

CRISPR-Cas, el editor de genes

Daiana Macarena Ibáñez Alegre, Luis Daniel Mazzuocolo y Adriana Raquel Rinflerch

RESUMEN

El término CRISPR, por su acrónimo en inglés refiere a *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, es decir, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente esparcidas, por sus características en el genoma, pertenece naturalmente al sistema de defensa de bacterias y arqueas. Este ha sido adaptado biotecnológicamente para la edición del ADN de células eucariotas, incluso de células humanas. El sistema CRISPR-Cas para editar genes consta, en forma generalizada, de dos componentes: una proteína nucleasa (Cas) y un ARN guía (sgRNA). La simplicidad del complejo lo hace una herramienta molecular reprogramable capaz de ser dirigida y de editar cualquier sitio en un genoma conocido. Su principal foco son las terapias para enfermedades hereditarias monogénicas y para el cáncer. Sin embargo, además de editor de genes, la tecnología CRISPR se utiliza para edición epigenética, regulación de la expresión génica y método de diagnóstico molecular.

Este artículo tiene por objetivo presentar una revisión de las aplicaciones de la herramienta molecular CRISPR-Cas, particularmente en el campo biomédico, posibles tratamientos y diagnósticos, y los avances en investigación clínica, utilizando terapia génica con CRISPR/Cas más relevantes hasta la fecha.

Palabras clave: terapia génica, biotecnología, CRISPR, proteínas Cas.

CRISPR, GENE EDITOR

ABSTRACT

CRISPR are *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, which naturally belong to the defense system of bacteria and archaea. It has been biotechnologically adapted for editing the DNA of eukaryotic cells, including human cells. The CRISPR-Cas system for editing genes generally consists of two components, a nuclease protein (Cas) and a guide RNA (sgRNA). The simplicity of the complex makes it a reprogrammable molecular tool capable of being targeted and editing any site in a known genome.

Its main focus is therapies for monogenic inherited diseases and cancer. However, in addition to gene editor, CRISPR technology is used for epigenetic editing, regulation of gene expression, and molecular diagnostic methods.

This article aims to present a review of the applications of the CRISPR-Cas molecular tool, particularly in the biomedical field, possible treatments and diagnoses, and the advances in clinical research, using the most relevant CRISPR-Cas gene therapy to date.

Key words: gene therapy, biotechnology, CRISPR, Cas proteins.

Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2021; 41(1): 37-42.

INTRODUCCIÓN

El término CRISPR, por su acrónimo en inglés refiere a *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, es decir, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente esparcidas en el genoma. Son secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) palindrómicas cortas que se encuentran repetidas y agrupadas regularmente en una región del ADN de bacterias y arqueas. Intercaladas en estas secuencias repetidas, se encuentran unas secuencias espaciadoras que no son iguales entre ellas y que se corresponden con el material genético de fagos, virus que parasitan bacterias. Adyacente

a este *cluster* se hallan los genes Cas o genes asociados a CRISPR (*CRISPR-Associated Systems*) que codifican para enzimas nucleasas Cas. En la naturaleza, estos componentes CRISPR-Cas, presentes en bacterias y arqueas forman parte del sistema de defensa inmunitario frente a infecciones virales y plásmidos exógenos.

El mecanismo molecular básico es el siguiente: las secuencias CRISPR se transcriben a una sola hebra de ácido ribonucleico (ARN) al que se llamará ARN guía, que se combina con la proteína Cas formando un complejo. La porción repetida del ARN guía interacciona con la nucleasa Cas, y la porción espaciadora queda disponible para complementarse con el material genético viral. Así, cuando un fago inyecta su material genético en una célula bacteriana, este complejo CRISPR-Cas lo reconoce por la complementariedad de bases nucleotídicas del ARN guía y la proteína Cas realiza un corte en el material genético viral e impide la infección.

Hasta el año 2012, y gracias a los trabajos de Mojica y cols., solo se sabía que CRISPR se encontraba en el

Recibido: 2/02/21

Aceptado: 8/03/21

Laboratorio GIGA (D.M.I.A., A.R.R.), FCEQyN, Instituto de Biología Subtropical, Universidad Nacional de Misiones – CONICET. Servicio de Dermatología (L.D.M., A.R.R.), Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina

Correspondencia: adriana.rinflerch@hospitalitaliano.org.ar

genoma microbiano y que funcionaban como un sistema inmunitario frente a infecciones por fagos y material genético exógeno. Pero no se conocían con exactitud los mecanismos moleculares del sistema ni su potencial aplicación como herramienta molecular reprogramable en edición genética.

Este mecanismo bacteriano de reconocimiento específico de secuencias llamó la atención de los investigadores, quienes se cuestionaron si podría ser aplicado para reconocer, cortar y/o modificar ADN humano, en otras palabras, si podría ser capaz de editar genes humanos. Buscar respuesta a esta pregunta impulsó un arduo trabajo que luego fue publicado en 2012 en la revista *Science*, bajo el título “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity” cuyas autoras, Jennifer A. Doudna y Emmanuelle Charpentier, merecieron el Premio Nobel de Química en 2020. Ellas habían dilucidado los mecanismos moleculares del sistema CRISPR-Cas9 y lo habían reprogramado para ser dirigidos a la edición genética de sistemas eucariotas en condiciones de laboratorio. Estos hallazgos han reavivado las esperanzas tanto en la comunidad científica como en la sociedad en general, de tener a la mano una nueva alternativa biotecnológica simple, segura y económica. Estos descubrimientos marcaron un punto de inflexión en las investigaciones de biología aplicada, de tal manera que en los años subsiguientes hubo una explosión de trabajos científicos que aplican CRISPR para editar el ADN de cualquier célula eucariota.

El objetivo de este artículo es presentar una revisión del mecanismo molecular básico de la tecnología CRISPR, algunas variantes y sus potenciales aplicaciones como herramienta de terapia génica en el ámbito biomédico.

Tipos de sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas se clasifican según las estructuras de los genes Cas asociados a CRISPR. Se agrupan en clase 1 los tipos I, III y IV, y en la clase 2 los tipos II, V y VI. Cabe mencionar que la clasificación todavía no es definitiva debido a que se siguen descubriendo nuevas características y componentes Cas. La mayor diferencia entre ambos grupos es su complejidad: los de clase 1 son sistemas efectores multiproteicos que, ciertamente, los hacen restrictivos de ser aplicados en terapias, y dirigen el interés a los de clase 2 que están formados por una sola proteína.

Se han probado y empleado diferentes sistemas CRISPR-Cas en investigación para la edición genética, pero la más utilizada y conocida hasta el momento es CRISPR-Cas9 tipo II proveniente de *Streptococcus pyogenes* (spCas9). La misma consta de los componentes previamente descritos, una proteína Cas9 sumada a un ARN guía que reconoce por complementariedad de bases nucleotídicas la secuencia diana. Para que esta clive (o corte) el ADN requiere –además de dicha complementariedad nucleotídica– una secuencia específica en el sitio diana llamada

PAM (*Protospacer Adyacente Motif*). En el caso particular de la proteína spCas9, el PAM es de 3 nucleótidos NGG, donde N puede ser cualquier nucleótido.

En la naturaleza se encuentran variantes de las enzimas Cas más pequeñas que Cas9, lo que significa que facilita el empaquetamiento en vectores para terapia génica y acceso al ADN; sin embargo, la decisión de cuál nucleasa es la más adecuada para usar en edición génica reside también en el requerimiento de la secuencia PAM. Dicha secuencia es imprescindible que esté presente en el ADN diana puesto que interactúa con la proteína (interacción ADN-proteína) en la región contigua al sitio de contacto del ARN guía, por lo que este debe ser diseñado cumpliendo con esta condición. En general, las proteínas Cas más pequeñas tienen un PAM más largo; por lo tanto, una secuencia PAM de solamente 3 nucleótidos, requerida por Cas9, aumenta las probabilidades de ser encontrada en el genoma comparada con aquellas que requieren PAM de, por ejemplo, 4, 5 o 6 nucleótidos.

Como venimos viendo, la mejor candidata sigue siendo la Cas9 pero, debido al antemencionado tamaño de Cas9 y la dificultad para el empaquetamiento en vectores de terapia génica, para su posterior administración, se han desarrollado proteínas Cas9 sintéticas mediante bioingeniería, con el objetivo de lograr proteínas con menor tamaño, mayor fidelidad y mayor precisión, factibles de ser empleadas en terapia génica.

¿Cómo funciona CRISPR-Cas9 reprogramable?

El sistema CRISPR-Cas9 reprogramable está formado por un ARN guía simple o único (sgRNA, del inglés *single guide RNA*), que puede ser diseñado de manera sintética, y que dirige a la proteína Cas9 a una secuencia del genoma definido por los 20 nucleótidos del sgRNA. Una vez que el complejo Cas9-sgRNA encuentra la secuencia blanco, o diana, realiza un corte en ambas cadenas del ADN (Fig. 1). Anteriormente, las proteínas utilizadas para el mismo fin eran las TALENs, dedos de zinc, y antes de estas las meganucleasas. En todos estos casos, las proteínas deben ser diseñadas según la secuencia que se pretende modificar ya que el reconocimiento del ADN se produce mediante la interacción de los nucleótidos del ADN y los dominios de reconocimiento de la proteína, por lo que se transforma en un método laborioso y costoso para ser aplicado, comparado con el reciente descubrimiento del potencial de CRISPR. Es decir, a diferencia de las proteínas precursoras destinadas a edición génica, las proteínas Cas son versátiles debido a que su especificidad está dada por la secuencia del ARN con el que interactúa al formar el complejo efector y este es mil veces más sencillo de manipular. Una vez reconocido el sitio, y clivada la doble hebra de ADN, la reparación requiere la maquinaria propia de la célula, que puede activar cualquiera de dos posibles mecanismos: reparación de unión de extremos no homólogos, *NHEJ* (*Nonhomologous end joining*) o por reparación de

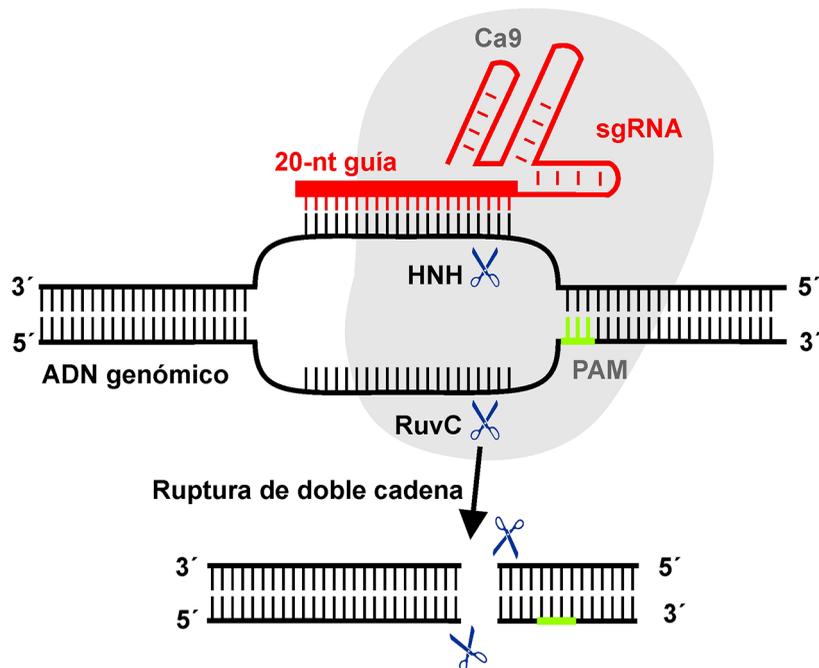


Figura 1. En el esquema se puede observar el sistema CRISPR/Cas9 reprogramado donde la proteína Cas9 (gris) unido al sgRNA (rojo) realiza una ruptura de doble cadena en un punto específico del ADN genómico. Nótese que la secuencia PAM se encuentra en el ADN diana, en la porción adyacente a la región complementaria de la hebra opuesta a la que se une el sgRNA.

alta fidelidad dirigida por homología *HDR* (*Homologous directed repair*). Este último utiliza un ADN donante con homología a la secuencia diana, lo que deriva en la reparación con modificaciones precisas en la doble cadena clivada por CRISPR-Cas.

Edición génica

Editar genes como las letras en un editor de texto, reemplazar, adicionar o eliminar nucleótidos ahora no tiene restricción. El desafío de aplicar CRISPR para editar el ADN ha llevado a buscar estrategias cada vez más refinadas a fin de eliminar los posibles efectos inespecíficos, es decir, cortes en secuencias que no queríamos cortar, que es uno de los mayores temores a los que nos enfrentamos al editar el genoma humano.

Se ha encontrado una alternativa en la *Cas nicking* (nCas9), una Cas que ha perdido la capacidad de cortar la doble cadena del ADN, como resultado de una mutación en uno de los dos sitios activos de la proteína. De esta manera, combinándola con enzimas desaminasas permite editar una única base en mutaciones puntuales, reemplazando citosina por timina o adenina por guanina.

Otra estrategia en estudio, para aumentar la especificidad, es trabajar con enzimas nCas9 con dos sgRNA que se posicionan en sitios proximales de la secuencia diana para así minimizar las probabilidades de que ocurran cortes no intencionales.

Edición epigenética

Numerosas enfermedades complejas como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, y algunas enfermedades raras, son causadas por alteraciones epigenéticas del ADN, es decir, no hay variaciones en la secuencia sino alteraciones estructurales que modifican la accesibilidad de la maquinaria de transcripción. Para estos casos se han diseñado complejos proteicos formados por una Cas9 que tiene el sitio catalíticamente mutado con el fin de inactivar su capacidad de cortar el ADN pero que conserva su capacidad de reconocer la secuencia diana mediante el sgRNA. En este caso, el complejo funciona como una plataforma que puede dirigir una variedad de proteínas capaces de modificar la epigenética, así como las acetilasas y metilasas hacia una región definida del genoma, con el objetivo de cambiar los patrones epigenéticos. De más está decir que es un arduo trabajo en procesos iniciales y para llegar a una terapia dirigida se requiere conocer los biomarcadores epigenéticos específicos de cada patología que incluso podrían ser personalizados.

Regulación de la expresión génica dirigida

La represión génica mediada por CRISPR se da por la interferencia estérica que provoca la fuerte unión de la proteína Cas *death* (dCas9) que impide el acceso de proteínas de unión al ADN necesarias para la transcripción,

como los factores de transcripción y el ARN polimerasa II. A este sistema se lo denomina CRISPRi, en referencia a la interferencia que genera. Además, si a este sistema se lo combina con dominios proteicos naturalmente represivos KrAB (*Krüppel Associated Box*), la represión se ve potenciada.

Contrariamente a la aplicación mencionada en el párrafo anterior, si se combina la proteína dCas9, a través de un péptido enlazador, con activadores transcripcionales potentes, eso se traduce en la inducción de la expresión génica. Además de la unión directa de dCas9 con efectores, hay estrategias que emplean sgRNA diseñados para reclutar y unirse a factores de transcripción con el fin de direccionar la transcripción de determinado gen.

CRISPR aplicado al diagnóstico de infecciones y otras enfermedades

Si bien CRISPR-Cas9 es el sistema más popular, existen otros sumamente interesantes que merecen atención. Los sistemas CRISPR de clase 2, tipo V agrupan enzimas que están siendo empleadas en investigación y desarrollo de métodos para el diagnóstico de infecciones por patógenos y otras enfermedades. Estas poseen algunas características en común, una de ellas es que requieren una PAM rica en timina (TTTN). Las proteínas más relevantes hasta el momento son las nucleasas Cas12a, Cas13 y Cas14, donde la primera y la última reconocen ADN mientras que la Cas13 reconoce ARN.

Lo interesante de estas enzimas (Cas12a, Cas13 y Cas14) es que poseen, además de la actividad específica, una actividad colateral que se desencadena posterior a la primera. La actividad específica hace referencia al reconocimiento de la secuencia diana dependiente de la complementariedad del ARN guía sumado a PAM. Sin embargo, la actividad colateral se da porque se habilita un bolsillo catalítico como consecuencia de un cambio conformacional que sufre la proteína posterior al corte específico del ADN diana. Este bolsillo activo corta indiscriminadamente todo material genético que esté presente a su alrededor, que puede ser ADN o ARN o ambos, doble y/o simple cadena, dependiendo de qué tipo de proteína Cas esté involucrada. Entonces, ¿para qué sería útil este comportamiento de la enzima si la desacredita para aplicarla en terapia génica? Es entonces cuando CRISPR aplicado al diagnóstico cobra relevancia. El diagnóstico molecular de ácidos nucleicos es, sin dudas, fundamental en medicina debido a la incidencia de enfermedades infecciosas reemergentes y a la problemática de la resistencia a antimicrobianos. En la actualidad, la técnica más utilizada para este fin es PCR (*Polymerase Chain Reaction* [Reacción en cadena de la polimerasa]) que, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, amplifica el material genético por detectar. Sin embargo, a pesar de su indiscutible sensibilidad y especificidad, este sistema requiere laboratorios y equipamientos de alto costo que

limitan su factibilidad, por ejemplo, cuando la demanda de diagnóstico es muy elevada, en caso de pandemias, o cuando existen infecciones endémicas en lugares de bajos recursos y/o alejados de los laboratorios centralizados. Por lo tanto, la necesidad de desarrollar técnicas de diagnóstico sensibles, rápidas, específicas y de bajo costo ha derivado en aprovechar la versatilidad y el fácil diseño del sistema CRISPR/Cas.

Recientemente, una *start up* argentina de base biotecnológica llamada CASPR Biotech ha desarrollado kits de detección de SARS-CoV-2 basados en CRISPR, además de virus tropicales epidémicos como los de dengue y Zika. El argumento de CRISPR diagnóstico es aprovechar la desmedida actividad colateral de las proteínas mencionadas para obtener una señal cuando en una muestra está presente la secuencia que se desea detectar. El sistema consta de la proteína Cas, el ARN guía programado para detectar una secuencia de interés y la adición también de un reportero. El reportero es un oligonucleótido diseñado unido a una molécula fluorescente por un extremo y, en el otro extremo, un inhibidor de la fluorescencia por proximidad. De esta manera, cuando el sistema reconoce la secuencia que se está buscando, la actividad colateral se enciende y corta el reportero que, ahora alejado del inhibidor de fluorescencia, emite una señal. Esta reacción tiene lugar en cuestión de minutos, es muy específica y de todo o nada, lo que significa que si hay una señal el resultado es positivo. En la figura 2 se esquematiza un protocolo de detección basado en CRISPR; nótese que dicho protocolo utiliza otras técnicas de amplificación llamadas RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*) y LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), las cuales no necesitan un termociclador para obtener el material genético amplificado.

Así como CRISPR puede ser utilizado para detectar patógenos o infecciones virales, también puede aplicarse para detectar alguna variante de enfermedades humanas o mutaciones causantes. La proteína candidata para esta última aplicación es la Cas14, una endonucleasa que no requiere secuencia PAM para su activación y que reconoce secuencias simples de cadena de ADN de una manera altamente específica, permitiendo discriminar variantes polimórficas de secuencias SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) con alta fidelidad.

APLICACIONES CRISPR DE INTERÉS EN MEDICINA

A continuación, algunos de los ensayos clínicos más relevantes que han utilizado CRISPR como terapia.

El primer ensayo clínico en terapia génica con CRISPR-Cas9 fue aprobado en China en el año 2016 para pacientes con cáncer de pulmón microcítico con metástasis, en los que la quimioterapia o la radioterapia habían fracasado. La terapia consistió en extraer los linfocitos de los pacientes

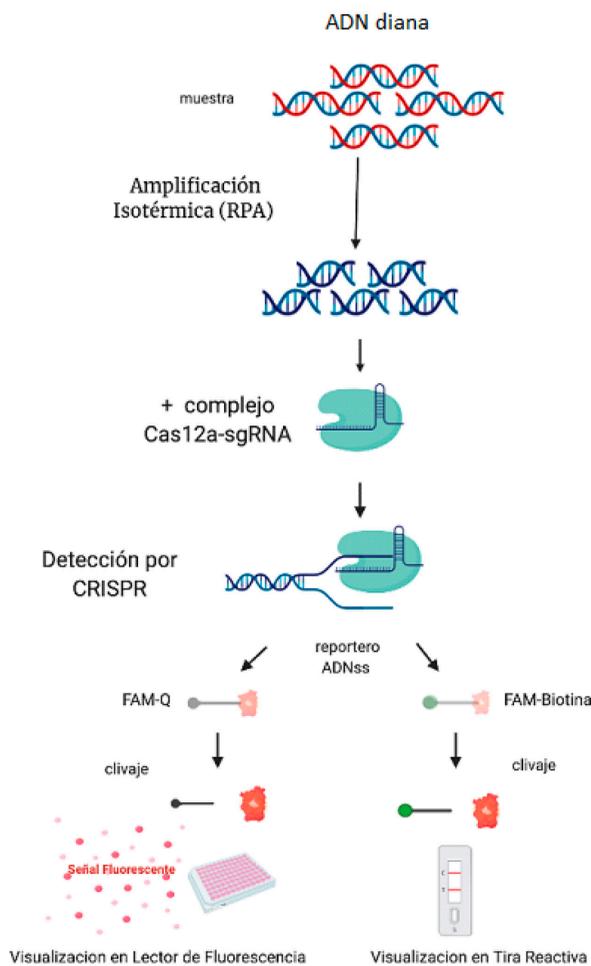


Figura 2. Esquema del protocolo de detección basado en CRISPR. Tomada de Curti y col., 2020.

y modificarlos con el sistema de edición CRISPR-Cas9 inactivando el gen que codifica para la proteína PD-1. En ausencia de PD-1 en los linfocitos, las células tumorales pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico para su destrucción.

En 2019 un grupo de investigadores presentaron los resultados de los primeros ensayos clínicos en pacientes que tenían leucemia linfoblástica, para tratar el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Utilizaron CRISPR-Cas9 para la edición del gen *CCR5* en células madre hematopoyéticas antes de ser trasplantadas al paciente. *CCR5* codifica para una proteína de membrana de linfocitos T y macrófagos que tiene un papel clave en la entrada del VIH en las células. Lo interesante de este trabajo es que intentaba dar solución a dos problemas en simultáneo. Si bien la cantidad de células modificadas no fue suficiente para obtener un efecto terapéutico para la infección, cabe destacar que se encontraron células *CCR5* modificadas hasta 19 meses después del trasplante. Los resultados demuestran que la tecnología CRISPR es lo suficientemente segura

como para ser utilizada en el ámbito clínico ya que, hasta el momento, no detectaron ningún cambio en el genoma ni efectos adversos asociados a la utilización de la técnica. También se encuentra en ensayos clínicos la edición múltiple de linfocitos T *ex-vivo* mediante CRISPR-Cas9 como terapia para algunos tipos particulares de cáncer.

Por otro lado, en un ensayo preclínico en dermatología se utilizó edición mediante CRISPR-Cas9 para el tratamiento de epidermólisis ampollosa distrófica recesiva. Esta condición se debe a una mutación en el exón 80 del gen *COL7A1* que codifica para una proteína colágeno que es clave en la unión de la epidermis con la dermis. Así, al eliminar el exón 80 de las células tratadas, obtuvieron colágeno funcional y se restituyó la adhesión de la epidermis a la dermis.

La primera terapia génica CRISPR *in vivo* está en fase I en este momento, y comenzó en el año 2019. El tratamiento se aplica a pacientes con amaurosis congénita de Leber. Esta es la principal causa de ceguera infantil y se debe a una mutación puntual en el gen *CEP290*, que conduce a la pérdida funcional de esta proteína, provocando defectos en los fotorreceptores de la retina y en consecuencia la pérdida de la visión. El tratamiento consiste en administrar directamente en un ojo el fármaco conocido como AGN-151587, un vector de adenovirus AAV5 con dos ARN guía para identificar la mutación, combinado con la secuencia codificante de la enzima Cas9 para restaurar la secuencia funcional del gen.

Otras aplicaciones

Los usos que se le pueden dar a la tecnología CRISPR se limitan con la capacidad de imaginación humana. Alrededor del mundo, cada grupo de investigación adecua la técnica para el estudio en su área de interés. Además de las aplicaciones generales mencionadas, existen otras que podrían responder a interrogantes actuales no resueltos. Por ejemplo, emplear CRISPR como herramienta para encontrar dianas terapéuticas en modelos tumorales celulares. Poder dilucidar rutas y moléculas implicadas en patologías con potencial terapéutico para tratar enfermedades. Utilizar tecnología CRISPR para producir enfermedades humanas en modelos animales más representativos a fin de estudiar la enfermedad para tratamientos más acertados. Mientras tanto, en ensayos preclínicos en animales, se está aplicando CRISPR para tratamiento de enfermedades como la sordera, la esclerosis lateral amiotrófica, la distrofia muscular, la hemofilia y la enfermedad de Huntington para las que ya existen dichos modelos.

Indirectamente, podrían erradicarse también enfermedades como la malaria, a través de modificaciones en el mosquito vector de la enfermedad. Además de su aplicación en estudios de enfermedades humanas, esta herramienta ha llegado a distintas áreas como agricultura y ganadería en las cuales algunos logros fueron evitar la oxidación de

Cuadro 1. Cuadro comparativo que resume las enzimas Cas mejor caracterizadas hasta el momento y de importancia en clínica e investigación

Tipo de Cas	Aplicación	Ejemplos de algunos potenciales terapéuticos
Cas9	Edición génica	<ul style="list-style-type: none"> - Editar o eliminar genes mutados en enfermedades de base genética (epidermolisis causada por mutación del gen COL71) - Eliminar genes virales incorporados al genoma humano (HIV, HPV) - Ingeniería genética para tratamientos de cáncer (cáncer de pulmón microcítico) - Desarrollo de modelos celulares con el objetivo de entender los mecanismos implicados en enfermedades cardíacas, metabólicas, neurológicas, entre otras
dCas9	Epigenética y regulación de la expresión génica	<ul style="list-style-type: none"> - Cambiar patrones de metilación causante de enfermedades (posible tratamiento en cánceres)
Cas12, Cas13, Cas14	Diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> - Kits de detección de SARS-CoV-2 y virus tropicales (dengue, Zika) - Plataforma de análisis genéticos para detectar mutaciones causantes de cánceres o para búsquedas de blancos terapéuticos

champiñones, retardar la maduración en frutas, generar cultivos tolerantes a agentes ambientales, producción de ganado con mayor masa muscular, entre otros.

CONCLUSIONES

Lo más sorprendente de esta tecnología es, sin dudas, la versatilidad de aplicaciones, el bajo costo y la fácil manipulación de la técnica. Por supuesto, estamos en los comienzos de embarcarnos en un compromiso por resolver enfermedades que anteriormente no tenían solución debido a su base genética. Indiscutiblemente para llegar a ello hay que aumentar los esfuerzos en investigación que garanticen la seguridad y efectividad de estos posibles tratamientos. Todavía queda mucho trabajo por hacer para entender todos los mecanismos implicados en la aplicación de

CRISPR como terapia, donde cada caso en particular debe ser evaluado y adecuado a las necesidades, sin perder el criterio ético que conlleva la idea de modificar el genoma de un ser humano.

Desde que se conoce CRISPR como una técnica fácilmente aplicable y accesible, la investigación en el campo está dando pasos agigantados, lo que nos hace pensar que la ingeniería genética ya no es una visión futurista, sino que debemos empezar a considerar el presente como una posibilidad donde aquella comience a ser aplicada al diagnóstico y especialmente en la medicina de precisión.

Agradecimiento: A Mariana Rapoport por el asesoramiento, diseño y la edición de imagen.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonafont J, Mencía Á, García M, et al. Clinically relevant correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Mol Ther.* 2019;27(5):986-99.
- Curti LA, Pereyra-Bonnet F, Repizo GD, et al. CRISPR-based platform for carbapenemases and emerging viruses detection using Cas12a (Cpf1) effector nuclease. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1140-1148.
- Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science.* 2018;362(6416):839-842.
- Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505-529.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-821.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533(7603):420-424.
- Xu L, Wang J, Liu Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(13):1240-1247.