tras corte hacia ssDNA, es capaz de escindir sondas reporteras marcadas con fluoróforo y quencher, lo que genera una señal detectable. Funciona de la siguiente manera:

1. Extracción de DNA o RNA (si se trata de este último, primero deberemos realizar una conversión a cDNA)
2. Amplificación isotérmica (generalmente RT-LAMP)
3. Incubación con complejo Cas12a-gRNA
4. Activación colateral
5. Lectura fluorescente o mediante tira de flujo lateral

Entre sus aplicaciones clínicas más destacadas se encuentran la detección de SARS-CoV-2, la identificación de VPH (16 y 18) y la detección de mutaciones puntuales oncogénicas. Es compatible con dispositivos portátiles y permite una lectura visual, pero tiene en su contra que requiere una amplificación previa del material genético en la mayoría de protocolos y existe riesgo de contaminación cruzada si no se integra en un sistema cerrado.

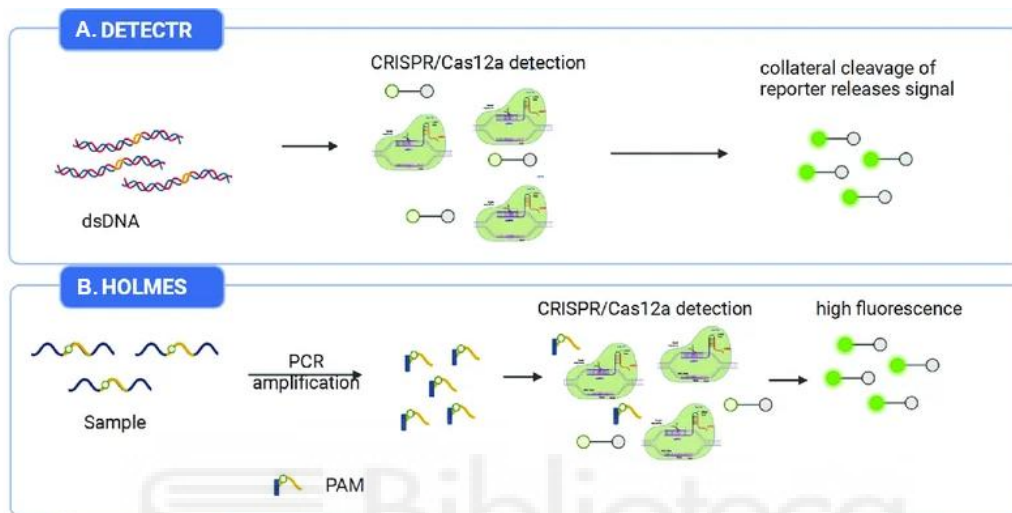


Figura 4: Representación de los métodos diagnósticos DETECTR y HOLMES.
Modificado de Zhu Y. et al (2023) (26).

❖ Sistemas basados en Cas13

➤ SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing)

SHERLOCK (25) se basa en Cas13 y, al igual que Cas12, produce actividad colateral tras corte hacia RNA presente en el último paso de la figura 5A. Esto permite la detección ultra selectiva de secuencias de RNA. Podemos describir su funcionamiento en 5 puntos similares a los descritos en la plataforma DETECTR:

1. Extracción del RNA
2. Amplificación isotérmica (RPA o RT-RPA)
3. Transcripción in vitro en caso de partir de DNA
4. Activación de la Cas13
5. Detección fluorescente o lateral

Resulta útil en el diagnóstico del virus Zika, Dengue o del SARS-CoV-2, la detección de variantes tumorales y la identificación de resistencia antimicrobiana alcanzando

una sensibilidad attomolar (10^{-18} moles/L). Vuelve a aparecer la necesidad de amplificación del material genético

- CARMEN-Cas13 (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids)

La combinación de CRISPR con enfoques de biología computacional ha dado lugar a sistemas de diagnóstico masivo como CARMEN–Cas13 (25). Su procedimiento es:

1. Cada muestra se etiqueta con un código fluorescente
2. Cada reacción Cas13-gRNA se encapsula en microgotas
3. Estas microgotas se combinan en una matriz digital
4. Se monitoriza la fluorescencia en cada micro reacción

De esta manera, se pueden evaluar más de 1000 combinaciones simultáneamente. Esto se emplea para la detección de múltiples virus respiratorios, vigilancia epidemiológica, identificación de variantes del SARS-CoV-2 y un diagnóstico diferencial masivo. Su mayor limitación es que requiere una infraestructura microfluídica, y que por eso mismo aún no es un sistema *point-of-care* como por ejemplo una PCR. microfluídica, y que por eso mismo aún no es un sistema *point-of-care* como por ejemplo una PCR.

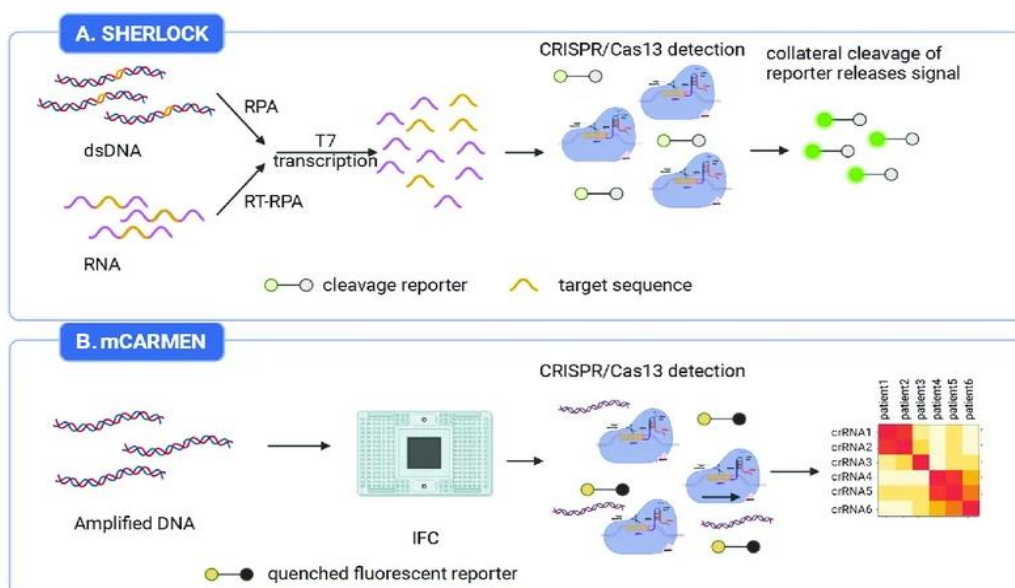


Figura 5: Representación de los métodos diagnósticos SHERLOCK y CARMEN-CAS13. Modificado de Zhu Y. et al. (2023) (26).

❖ Sistemas basados en Cas9

➤ NASBACC (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification-CRISPR Cleavage)

NASBACC (26) combina la amplificación isotérmica (NASBA) con la escisión mediada por la Cas9 solo en presencia de la secuencia PAM específica. Funciona de la siguiente manera:

1. Extracción de la muestra de DNA del paciente.
2. Amplificación isotérmica NASBA. Durante este proceso se generan copias de RNA que incorporan secuencias capaces de activar un gen reportero (*trigger*)
3. Introducción del complejo Cas9-sgRNA diseñado para reconocer específicamente la secuencia de RNA diana
4. Reconocimiento y corte. Si el RNA amplificado se corta ya no activa el reportero
5. Lectura de resultados mediante señal colorimétrica o fluorescente. A diferencia de otras pruebas, al contar con copias de RNA de genes reporteros, la detección de una señal colorimétrica o fluorescente indica un paciente sin el RNA diana.

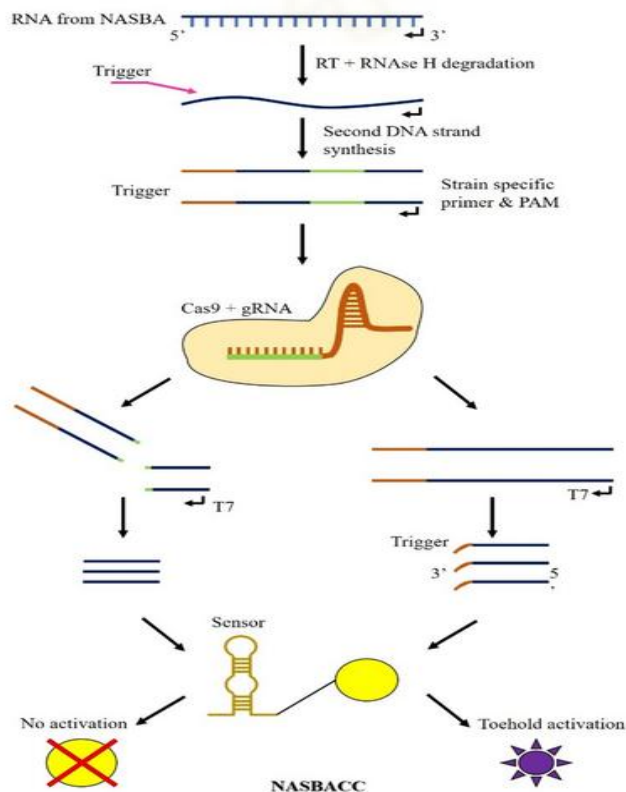


Figura 6: Funcionamiento del sistema NASBACC.

En la figura apreciamos el funcionamiento del sistema de una forma general.

Tras la amplificación mediante NASBA, el RNA generado contiene una secuencia *trigger* capaz de activar un sistema reportero. El complejo Cas9-gRNA reconoce y escinde específicamente las secuencias diana compatibles, bloqueando la activación del sensor. En ausencia de corte, la secuencia *trigger* permanece intacta y activa el sistema reportero, generando una señal detectable. Modificado de Pandya et al. (2024) (28).

- FLASH (Finding Low Abundance Sequences by Hybridization)

FLASH (28) es un método tecnológico desarrollado para enriquecer secuencias específicas de DNA presentes en muy baja abundancia en muestras complejas, como ocurre con los genes de resistencia antimicrobiana en muestras clínicas. Aprovechando la especificidad y programabilidad de la Cas9, se consigue un enriquecimiento dirigido de secuencias antes de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) (29).

La NGS es una tecnología moderna que permite leer simultáneamente el orden de los nucleótidos de millones de fragmentos de DNA o RNA. Fragmenta el material genético en millones de piezas, las secuencia en paralelo y, después, un ordenador reconstruye la secuencia completa. Se emplea para diagnosticar enfermedades raras o identificar mutaciones en el cáncer para terapias dirigidas.

FLASH tiene aplicaciones para detectar genes de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, alelos de resistencia en muestras de *Plasmodium falciparum* en sangre, detección de *mecA*, componente responsable de la resistencia en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *vanA* en *Enterococcus faecium*. Variantes posteriores, como FLASH-TB, se adaptaron para identificar genes de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*, directamente a partir de muestras de esputo. Presenta tres desventajas:

- Requiere NGS y, por tanto, no proporciona resultados directos en el *point-of-care*
- Requiere de equipamiento especializado como un secuenciador y la infraestructura bioinformática asociada
- El tiempo de procesamiento que, aunque ofrece un potente enriquecimiento, puede requerir varias horas

- dCas9

La dCas9 (deadCas9) es una variante catalíticamente inactiva de Cas9, carente de actividad nucleasa, pero que mantiene su capacidad de reconocer la secuencia diana a través de gRNA (30). Gracias a que esta proteína ya no corta, su única

actividad se basa en la unión específica a secuencias diana y abre espacio a nuevas estrategias, como la inhibición (CRISPRi) y la activación (CRISPRa) génicas, como se aprecia en la figura 7, así como en el desarrollo de métodos diagnósticos que no precisen el corte de la secuencia de DNA diana.

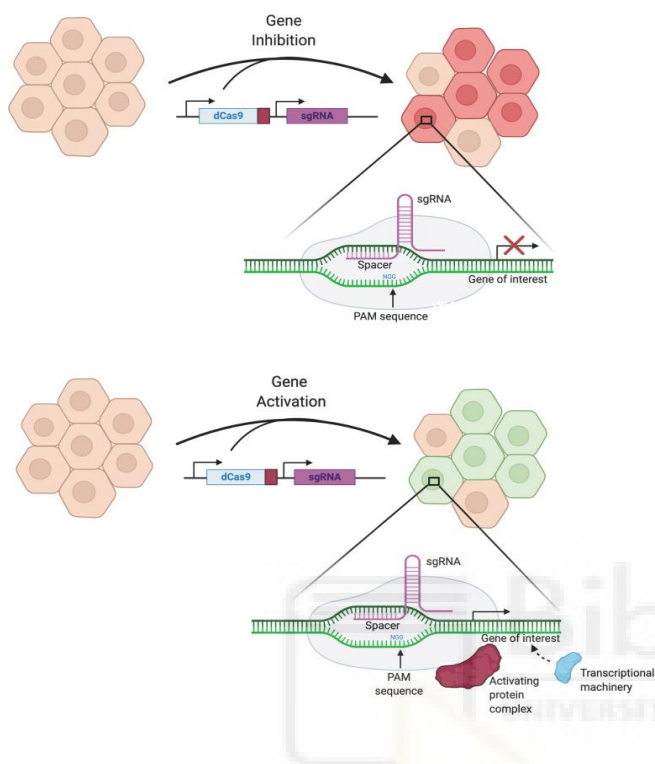


Figura 7: Presentación de la dCas9 y sus aplicaciones en la inhibición y activación enzimática.

En la parte superior se representa CRISPRi en 3 pasos. Primero, la formación del complejo sgRNA-dCas9, este se une, pero no corta el DNA. Después, el reconocimiento de la secuencia diana (gene of interest) por parte del espaciador de sgRNA y el PAM (en este caso NGG). N es cualquier nucleótido. Por último, ocurre el bloqueo de la transcripción debido a esta unión sin corte.

En la parte inferior queda detallada la CRISPRa, que funciona igual que la anterior, pero en este caso el complejo ha sido modificado para atraer factores de transcripción como VP64 o p65. Después del reconocimiento de la secuencia diana se recluta la maquinaria transcripcional y aumenta la expresión génica, activando así dicho gen. Reproducido de Balderstone et al. (2021) (31).

En 2017 se desarrolló una estrategia basada en dos moléculas de dCas9 fusionadas a fragmentos complementarios de la luciferasa de luciérnaga, un gen reportero ampliamente utilizado en ingeniería genética. Al reconocer regiones cercanas de una secuencia de DNA específica, ambos fragmentos se reconstituyen en la enzima completa y emiten luz como señal de detección. Esta técnica permitió identificar el DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, y destaca por su capacidad de diferenciar el DNA objetivo del no objetivo gracias a la necesidad de dos guías de RNA (gRNAs) simultáneas.

1.4. Ventajas frente a métodos diagnósticos convencionales (PCR)

Se procede a comparar la técnica PCR con las plataformas CRISPR (31). La PCR es actualmente el estándar de referencia en diagnóstico molecular. No obstante, los sistemas CRISPR presentan ventajas potenciales:

- Rapidez: las técnicas CRISPR pueden generar resultados en 30-60 minutos, mientras que la PCR requiere ciclos térmicos prolongados
- Menor equipamiento: algunos sistemas no requieren termocicladores complejos, ya que pueden combinarse con amplificación isotérmica o, en el caso de CRISPR-Chip, funcionar sin necesidad de amplificación
- Alta especificidad: la doble validación (complementariedad del gRNA + reconocimiento PAM) reduce la probabilidad de falsos positivos
- Portabilidad: tiene futuras posibilidades de integración en dispositivos *point-of-care* o tiras de flujo lateral
- Coste potencialmente inferior: podrían reducir la necesidad de infraestructura compleja y reactivos especializados

Aunque así expuestos, los sistemas CRISPR parecen superiores a la PCR; es cierto que en muchos ensayos requiere amplificación previa del material (DNA o RNA), no están clínicamente estandarizado y la sensibilidad de la prueba podría variar dependiendo del diseño del sgRNA, por lo que actualmente no son pruebas equiparables a la PCR.

Aun así, la tecnología CRISPR aplicada al diagnóstico representa una transición hacia sistemas moleculares más rápidos, programables y descentralizados. Una muestra de este potencial es el CRISPR-Chip, una novedosa técnica de diagnóstico que emplea la proteína dCas9 anclada a un transistor de efecto de campo basado en grafeno (o gFET, por sus siglas en inglés). Es un método que, además de no requerir amplificación, permite diagnosticar mediante la detección de cambios en la conductividad eléctrica en la superficie de un dispositivo. En la sección de Resultados y Discusión del trabajo, se analizará su funcionamiento, se desglosarán las ventajas que ofrece, las limitaciones que presenta actualmente y las posibles soluciones para estas.

2. Objetivos

- Analizar en qué consiste la novedosa tecnología de CRISPR-Chip, su infraestructura y materiales, cómo se integra el sistema CRISPR en el dispositivo para la detección de secuencias diana del DNA
- Desglosar las aplicaciones diagnósticas que tiene actualmente este sistema a partir de las investigaciones publicadas al respecto.
- Comparar las ventajas que ofrece CRISPR-Chip frente a otros métodos diagnósticos empleados en la actualidad, tanto los que usan tecnología CRISPR como los que no.
- Analizar las limitaciones que presenta actualmente el sistema CRISPR-Chip y las posibles soluciones propuestas.



3. Resultados y discusión

Toda la introducción pretende mostrar que la tecnología CRISPR no solo ha revolucionado el campo de la ingeniería genética, sino que también tiene un gran potencial como método diagnóstico de enfermedades y posiblemente haya dado inicio a una nueva etapa dentro de este sector. El impacto que puede tener en el diagnóstico, tanto de enfermedades infecciosas como genéticas, puede ser de gran calado. Además, la incorporación y combinación de estrategias de bioingeniería también ha ayudado a perfilar y enfocar estos diagnósticos de CRISPR.

Para esta revisión bibliográfica, y teniendo en cuenta la gran cantidad de trabajos o estudios que emplean CRISPR para el desarrollo de nuevos diagnósticos, he decidido enfocar esta sección de resultados en la elaboración y explicación del sistema CRISPR-Chip. Para ello, me he basado principalmente en estos tres artículos: “Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor” de Haijan R. et al. (32) , “CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases” de Kostyusheva et al. (25) y “Discrimination of single-point mutations in unamplified genomic DNA via Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor” de Balderston S. et al. (33). Todos los artículos y fuentes citadas en este trabajo han sido seleccionados empleando los métodos de búsqueda masiva de bases de datos en línea como PubMed, Science o Nature, así como en navegadores convencionales para extraer noticias e imágenes que se han empleado en este trabajo.

3.1. ¿Qué es CRISPR-Chip?

La tecnología CRISPR-Chip representa una innovación en el campo del diagnóstico molecular, ya que permite la detección directa de ácidos nucleicos sin necesidad de amplificación. Combina la tecnología CRISPR/Cas9 con dispositivos electrónicos basados en grafeno, una sustancia compuesta por átomos de carbono dispuestos en un patrón hexagonal regular. Es una estructura de carbono que no se representa como una molécula discreta, sino como una red extendida monocapa bidimensional

que, además de ser un compuesto biocompatible, tiene una alta conductividad eléctrica, que es la propiedad que explota este método diagnóstico.

Según el estudio de Haijan et al. (2019), este sistema se fundamenta en la inmovilización de la dCas9 mencionada anteriormente sobre un transistor de efecto de campo de grafeno (gFET).

- Se eligió la dCas9 y no una alternativa catalíticamente activa porque se busca que la Cas marque la secuencia objetivo, pero no la escinda para así detectar los cambios de conductividad en el grafeno en tiempo real.
- A su vez, se eligió el grafeno, y no otros materiales como el oro u otros conductores, para hacer el transistor por varias razones:
 - Puesto que el grafeno es una capa bidimensional de átomos de carbono, todo el material está en contacto con la superficie.
 - Es un material fino, flexible, compatible con la microelectrónica y tiene una alta conductividad y sensibilidad extrema a los cambios que se producen en su superficie. Esto lo convierte en un material idóneo para desarrollar dispositivos de biodetección. Por otro lado, es ideal para detectar cualquier cambio electrostático producido en su superficie debido a la interacción del DNA (que tiene carga negativa) con el complejo CRISPR/Cas

Como se muestra en la Figura 8, el gFET es un tipo de transistor en el que el flujo de corriente eléctrica se modula mediante un campo eléctrico, en lugar de por corriente directa, como ocurre en los transistores convencionales. En el contexto del sistema CRISPR-Chip, el grafeno actúa como compuerta conductora y como superficie de detección, permitiendo que la unión del complejo CRISPR/Cas al DNA diana genere cambios eléctricos medibles en tiempo real.

El gRNA y la proteína dCas9 forman un complejo denominado dRNP (deactivated RibonucleoProtein) que se ancla a la superficie del grafeno y que posteriormente reconocerá y se unirá a secuencias diana de DNA bicatenario presentes en la muestra. Esta interacción provoca cambios en la conductividad eléctrica del grafeno

y así se consigue traducir el evento de reconocimiento molecular en una señal electrónica medible que revela si el resultado de la prueba es positivo o negativo..

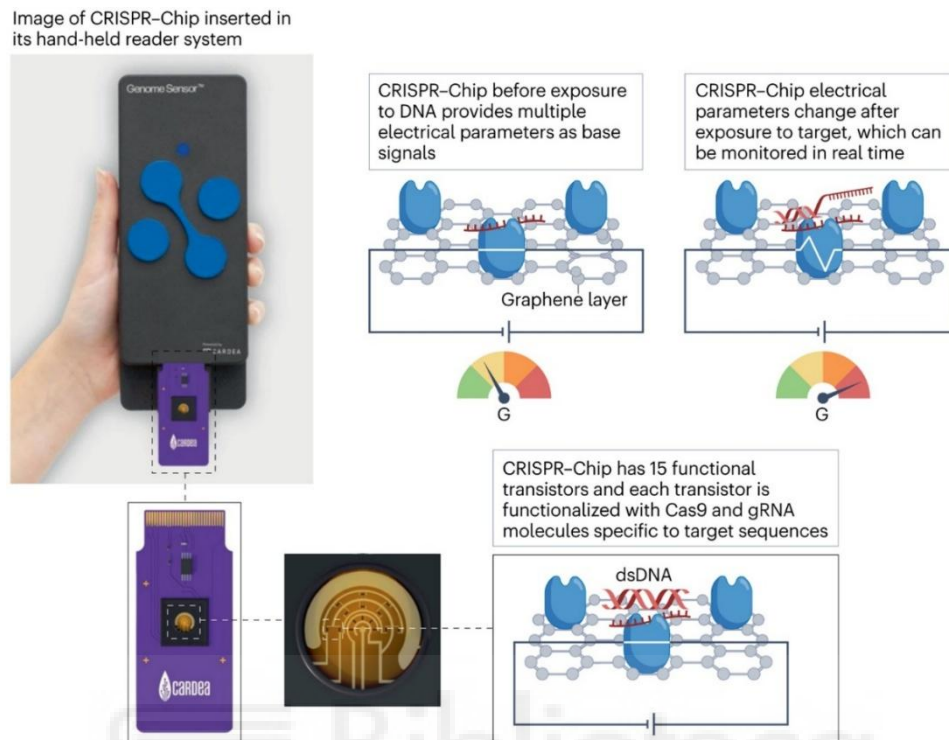


Figura 8: Tecnología CRISPR-Chip, con su hardware, sus sensores y su biología.

Reproducido de Kiara Aran y Brett R. Goldsmith (2024) (35).

El funcionamiento del CRISPR-Chip se basa, por tanto, en un mecanismo de transducción directa de la unión entre el complejo dCas9-gRNA y el DNA objetivo en una señal eléctrica, como se ve en la Figura 9. El propio dispositivo mide la corriente eléctrica o el voltaje producidos y lo traduce en una señal cuantificable en tiempo real que aparece como una curva o señal eléctrica.

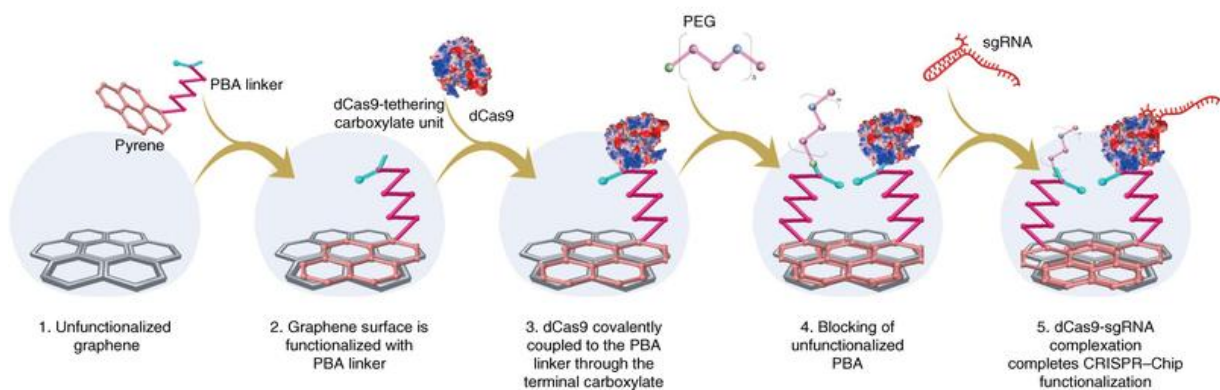


Figura 9: Esquema de la adhesión del complejo CRISPR-dCas9 al canal de grafeno y su funcionamiento. Modificado de Hajian et al. (2019) (33).

3.2. Aplicaciones que tiene actualmente CRISPR-Chip

3.2.1. Confirmación de la especificidad de CRISPR-Chip

Haijan et al. (2019) llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar la especificidad de la prueba y comparar su rendimiento con técnicas convencionales, como la prueba PCR (una prueba diagnóstica ampliamente validada en el sector sanitario), obteniéndose resultados favorables, como se verá más adelante.

Para evaluar la especificidad del sistema, utilizaron el gen *BFP* (*Blue Fluorescence Protein*, que codifica la proteína fluorescente azul como secuencia diana) y se hizo que el complejo dRNP fuera específico para él. Simultáneamente se empleó otro complejo dRNP control dirigido frente al gen *pcsk9*, no relacionado con el gen *BFP*. Ambos complejos se incubaron con 1800 ng de DNA del gen *BFP* y, posteriormente, se registraron las señales eléctricas (*respuesta I*) generadas por el dispositivo.

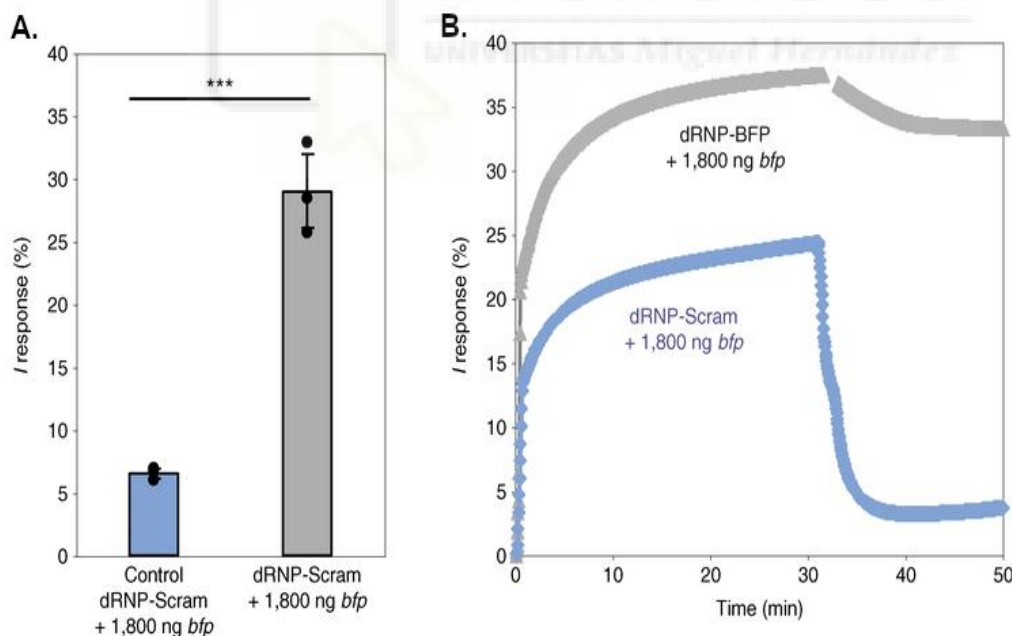


Figura 10: (A) Señal detectada (*respuesta I*) tanto en la muestra control como con el dRNP específico para el gen *BFP*, (B) curva tiempo-*respuesta I* de ambos dRNP (dRNP específico en color gris y dRNP control en color azul). Modificado de Haijan et al. (2019). (33).

Como se ve en la figura 10a, efectivamente la señal obtenida con el complejo dRNP específico fue mucho mayor que la generada por el dRNP control. Además, en la figura 10b vemos cómo rápidamente se distingue la respuesta en comparación con el control; el sistema es específico para el gen diana.

En un posterior experimento se evaluó el funcionamiento del sistema con muestras genómicas completas, para acercarse a una muestra tomada en un *point-of-care*. Para ello, primero se inmovilizó el complejo dRNP específico para el gen *BFP* sobre la superficie de perlas magnéticas carboxiladas (MBs). La dCas9 se unió covalentemente a las MBs para después bloquearlas e incubarlas con un sgRNA específico para el gen *BFP*. Se incluyó un control negativo para confirmar la especificidad de la unión del complejo a la secuencia diana.

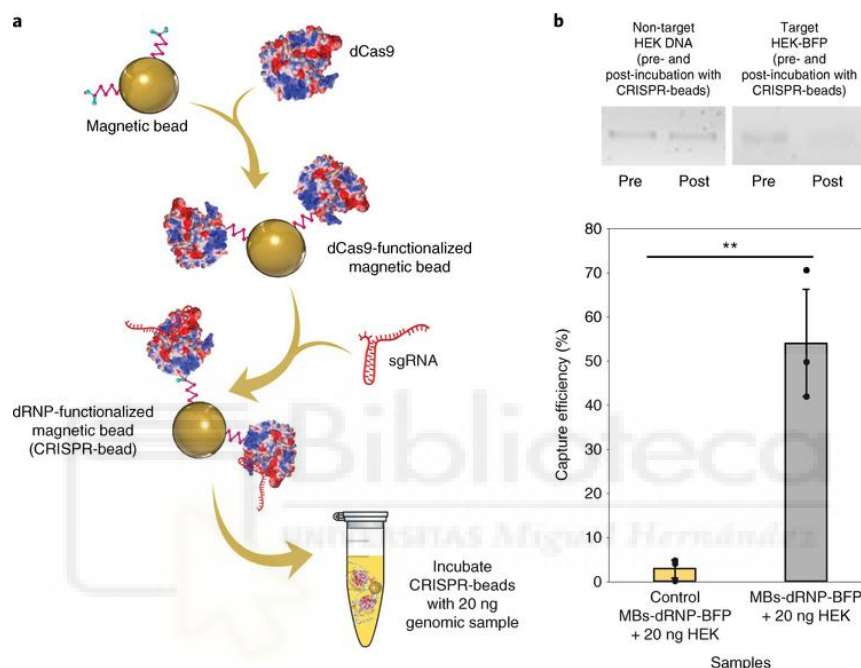


Figura 11: (a) Formación de CRISPR-beads. (b) Evaluación de la captura específica de DNA diana frente a DNA control procedente de células HEK. Reproducido de Haijan et al. (2019) (33).

Como se muestra en la figura 11b, el complejo dRNP presenta un ratio de captura de DNA mucho mayor en la muestra diana que en el control negativo, lo que confirma la especificidad del sistema frente a la secuencia objetivo.

Por último, llega el experimento donde se comparó el rendimiento de CRISPR-Chip con la prueba PCR. El procedimiento fue el mismo que el empleado previamente para evaluar la respuesta eléctrica del dispositivo (Figura 10a). En este experimento se llevaron a cabo varias pruebas:

1. Se procedió a analizar la intensidad de respuesta frente al gen diana *BFP*, así como frente a DNA control, procedente de células HEK.
2. Después, realizó una curva de calibrado que comparaba la señal emitida por el sistema con cantidades crecientes de gen *BFP* (gen diana). El resultado fue una respuesta con un aumento proporcional y un coeficiente de correlación elevado ($R^2=0,9702$) por lo que los resultados obtenidos fueron consistentes.
3. El tercer paso fue medir la respuesta *I* de CRISPR-Chip en muestras con la misma cantidad de gen *BFP*, pero combinada con distintas proporciones de DNA contaminante de células HEK. Las señales obtenidas fueron similares en seis muestras diferentes, por lo que la cantidad de DNA contaminante no es relevante para emitir resultados, el factor determinante es la cantidad de gen específico para la prueba.

Por último, como se aprecia en la Figura 12, se comparó la especificidad de CRISPR-Chip y PCR utilizando muestras con DNA diana puro (gen *BFP*) y muestras mezcladas con DNA contaminante.

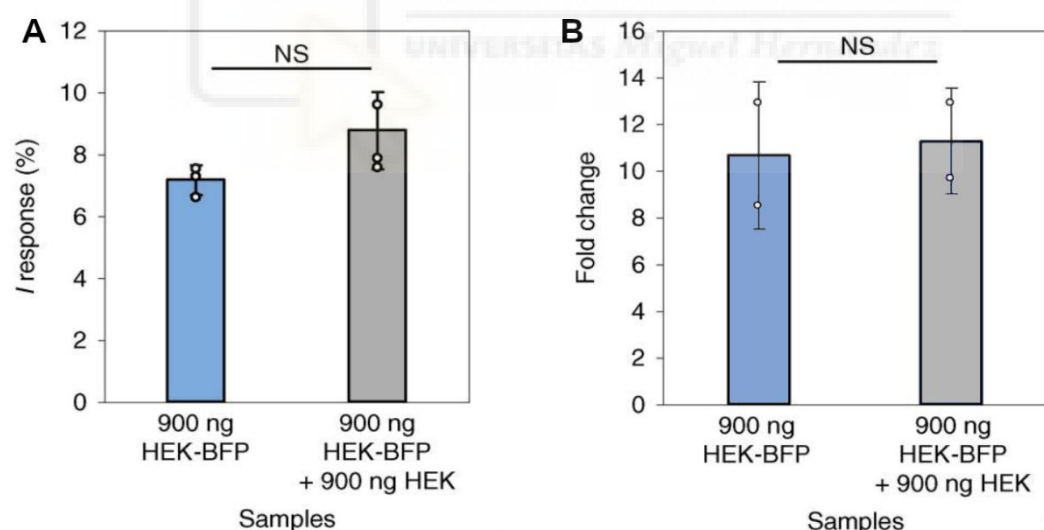


Figura 12: Experimento de comparación con la prueba PCR. Detección del gen específico (*BFP*) con el sistema CRISPR-Chip (A) y qPCR (B). En ambos casos no se observan diferencias significativas (NS) entre las muestras de DNA diana puro (barras en azul) y las mezcladas con DNA contaminante (barras en gris). Modificado de Haijan et al. (2019) (33).

Aunque los resultados se expresaron en diferentes unidades de medida, las diferencias obtenidas tanto en CRISPR-Chip (Figura 12A) como en qPCR (Figura 12B) se catalogaron como no significativas (NS), por lo que este último experimento

también fue un éxito y el DNA contaminante no alteró a la especificidad del complejo dRNP frente al gen diana (*BFP*).

3.2.2. Aplicaciones actuales de CRISPR-Chip

Bajo esta premisa, el equipo de Haijan R. et al. (2019) decidió buscar la primera aplicación clínica para el diagnóstico con CRISPR-Chip y se centró en la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la enfermedad neuromuscular más frecuente y grave en la infancia. Causa debilidad muscular progresiva por la falta de una proteína llamada distrofina.

Esta se manifiesta por una mutación ligada al cromosoma X en el gen de la distrofina. De los 79 exones que tiene el gen, las mutaciones más frecuentes se localizan en los exones 2-10 y 45-55. Hasta ahora, el diagnóstico de la enfermedad se basaba en la amplificación de DNA para identificar deleciones conocidas o en métodos combinados fundamentados en la medición de los niveles de creatina quinasa junto con pruebas genéticas (32).

A partir de estas regiones con mutaciones más frecuentes, el equipo creó sgRNAs específicos para los exones 3 y 51, y analizaron muestras genómicas de pacientes sanos y pacientes con deleciones conocidas en dichos exones. Los resultados mostraron que en muestras de pacientes sanos había un incremento de la señal producida por la unión del dRNP a las secuencias diana y, en muestras de pacientes que sufrían la enfermedad y se conocía la ausencia de dichos exones, el sistema no presentó cambios significativos en la señal tras la exposición a dichas muestras genómicas.

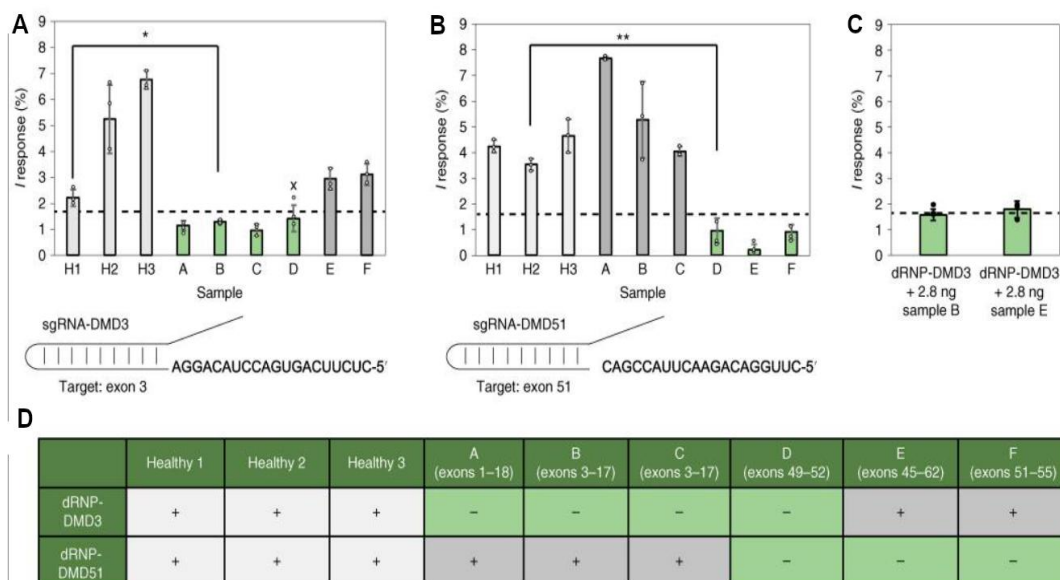


Figura 13: Pruebas para el diagnóstico de DMD empleando CRISPR-Chip. (A) Medición de la respuesta del sistema frente a 9 muestras analizadas con un dRNP específico para el exón 3. Hay un aumento en la señal (*respuesta I*) en las muestras con presencia de dicho exón. (B) Medición de la respuesta del sistema frente a las mismas muestras utilizando un dRNP específico para el exón 51. Se detecta un aumento en la señal (*respuesta I*) en las muestras con presencia de dicho exón. (C) Determinación del umbral de señal negativa. Se expuso dRNP específico para el exón 3 frente a muestras con concentración mínima de DNA, una carente de dicho exón (izquierda) y otra con él (derecha). El mínimo de señal de la primera muestra quedó como referencia de valor máximo de *respuesta I* que daba CRISPR-Chip en una muestra para la que no es específico. (D) Resumen de los resultados de las pruebas con ambos dRNP específicos. + indica la presencia del exón y – su ausencia. Modificado de Haijan et al. (2019) (33).

Por tanto, los resultados fueron favorables, demostrando que CRISPR-Chip es capaz de discriminar entre muestras con presencia o ausencia de exones específicos del gen DMD, mostrando su potencial como herramienta diagnóstica para la detección de mutaciones genéticas sin necesidad de amplificación previa.

3.3. Ventajas de CRISPR-Chip frente a otros métodos diagnósticos

CRISPR-Chip se ha situado como un método diagnóstico idóneo para distinguir polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) por su sensibilidad. Un ejemplo sería la DMD (anteriormente descrita) y, en estudios recientes, también se probó su eficacia para diagnosticar anemia falciforme (SCD) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) en linfocitos B comercialmente disponibles y extractos de un paciente sano y uno enfermo (homocigotos para el alelo que determina la enfermedad), respectivamente (33).

Además, como ya se ha mencionado antes, la principal ventaja que ofrece esta prueba ante los métodos diagnósticos ya existentes es que detecta secuencias específicas de DNA intacto, no requiere ni amplificación de la muestra ni sistemas de amplificación de la señal. Además, la rapidez del diagnóstico permite la activación de los protocolos oportunos tras el resultado diagnóstico, favoreciendo la prognosis. Debido a la sencillez de su uso e infraestructura, su impacto a nivel económico debe tenerse en cuenta. Para entender cuán ventajoso sería, se compararán los costes potenciales y personal necesario para realizar un diagnóstico con CRISPR-Chip con los costes que puede tener un diagnóstico basado en PCR

En primer lugar, la infraestructura necesaria, mientras que en CRISPR-Chip cada *point-of-care* tan solo necesitaría hacerse con el FET de grafeno presente en la figura 8 y su software para la lectura de señal. Para realizar una PCR se requiere un termociclador, material de laboratorio y trabajar en condiciones de esterilidad y, en caso de la qPCR, también requeriría la instalación y actualización del software pertinente. Tanto en costes como en el espacio que ocupa, disponer cada herramienta diagnóstica, CRISPR-Chip presenta un avance para los hospitales y centros de salud.

Seguidamente se encuentra el personal necesario para realizar la prueba. Mientras que para realizar una prueba PCR se necesitan facultativos y gente formada en laboratorio para realizarla obligatoriamente, CRISPR-Chip está configurado para que, en caso de haberse hecho un frotis sobre su superficie con la secuencia de material genético diana, producirse un cambio en la conductividad del transistor. El personal necesario para realizar la prueba e interpretar sus resultados sería equipo del hospital, sin necesidad de formación especializada, sino simplemente familiarizados con él.

Por último, el coste de cada operación. En la PCR se tiene en cuenta todo el material de laboratorio tales como los tubos de ensayo, las puntas de micropipetas y el equipo necesario para que los sanitarios puedan mantener unas condiciones de esterilidad en la sala y eviten la contaminación cruzada, mientras que en el CRISPR-Chip se precisa el diseño de un nuevo gRNA complementario a la secuencia de la enfermedad o infección que se quiera diagnosticar, unirlo a la dCas9 e inmovilizar este complejo en el FET para que este pueda detectar el material genético en la siguiente prueba.

3.4. Limitaciones del sistema CRISPR-Chip frente a otras plataformas diagnósticas

Aunque la implementación de CRISPR-Chip como plataforma diagnóstica tenga ventajas potenciales, también presenta limitaciones. Muchas de ellas se deben a su reciente desarrollo y a la escasa validación experimental y clínica hasta el momento, en comparación con otros métodos diagnósticos que emplean, o no, tecnología CRISPR. A día de hoy, todo lo relativo al diagnóstico infeccioso, especialmente demandado en los puntos de atención primaria o urgencias en hospitales o centros de salud, son posibilidades potenciales que aún no han podido llevarse a la práctica en el diagnóstico múltiple.

Desde el punto de vista técnico, la necesidad de que exista un triplete PAM junto a la mutación o secuencia que se quiera detectar para que se dé la interacción entre dRNP y DNA diana juega en su contra. La ausencia o la mutación de este sitio PAM puede dificultar el reconocimiento de la secuencia diana. Estas desventajas se podrían sortear mediante el uso de versiones dCas9 PAM-less (no dependientes de una secuencia PAM) recientemente desarrolladas (35). Por otro lado, al ser una plataforma diagnóstica diseñada para interaccionar con la doble hélice de DNA, si se quisiera diagnosticar enfermedades debidas a virus cuyo material genético está constituido por RNA (como la gripe, el Zika o el Dengue) el sistema no sería eficaz por la naturaleza de la proteína Cas (dCas9). Como alternativa, se podría reconfigurar el CRISPR-Chip con el uso de versiones desactivadas de la nucleasa Cas13 (cuyas dianas son moléculas de RNA). Por otro lado, también se podría llevar a cabo una conversión de RNA a DNA mediante retrotranscripción como en NASBACC (figura 6). Sin embargo, eso requeriría maquinaria adicional y alteraría el perfil de portátil, rápido y flexible que caracteriza a CRISPR-Chip. Por otra parte, la ausencia de amplificación puede ser una ventaja, pero en muestras con poco material genético, podría verse comprometida la sensibilidad de la prueba.

Por último, tanto su especificidad como su sensibilidad están aún por determinar. El poco uso que ha podido tener CRISPR-Chip hasta ahora es razón de ello, aunque guiándose por el empleo de la misma proteína Cas, podríamos esperar que CRISPR-

Chip alcance los niveles de ambos parámetros que poseen sus predecesores NASBACC y FLASH, que son sistemas que también emplean la Cas9.

Plataforma diagnóstica	Nucleasa empleada	Especificidad	Aplicaciones principales	Amplificación	Tiempo necesario	Tipo de diana	Señal que mide	Permite multiplexación
CRISPR-Chip	dCas9	Alta	Mutaciones genéticas y SNPs	NO	~15 min	DNA	Señal eléctrica	Limitada, potencialmente sí
NASBACC	Cas9	Resolución de 1 nucleótido	Diferencia cepas virales, mutaciones p.	Sí	90-120 min	RNA viral	Presencia o no de reportero	Limitada
FLASH	Cas9	Muy alta	Detección resistencia AB	Sí	Hasta 1 día	DNA	Señal de secuenciación (NGS)	Sí, alta multiplexación
DETECTR	Cas12a	Muy alta: cercana a PCR	SARS-CoV2, VPH, patógenos	Sí	30-45 min	DNA	Fluorescencia o flujo lateral	Moderada
SHERLOCK	Cas13	>99%: resolución de base única	Virus, bacterias y tumores	Sí	~90 min	RNA	Fluorescencia o flujo lateral	Sí
PCR tradicional	No usa nucleasa CRISPR	Muy alta: depende de cebadores	Diagnóstico molecular general	Sí	2-4 h	DNA	Amplificación detectada	Limitada
qPCR / RT-qPCR	No usa nucleasa CRISPR	Muy alta (>95-99%)	Diagnóstico clínico rutinario	Sí	1-3 h	DNA/ RNA	Fluorescencia en tiempo real	Sí, moderada-alta

Tabla 2: Tabla comparativa de diferentes métodos diagnósticos actuales

En la tabla 2 se ve que todos estos métodos diagnósticos son altamente selectivos y específicos, siendo los más utilizados la prueba PCR y qPCR. En cambio, CRISPR-Chip se diferencia de todas las otras plataformas en 2 aspectos: no requiere amplificación del material genético y eso se traduce en un ahorro de tiempo y dinero, llegando a obtener los resultados de la prueba en tan solo 15 minutos. En segundo lugar, evita problemas asociados a amplificaciones inespecíficas y posibles contaminaciones cruzadas derivadas de los procesos de amplificación en los centros de diagnóstico

Además, las limitaciones que presenta a día de hoy el sistema podrían ser superadas con más tiempo e investigación. Balderston et al. (2021) experimentaron con un ortólogo de la Cas9 que reconocía un sitio PAM diferente, ampliando la capacidad de detección del sistema.

En cuanto a las dificultades que podría plantear la escasez de material genético en algunas muestras, tan solo harían falta más tiempo e investigación para adaptar mejor CRISPR-Chip a matrices biológicas complejas como la saliva o la sangre, y como se ha mencionado anteriormente, la mejora de su especificidad y sensibilidad anclando más de un tipo de proteína Cas a la plataforma diagnóstica.

4. Conclusiones

La tecnología CRISPR ha supuesto una revolución en ingeniería genética por su versatilidad, programabilidad y adaptabilidad a los escenarios en los que se experimenta con ella. Además, la explotación de su perfil como plataforma diagnóstica marca el inicio de una era en el diagnóstico molecular. Los métodos diagnósticos que emplean tecnología CRISPR ofrecen ventajas frente a otras alternativas ampliamente validadas en el entorno clínico, como la prueba PCR, a pesar de que su estudio y aplicaciones sean propios de los últimos 10 años (mucho menor que el tiempo en el que se han desarrollado los métodos diagnósticos con los que compite).

Además de la especificidad, sensibilidad y versatilidad que ya ofrecen plataformas como SHERLOCK o DETECTR, CRISPR-Chip ofrece diagnóstico sin necesidad de amplificación del material genético en tiempos muy reducidos, suponiendo un avance de gran calado tanto para los puntos de atención primaria de hospitales y centros de salud como para el tratamiento y pronóstico de la patología en cuestión, ya que un diagnóstico precoz es de gran ayuda en el tratamiento de muchas enfermedades.

Aunque CRISPR-Chip se presente como una gran revolución, su reciente desarrollo acarrea consigo una serie de limitaciones. Su sensibilidad y especificidad en muestras con poco material genético se pueden ver comprometidas, se puede necesitar conversión a DNA en muestras de RNA, la necesidad de que exista un sitio PAM cercano a la secuencia diana para poder actuar y la imposibilidad de compararla actualmente parámetro por parámetro con la opción más común (PCR) en diagnóstico por no haber tenido aún las pruebas suficientes.

Aun así, todas estas limitaciones serán corregidas con el tiempo. El uso de proteínas Cas de diferentes tipos, como Cas12a o Cas13, ampliaría el abanico de muestras que podrían diagnosticarse, o la optimización de las proteínas Cas9 que ya se emplean en el sistema o la implementación de ortólogos de esta proteína.

La tecnología CRISPR, en especial CRISPR-Chip aún a un gran potencial en el ámbito del diagnóstico clínico y promete marcar un antes y después en este ámbito.

5. Bibliografía

1. Premios Fronteras [Internet]. 2017 [citado 22 de marzo de 2026]. Francisco Martínez Mojica, IX Premio Fronteras del Conocimiento en Biología y Biomedicina. Disponible en: <https://www.premiosfronterasdelconocimiento.es/galardonados/francisco-martinez-mojica/>
2. Antama F. Francis Mojica explica cómo fue el descubrimiento del sistema CRISPR [Fundación Antama]. Fundacion Antama [Internet]. marzo de 2021 [citado 22 de marzo de 2026]. Disponible en: <https://fundacion-antama.org/francis-mojica-explica-como-fue-el-descubrimiento-del-sistema-crispr/>
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. marzo de 2007;315:1709-12. doi:10.1126/science.1138140
4. Leenay RT, Beisel CL. Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. *J Mol Biol*. enero de 2017;429. doi:10.1016/j.jmb.2016.11.024
5. Liao C, Beisel CL. The tracrRNA in CRISPR Biology and Technologies. *Annu Rev Genet*. noviembre de 2021;55(1):161-81. doi:10.1146/annurev-genet-071719-022559
6. Chauhan DT. How does the CRISPR-Mediated Adaptive Immune System Work in Bacteria? Genetic Education [Internet]. noviembre de 2021 [citado 22 de marzo de 2026]. Disponible en: <https://geneticeducation.co.in/how-does-the-crispr-mediated-adaptive-immune-system-work-in-bacteria/>
7. León, Iván. AllScience [Internet]. 2019 [citado 22 de marzo de 2026]. CRISPR-Cas 9: ¿Qué es? ¿Cómo funciona? ¿Qué aplicaciones tiene? y ¿por qué es una técnica tan revolucionaria y controversial a la vez? Disponible en: <https://www.e-allscience.com/en/blogs/articulos/crispr-cas-9>
8. Li H. Structural Principles of CRISPR RNA Processing. *Structure*. enero de 2015;23. doi:10.1016/j.str.2014.10.006
9. Faure G, Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Crawley AB, Barrangou R, et al. Comparative genomics and evolution of trans-activating RNAs in Class 2 CRISPR-Cas systems. *RNA Biol*. 3 de abril de 2019;16(4):435-48. doi:10.1080/15476286.2018.1493331
10. Mir A, Alterman JF, Hassler MR, Debacker AJ, Hudgens E, Echeverria D, et al. Heavily and fully modified RNAs guide efficient SpyCas9-mediated genome editing. *Nat Commun*. julio de 2018;9. doi:10.1038/s41467-018-05073-z
11. Challa AK. Expansions on CRISPR-Cas9 Technology: Innovations for the Future. En: Wolyniak MJ, Pattison DL, Pieczynski JN, Santisteban MS, editores. *Introduction to CRISPR-Cas9 Techniques* [Internet]. Cham: Springer Nature Switzerland; 2025 [citado 21 de marzo de 2026]. p. 11-8. (Learning Materials in Biosciences). Disponible en:

https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-73734-3_2 doi:10.1007/978-3-031-73734-3_2

12. Haozhe R, 1. Haozhe R, Shiyuan L, Yiqing Y, Pengfei C, Ke W. Advances in the Application of CRISPR/Cas Systems in Molecular Diagnostics: Synthetic Biology and Engineering. *marzo de 2026*;4(2):10005-10005. doi:10.70322/sbe.2026.10005 L, Yiqing Y, Pengfei C, Ke W. Advances in the Application of CRISPR/Cas Systems in Molecular Diagnostics: Synth Biol Eng. *marzo de 2026*;4:10005-10005. doi:10.70322/sbe.2026.10005
13. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* *febrero de 2020*;18. doi:10.1038/s41579-019-0299-x
14. 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.* *abril de 2018*;360:436-9. doi:10.1126/science.aar6245
15. Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. *Biosens Bioelectron.* *octubre de 2020*;165. doi:10.1016/j.bios.2020.112430
16. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science.* *noviembre de 2017*;358. doi:10.1126/science.aag0180
17. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* *agosto de 2012*;337:816-21. doi:10.1126/science.1225829
18. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* *noviembre de 2014*;346. doi:10.1126/science.1258096
19. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *agosto de 2017*;18. doi:10.1038/nrm.2017.48
20. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *agosto de 2019*;20. doi:10.1038/s41580-019-0131-5
21. Jasin M, Rothstein R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* *noviembre de 2013*;5. doi:10.1101/cshperspect.a012740
22. Tian X, Gu T, Patel S, Bode AM, Lee MH, Dong Z. CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *Npj Precis Oncol.* *marzo de 2019*. doi:10.1038/s41698-019-0080-7
23. Huang Z, Fang J, Zhou M, Gong Z, Xiang T. CRISPR-Cas13: A new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Front Microbiol.* *octubre de 2022*;13:1011399. doi:10.3389/fmicb.2022.1011399

24. Zhou J, Li Z, Seun Olajide J, Wang G. CRISPR/Cas-based nucleic acid detection strategies: Trends and challenges. *Heliyon*. febrero de 2024;10. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26179
25. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, Kostyushev D, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods*. julio de 2022;203:431-46. doi:10.1016/j.ymeth.2021.04.007
26. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*. mayo de 2016;165. doi:10.1016/j.cell.2016.04.059
27. Pandya K, Jagani D, Singh N. CRISPR-Cas Systems: Programmable Nuclease Revolutionizing the Molecular Diagnosis. *Mol Biotechnol*. agosto de 2024;66:1739-53. doi:10.1007/s12033-023-00819-7
28. Quan J, Langelier C, Kuchta A, Batson J, Teyssier N, Lyden A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Res*. agosto de 2019;47. doi:10.1093/nar/gkz418
29. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Médica*. abril de 2020;61. doi:10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs
30. Balderston S, Clouse G, Ripoll JJ, Pratt GK, Gasiunas G, Bock JO, et al. Diversification of the CRISPR Toolbox: Applications of CRISPR-Cas Systems Beyond Genome Editing. *CRISPR J*. junio de 2021;4. doi:10.1089/crispr.2020.0137
31. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends Biotechnol*. julio de 2019;37:730-43. doi:10.1016/j.tibtech.2018.12.005
32. Hajian R, Balderston S, Tran T, deBoer T, Etienne J, Sandhu M, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*. marzo de 2019;3. doi:10.1038/s41551-019-0371-x
33. Balderston S, Taulbee JJ, Celaya E, Fung K, Jiao A, Smith K, et al. Discrimination of single-point mutations in unamplified genomic DNA via Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*. abril de 2021;5. doi:10.1038/s41551-021-00706-z
34. Aran K, Goldsmith BR. CRISPR quality control on a chip. *Nat Rev Bioeng*. febrero de 2024;2:194-5. doi:10.1038/s44222-024-00159-4
35. Christie KA, Kleinstiver BP. Making the cut with PAMless CRISPR-Cas enzymes. *Trends Genet*. diciembre de 2021;37. doi:10.1016/j.tig.2021.09.002