

# Avances del CRISPR/CAS en relación con su aplicación en cáncer colorrectal

## Advances of CRISPR/CAS in Relation to its Application in Colorectal Cancer

Recibido: 21 enero 2022 | Aceptado: 27 febrero 2022

CARLOS ALBERTO GUZMÁN-SERRANO<sup>a</sup>

Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0431-8035>

SARA GUTIÉRREZ BOLÍVAR

Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3942-5685>

CAROLINA HERNÁNDEZ TEJADA

Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9158-8676>

ELIZABETH LONDOÑO-VELASCO

Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8137-2169>

### RESUMEN

En el mundo, el cáncer colorrectal (CCR) presenta una alta incidencia tanto en hombres como en mujeres, con una mortalidad del 9,4%. El estudio de diversos genes implicados como el *MSH3* y *MUTYH*, entre otros, al igual que las múltiples vías afectadas que predisponen su aparición, como la vía Wnt/APC/ $\beta$ -catenina, PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B y Ras/Raf, no solo han permitido el entendimiento de la fisiopatología para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CCR, sino que también han concedido el avance en el establecimiento de nuevas técnicas como CRISPR. Utilizando el sistema CRISPR/Cas, se ha logrado reconocer genes que se constituyen en blancos terapéuticos como *ZEB1*, *miR-139-5p* y *CCAT1*, entre otros; además de favorecer la comprensión de la acción de las proteínas CD133, CD166, FUT4 y FUT9 en los procesos de tumorigénesis, quimiorresistencia, invasión y proliferación celular en CCR. Estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado su posible efectividad terapéutica y diagnóstica, pero no hay suficientes ensayos clínicos que demuestren la aplicación de esta herramienta en humanos. Luego, los hallazgos identificados en esta revisión representan un avance importante hacia la aplicación a futuro del CRISPR como terapia génica en CCR en humanos.

### Palabras clave

CRISPR; cáncer colorrectal; terapia génica; tratamiento.

### ABSTRACT

Worldwide, colorectal cancer (CRC) has a high incidence in both men and women, with a mortality of 9.4%. The study of various genes involved such as *MSH3* and *MUTYH*, among others, as well as the multiple affected pathways that predispose their appearance, such as the Wnt/APC/ $\beta$ -catenin pathway, PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B and Ras/Raf; they have not only allowed the understanding of the pathophysiology for

<sup>a</sup> Autor de correspondencia: [carlosgs@javerianacali.edu.co](mailto:carlosgs@javerianacali.edu.co)

Cómo citar: Guzmán-Serrano CA, Gutiérrez Bolívar S, Hernández Tejada C, Londoño-Velasco E. Avances del CRISPR/CAS en relación con su aplicación en cáncer colorrectal. Univ. Med. 2022;63(2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed63-2.cris>

the diagnosis, prognosis and treatment of CRC, but they have also advanced the establishment of new techniques such as CRISPR. Using the CRISPR/CAS system, it has been possible to recognize genes that constitute therapeutic targets such as *ZEB1*, *miR-139-5p* and *CCAT1*, among others; in addition to favoring the understanding of the action of the proteins CD133, CD166, FUT4 and FUT9 in the processes of tumorigenesis, chemoresistance, invasion and cell proliferation in CRC. Studies in vitro and in vivo models have shown its possible therapeutic and diagnostic effectiveness, but there are not enough clinical trials that demonstrate the application of this tool in humans. Therefore, the findings identified in this review represent an important advance towards the future application of CRISPR as a gene therapy in human CRC.

#### Keywords

CRISPR; colorectal cancer; gene therapy; treatment.

## Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una entidad multifactorial con factores de riesgo genéticos y ambientales. Es una enfermedad comúnmente originada a partir de la proliferación de células epiteliales displásicas de la mucosa del colon y el recto, cuya principal presentación es el adenocarcinoma (1). Según GLOBOCAN 2020, el CCR es el tercer cáncer más diagnosticado en el mundo, con una incidencia del 10% (2). Su incidencia es mayor en hombres respecto a las mujeres, especialmente en países desarrollados, y a medida que el índice de desarrollo aumenta en cada país, también aumenta la incidencia del CCR (2). En cuanto a la mortalidad, el CCR se ubica en el segundo puesto, con aproximadamente 935000 muertes estimadas para el 2020; el cáncer de colon, en el quinto lugar, con el 5,8% de todas las muertes por cáncer, y el cáncer de recto, en el octavo puesto, con el 3,4% de todas las muertes por cáncer (2).

Anteriormente, con frecuencia, esta patología se asociaba con pacientes mayores de 50 años, pero ahora los reportes indican una mayor aparición en población joven y adultos menores de 40 años (3). Si bien se han descrito factores de riesgo como la presencia de algún familiar de primer grado con antecedente de CCR, que implica un riesgo de dos a cuatro veces mayor para la persona, el sobrepeso, el tabaquismo, la alta ingesta de carnes rojas y el sedentarismo

también se han identificado como posibles factores de riesgo, aunque no se detecta una causa particular para este cambio epidemiológico (4,5).

En Colombia, el CCR constituye la cuarta causa de mortalidad por cáncer, con una incidencia aproximada de 16 casos por cada 100000 habitantes para el 2021 (6). En su etiología, el componente genético desempeña un papel importante, pues más del 80% de todos los casos de adenomas son iniciados por mutaciones en el gen *APC* (*Adenomatous polyposis Coli*), lo que se constituye en el primer evento de desarrollo de adenocarcinomas, que corresponden al 98% de los casos de CCR. Además, las mutaciones germinales en genes de la vía de la reparación de mal apareamiento (MMR, por sus siglas en inglés) también están involucrados en la patogénesis del CCR hereditario no polipósico, lo que evidencia la predisposición genética y familiar en esta patología (7,8). En relación con el pronóstico, el estado del tumor es el factor más importante, y los procedimientos más empleados para la estadificación del CCR son ultrasonido endoscópico, escáner abdominal y exploración quirúrgica. En el caso de tumores bien diferenciados, la histología tumoral con estadio IV (cualquier T, cualquier N, M1), donde ya se muestra metástasis, permite determinar una sobrevida de cinco años. En cuanto al tratamiento, se puede clasificar como sistémico y localizado. Para el sistémico se encuentra disponible la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia dirigida, que se consideran en pacientes con enfermedad avanzada (9). El tratamiento local se refiere a las intervenciones dirigidas a la extracción del tumor: cirugía, ablación, embolización y radioterapia; estos se pueden emplear en cualquier estadio de la enfermedad (9,10).

Teniendo en cuenta la alta mortalidad y baja sobrevida del paciente con CCR, aun cuando se ha manejado con las terapias tradicionales ya mencionadas, se hace hincapié en la necesidad de enfoques terapéuticos alternativos que permitan abarcar la complejidad de los mecanismos genéticos moleculares y las limitaciones en

los tratamientos actuales para el CCR (11). Para ello se han propuesto las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, conocidas como CRISPR-Cas9 (CRISPR *associated protein 9*), por sus siglas en inglés, como una estrategia de terapia genética prometedora por su capacidad para desactivar genes mutados, reparar genes y regular la transcripción génica (12,13), aunque hasta la fecha no hay evidencia de estudios clínicos que lo corroboren.

Recientemente, datos de un ensayo clínico de fase I (diseñado para probar la seguridad y viabilidad) sobre los primeros pacientes con cáncer (dos con mieloma refractario avanzado y uno sarcoma metástasis) tratados con células T modificadas con CRISPR-Cas9 mostraron como resultado un injerto duradero de hasta nueve meses, con ediciones en tres *loci* genómicos (*TRAC*, *TRBC* y *PDCD1*) que potencian la capacidad de reconocimiento de las células tumorales para combatir las con la respuesta inmune reprogramada, y reportaron que no hubo reacciones negativas en ninguno de los tres tratados (14). Ello sugiere que la inmunogenicidad es mínima en las condiciones brindadas para el estudio y demuestra la viabilidad de la edición con CRISPR para la terapia del cáncer, especialmente en los casos de tumores sólidos que no responden a la inmunoterapia (14).

En cuanto al CCR, los estudios se han centrado en la experimentación *in vivo* en modelos murinos e *in vitro* en líneas celulares. Igualmente, se reportan distintas investigaciones sobre las cuales se observa un posible efecto benéfico de esta técnica para combatir el CCR. Por ello, el objetivo de esta revisión de tema es brindar una descripción genética y molecular del CCR e identificar los avances del CRISPR/Cas en relación con su aplicación diagnóstica y posible potencial terapéutico en el CCR, de acuerdo con la literatura publicada en español e inglés entre 2014 y 2021 en las bases de datos de PubMed, Web of Science, SciELO y Google Scholar, con los términos CRISPR-Cas9, *cáncer*, *cáncer colorrectal* y *terapia génica*.

## Genética molecular del cáncer colorrectal

La predisposición genética del CCR es del 6% al 10% cuando se asocia con mutaciones de línea germinal de penetrancia alta, que corresponde en el 70% de los casos a mutaciones somáticas (8,15). Ahora bien, la expresión de estas mutaciones permite identificar la histología tumoral y los fenotipos moleculares que van a permitir orientar el diagnóstico y el tratamiento. De acuerdo con lo anterior, a continuación se mencionan los síndromes hereditarios de CCR.

Los síndromes hereditarios del CCR se dividen fenotípicamente en síndromes con y sin poliposis, según el número y la histología de los pólipos colorrectales (16). Los síndromes hereditarios asociados con pólipos, a su vez, se dividen en adenomatosos y hamartomatosos. Dentro de la clasificación de síndromes adenomatosos, existe la poliposis adenomatosa familiar, con un patrón de herencia autosómico dominante y vinculada con variantes patógenas de la línea germinal en *APC* (8,17); además, se asocia con tumores en el tracto gastrointestinal superior y manifestaciones extraintestinales, como cáncer papilar de tiroides (18, 19). Asimismo, está la poliposis asociada a la corrección de lectura de la polimerasa, causada por variantes patógenas en los dominios de exonucleasa de *POLE* (*DNA Polymerase Epsilon*) y *POLD1* (*DNA Polymerase Delta 1*), que tienen un patrón de herencia autosómico dominante (20).

En cuanto a la poliposis asociada a *MUTYH* (*MutY DNA glycosylase*), de patrón autosómico recesivo, el 93% corresponde a mutaciones Y179C y G396D. Así, tienen un riesgo mayor para CCR los portadores monoalélicos de Y179C, comparado con los portadores de G396D (21). No obstante, también encontramos la poliposis mixta, cuya causa genética viene de variantes de la línea germinal de *GREM1* (*Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist*), implicada en la secreción de la proteína Gremlin, particularmente identificada en poblaciones suecas y de descendencia judía asquenazí (20). También está la poliposis serrada, dada principalmente por mutaciones de la línea

germinal en el gen supresor de tumores *RNF43* (*Ring Finger Protein 43*), así como las mutaciones en los genes *GREM1* y *MUTYH* (22,23).

Respecto a los síndromes de poliposis hamartomatosa, estos exhiben un patrón de herencia autosómico dominante e incluye el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de poliposis juvenil y los síndromes tumorales *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*) (8). El primero se debe a variantes en la línea germinal y se asocia con cáncer del tracto gastrointestinal superior, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer del cordón sexual (24). El síndrome de poliposis juvenil se da por variantes en *BMPRIA* (*Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A*) y *SMAD4*. Por último, los síndromes tumorales *PTEN* se asocian con variantes de la línea germinal *PTEN*, que tiene múltiples fenotipos y, por tanto, heterogeneidad clínica, que se puede presentar a manera de hamartomas gástricos y colorrectales, pólipos hiperplásicos, lipomas y ganglioneuromas, entre otros (8,25).

Aunque los síndromes del CCR asociados con fenotipos de poliposis son los más fáciles de reconocer, la gran mayoría de los individuos afectados por la predisposición genética al CCR no presentan pólipos múltiples (8). Los síndromes no asociados a poliposis se subclasifican según el fenotipo molecular del tumor: deficiente en la reparación de errores de apareamiento del ADN (MMR-d) o proeficiente (MMR-p) (8). Dentro de las mutaciones en MMR-d está el síndrome de Lynch, relacionado con variantes en la línea germinal o epimutaciones en los genes de reparación de errores de apareamiento del ADN: *MLH1* (*MutL Homolog 1*), *MSH2* (*MutS Homolog 2*), *MSH6* (*MutS Homolog 6*) y *PMS2* (*Postmeiotic Segregation Increased 2*), siendo estas últimas las más prevalentes en la población general (26). En cuanto al componente MMR-p, el riesgo de padecer CCR disminuye el doble y solo se ha mostrado asociación con el gen *RPS20* (*Ribosomal Protein S20*), por la alta penetrancia de sus mutaciones (8,27).

Actualmente, estudios de secuenciación genómica a gran escala han identificado otros genes que con poca frecuencia mutan en CCR esporádico y revelan la alta heterogeneidad

genética inter- e intratumoral en tejidos cancerosos (28). Por ello, los modelos de progresión de genes se están reemplazando por modelos orientados a las vías de señalización desreguladas en CCR.

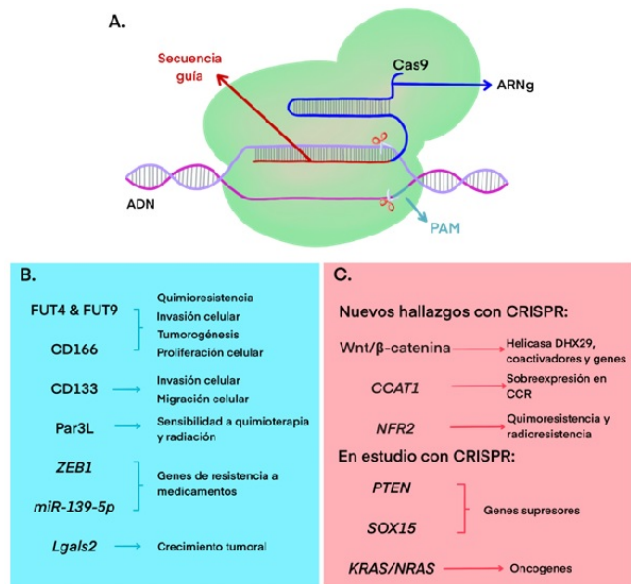
Se han encontrado múltiples vías de señalización importantes en la proliferación, metabolismo, diferenciación, supervivencia celular y rutas de apoptosis, que, cuando se encuentran alteradas, generan mayor susceptibilidad al CCR. Algunas de las vías relacionadas son Wnt/APC/ $\beta$ -catenina, PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y Ras/Raf (15). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la que se afecta más frecuentemente en el CCR esporádico (15), y se ha observado que la hiperactivación de esta vía contribuye tanto al inicio como a la progresión del CCR, relacionándose con múltiples causas, como mutaciones en la proteína APC y AXIN (29, 30). Asimismo, otra vía involucrada en el desarrollo del CCR, tanto esporádico como hereditario, es la de PI3K/AKT/PTEN, que puede encontrarse disfuncional o hiperactiva y es responsable de múltiples actividades celulares, como la activación del crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis, diferenciación y migración celular (15).

Respecto a la vía del NF- $\kappa$ B, esta se correlaciona con el CCR, debido a su papel en los mecanismos de proliferación, inflamación celular y angiogénesis, que favorecen el desarrollo tumoral (31). Por otra parte, la vía de señalización Ras/Raf, implicada en procesos de fosforilación de proteínas (15, 29), favorece procesos de proliferación celular, supervivencia prolongada, angiogénesis, evasión apoptótica y metástasis, que llevan a la transformación celular maligna y progresión tumoral (29).

Existen muchas otras vías relacionadas con el desarrollo de esta enfermedad de menor forma. Sin embargo, conocer las vías de señalización más importantes involucradas en el desarrollo del CCR y cómo estas se asocian resulta de suma importancia, debido a que se logra comprender el inicio y la progresión de esta patología, para lograr relacionarlo con el desarrollo de posibles terapias, pronósticos y respuestas a tratamientos.

## CRISPR como herramienta de edición génica

El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta prometedora de edición del genoma que tiene potencial terapéutico contra los trastornos genéticos incurables. Comprende una serie de componentes esenciales para la introducción de cambios o ediciones precisas en secuencias de ADN blanco (figura 1A). Uno de estos elementos es la endonucleasa Cas9, que corta las dos cadenas del ADN en un sitio particular del genoma. Otro elemento clave es el ARN guía (ARNg), que es una secuencia prediseñada de ARN (alrededor de 20 nt complementarios al ADN blanco), situada dentro de un marco de ARN largo (32,33). En relación con el mecanismo de acción, la enzima Cas9 sigue al ARNg hasta la secuencia blanco. Este complejo tiene dos dominios catalíticos (HNH y RuvC) que actúan juntos para mediar las roturas en el ADN. Cada uno de estos dominios catalíticos escinde una cadena de ADN, lo que da como resultado dos roturas proximales a la secuencia de PAM (*Protospacer adjacent motif*) en el sitio objetivo (34), para luego inducir procesos de reparación del ADN. Estas roturas de doble cadena generalmente se reparan mediante una de dos vías. Una vía tiene que ver con intentar reparar el daño mediante la unión de extremos no homólogos, propensos a errores, y la otra vía a través de la reparación dirigida por homología, la cual durante el proceso de reconstrucción del ADN escindido usa el ADN homólogo del donante para introducir cambios dentro de uno o más genes en el genoma de la célula de interés (32). Es de mencionar que, en comparación con otras técnicas de edición del genoma, CRISPR-Cas9 es una técnica de fácil uso, flexible, altamente eficiente y específica (33,34).



**Figura 1**  
 CRISPRCas en cáncer colorrectal. A) Elementos clave para edición génica con CRISPRCas9 B) Genes editados con CRISPR in vitro e in vivo con potencial terapéutico. C) Hallazgos respecto a genes y vías alteradas en cáncer colorrectal identificados a través de CRISPR

PAM: *protospacer adjacent motif*.

Fuentes: figura 1A modificada de Adli (34), figuras 1B y 1C, elaboración propia.

El sistema CRISPR-Cas ha estado en estudio para su uso en la activación transcripcional, represión transcripcional, modificación de histonas, edición de bases, metilación del ADN y manipulación del genoma dentro del espectro de pacientes con enfermedades genéticas (35). Esta técnica ha mostrado efectividad en estudios con población murina y ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, pulmón, próstata, mama y tiroides (36). Así mismo, se ha estudiado como parte del tratamiento para enfermedades como la diabetes, la anemia falciforme, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer (36), entre otras, y se ha planteado el uso de CRISPR para la corrección precisa de mutaciones particulares o la reversión del defecto hacia el ADN original.

Por otro lado, y en coherencia con que el sistema CRISPR-Cas9 tiene una función antiviral en la inmunidad adaptativa bacteriana, este sistema presenta un gran potencial para la defensa y eliminación de oncovirus específicos,

como el virus del papiloma humano (VPH), asociado con el desarrollo de cáncer cervical, de laringe, ano y otros. De hecho, Hsu et al. (37) pretendían, por medio de un adenovirus, usar el sistema CRISPR-Cas9 para determinar si era posible inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por el VPH -16 (genotipo 16). Luego, en ese estudio se demostró una reducción significativa y selectiva del crecimiento tumoral anal en modelos murinos al direccionar el Cas9-RNAg para inactivar los genes E6 y E7 del VPH-16, y ello confirmó su potencial uso para el tratamiento selectivo de tumores inducidos por VPH (37). En este sentido, y con la efectividad en otros tumores sólidos, se propone la implementación de los grupos virales como el adenovirus o el lentivirus, previa inserción de CRISPR-Cas9 modificado, para el tamizaje de distintos genes implicados en el desarrollo del CCR, al haberse demostrado su utilidad para retener el microambiente tumoral en modelos murinos y a la aproximación a un contexto real de la enfermedad (35).

### Uso del CRISPR en cáncer colorrectal

En CCR son diversas las mutaciones que confieren capacidades tumorigénicas a las células intestinales, lo que se manifiesta en una gran cantidad de alteraciones celulares adicionales que dificultan el tratamiento adecuado y preciso. Debido a ello, el bloqueo de genes únicos a veces resulta inefectivo, por las diferentes combinaciones genéticas en CCR (38). En este contexto, se han realizado varios estudios con CRISPR, principalmente para comprender las distintas vías asociadas con la gran cantidad de genes implicados en el CCR (39). Por ello, oncogenes como KRAS y el NRAS, genes supresores de tumores como PTEN y el SOX15 (*SRY-Box transcription factor 15*) y genes de resistencia a medicamentos como el ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*) y el MIR139-5p (*MicroRNA 139*) han sido blancos de CRISPR en CCR (40). Adicionalmente, el uso de esta técnica ha brindado nuevas aproximaciones a la comprensión de genes como el CCAT1 (*Colon*

*cancer associated transcript 1*), el cual se observa sobreexpresado no solo en adenocarcinoma de colon, sino también en cáncer ovárico y carcinoma hepatocelular, y se ha asociado con procesos de proliferación celular, migración y metástasis (41).

En este sentido, el CRISPR-Cas9 ha permitido identificar nuevos genes relacionados con el CCR que permiten dilucidar aspectos aún desconocidos en esta patología (30). Un ejemplo de esto corresponde a la modulación de la vía de la Wnt/ $\beta$ -catenina, la cual hasta el momento ha mostrado ser inefectiva, particularmente por sus múltiples vías subyacentes que aún se desconocen (39). Sin embargo, Wan et al. (39), usando CRISPR-Cas9 en líneas celulares y cultivos organoides, lograron observar nuevos reguladores como las proteínas KMT2A/Mll1 (*histone lysine methyltransferase 2A oncprotein/mixed-lineage leukemia 1*), reguladoras de la ocupación de la cromatina de  $\beta$ -catenina y el rendimiento transcripcional, implicada en la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (39).

Por otro lado, Evron et al. (42) identificaron implicaciones de la helicasa DHX29 (*DEAD/H box RNA helicase 29*) en la inhibición de la ruta de la Wnt en pacientes con CCR y aportaron a la literatura el papel de las helicasas en la regulación de esta cascada (42). De igual forma, Haiwen Li et al. (43) detectaron por medio CRISPR una asociación entre la sobreexpresión del gen de LGALS2, que codifica para la proteína de unión a glicanos Gal2 (*Galectin 2*), y la disminución en la proliferación de células epiteliales de tumor de colon. En dicho estudio se demostró que los ratones knockout Gal2 desarrollaron tumores significativamente más grandes respecto a los ratones silvestres, usando un modelo de CCR inducido por azoximetano/dextrano sulfato de sodio, destacando el potencial terapéutico del Gal2 en el CCR (43).

Wang et al. (44) reportaron en su estudio que la edición cuádruple de los genes KRAS, MEK1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase*), PIK3CA y MTOR, mediada por adenovirus como vector del CRISPR, redujo de manera significativa el crecimiento tumoral de células del CCR con mutación KRAS. Esos resultados también

permitieron inferir una alta especificidad y baja toxicidad del sistema de edición cuádruple; sin embargo, dadas las características hepatotóxicas del vector, es necesario seguir explorando la aplicación clínica del sistema para el tratamiento del CCR y otros tipos de cáncer (44).

Otros autores como Boos et al. (45) plantean una posible asociación entre la expresión del *KRAS* a la resiliencia contra terapias combinadas. En su estudio con organoides derivados de pacientes con CCR, han planteado la posibilidad a futuro de realizar terapias guiadas en el CCR, sugiriendo la aplicabilidad del CRISPR para poder identificar posibles riesgos o complicaciones en la administración de ciertas terapias (45).

Por otra parte, la multirresistencia a las terapias tradicionales se ha reportado ampliamente en el CCR, y corresponde a una causa importante de fallo terapéutico. Lei et al. (46) hacen uso de CRISPR/Cas9 para dirigirse a los ABC (transportadores dependientes de ATP), evitando su sobreexpresión y previniendo la salida del fármaco de quimioterapia en células de CCR. Dicho grupo de transportadores, particularmente el ABCB1/P-gp, reduce las concentraciones del fármaco intracelular, disminuyendo como consecuencia su efectividad (46). De igual forma, Li et al. (47) comprobaron por medio de experimentación *in vitro* que el CRISPR-Cas9 puede usarse para inhibir la proteína Par3L (*Partitioning defective 3-like protein*), asociada con una baja supervivencia en células tumorales colorrectales, mediante la inducción de la apoptosis, la activación de la cascada de señalización LKB1/AMPK (*Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase*) y la inhibición de la proliferación celular, al tiempo que las células cancerosas mostraron mayor sensibilidad a quimioterapia e irradiación (47).

Caso similar exponen O'Cathail et al. (48) en su estudio, donde se describe la participación de la vía de señalización de NFR2, hasta hace poco estudiada en CCR, por medio de ensayos en líneas celulares radiorresistentes y radiosensibles utilizando CRISPR-Cas9 (48). En su estudio precisan que la activación de dicha vía contribuye a los procesos de quimiorresistencia

y radiorresistencia; mientras que su inhibición sensibiliza las células ante dichos tratamientos (48). De la misma manera, Yu et al. (49) encontraron que el miR-5197 contribuye a mejorar la sensibilidad de las células de CCR a la radioterapia, por lo que resulta de suma importancia al observar que el 50% de los pacientes con CCR pueden presentar resistencia a esta (49).

El estudio de glucoproteínas también se ha evaluado dentro de su implicación con el CCR. En estudios con CRISPR-Cas9 sobre el bloqueo de genes implicados en la expresión de CD133 (*Prominin 1*) se ha encontrado una clara inhibición de la migración celular y la invasión de células en CCR (50). Igualmente, se observó que este proceso de bloqueo también generó una pérdida de la vimentina, la cual refleja la transición epitelio-mesénquima en el cáncer (50). Por igual, Watanabe et al. (51) encontraron por medio de esta técnica una asociación entre la CD166 (*Cluster of differentiation 166*) y la TP53. Afirmaron que la primera puede afectar a la segunda, promoviendo estados tumorigénicos, quimiorresistencia, invasión celular y proliferación celular (51). Se reconoce entonces que la CD166 se asocia con mal pronóstico y un progreso clínico-patológico mayor, pues se ha observado hasta en un 30,6% de los casos de CRC (52).

Así mismo, se han estudiado los procesos de fucosilación, los cuales, al observarse aumentados en el organismo, son indicativos de presencia de células cancerosas, particularmente en la zona colorrectal, y se asocian con mayor progresión tumoral, metástasis y resistencia a la quimioterapia (53). Blanas et al. (53) determinaron por medio de la activación de genes transcritores de las FUT4 (*Fucosyltransferase 4*) y FUT9 (*Fucosyltransferase 9*), utilizando CRISPR en una población de células murinas con CCR y sin presencia de FUT4 ni FUT9, que existe una asociación directa entre la presencia de niveles elevados de estas proteínas con la presencia de antígeno de Lewis fucosilado, al igual que otros procesos implicados en la aparición del CCR. Se conoce que la sobreexpresión de FUT4 se asocia con la resistencia de la quimioterapia

contra fármacos como el cetuximab o el bevacizumab (54). Por otro lado, se ha visto que la sobreexpresión de FUT9 favorece la actividad celular tumoral, mientras que su supresión favorece la agresividad tumoral y el crecimiento tumoral masivo (55). Por otro lado, la sobreexpresión del antígeno de Lewis se ha vinculado con la sobreexpresión de los distintos FUT que permiten la formación de este, ya que se ha observado en el 40%-50% de los casos de malignidad gástrica o colorrectal (56).

Finalmente, Durán-Vinet et al. (57) reportaron el CRISPR/Cas como un nuevo método de detección de ácidos nucleicos que permite el diagnóstico y pronóstico temprano del CCR a través de la medición de biomarcadores en saliva y sangre. Teniendo en cuenta lo anterior, se han utilizado las endonucleasas Cas12 y Cas13, que amplifican intrínsecamente la señal de detección mediada por su actividad transcolateral; sin embargo, el Cas13 cumple mejor los requisitos de diagnóstico basados en micro-ARN para un diagnóstico y pronóstico temprano del CCR (58). Además, Bender et al. (58) explican que el Cas13 se une y escinde los sistemas de interferencia del ARN; mientras que el Cas9 se une a los sustratos del ADN y carece de un dominio DN-asa, haciendo que sea una mejor alternativa, capaz de cambiar el fenotipo por alteración del ARN sin alterar el ADN (59).

Está claro que, en la actualidad, las investigaciones sobre la aplicación de CRISPR para combatir el CCR son pocos y se encuentran en estado de experimentación *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, los estudios reportados en este artículo han permitido reconocer nuevos genes y proteínas que intervienen en el desarrollo de este tipo de cáncer (véanse figuras 1B y 1C). Si bien hasta el momento los estudios se basan en modelos murinos y estudios *in vitro*, sin presencia de ningún estudio clínico que demuestren el espectro terapéutico del CRISPR, las investigaciones brindan nuevas oportunidades para dilucidar las vías moleculares que a futuro pueden ser blancos terapéuticos en el ámbito clínico (60).

## Conclusión

El CCR es una enfermedad que se ha estudiado ampliamente, dada su alta incidencia y mortalidad en todo el mundo. Si bien se han reconocido factores de riesgo que predisponen su aparición, aún siguen en estudio muchos de sus genes y vías de señalización implicadas en su comportamiento tumoral. De esta manera, se han planteado nuevas terapias que buscan dirigirse al paciente que se está tratando. En este sentido, la terapia génica por medio del sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado para modular la expresión de mutaciones implicadas, de manera directa o indirecta, con el desarrollo del CCR y ha permitido de esta forma la comprensión del cáncer y sus posibles implicaciones terapéuticas.

Aunque se han desarrollado diversos estudios *in vivo* e *in vitro* en la población murina, hasta el momento no se han desarrollado estudios en humanos que demuestren la utilidad de estas terapias. Debido a lo anterior, el uso de CRISPR-Cas9 como parte de la terapia para el manejo de pacientes con CCR aún no se ha mostrado dentro del espectro de aplicabilidad clínica. No obstante, brinda nuevas herramientas que permiten tanto vislumbrar los distintos procesos implicados en el CCR que favorecen la tumorigenicidad, la quimiorresistencia, la invasión celular y la proliferación celular como identificar procesos patogénicos y analizar el uso diagnóstico de esta herramienta.

Por lo pronto, el CRISPR-Cas9 se muestra como un método de análisis y estudio para el CCR, pudiendo a futuro brindar pautas terapéuticas basadas en la medicina de precisión. Hasta el momento, no se encontraron ensayos clínicos que permitan identificar las propiedades terapéuticas de CRISPR en CCR en humanos. Desafortunadamente, no hay ensayos clínicos que permitan identificar las propiedades terapéuticas del CRISPR en el CCR en seres humanos. Por esta razón, es necesario incentivar la investigación en el tema, con el propósito de aumentar el conocimiento teórico no solo en modelos animales, sino en humanos y promover nuevos estudios clínicos, haciendo uso de esta técnica genética, que puede brindar



una oportunidad terapéutica para el grupo de pacientes con CCR.

### Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que la investigación fue realizada en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera ser interpretada como un posible conflicto de intereses.

### Referencias

1. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
2. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
3. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2018;13(2):109-31. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12417>
4. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol Rev*. 2019;14(2):89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
5. Siegel RL, Jakubowski CD, Fedewa SA, Davis A, Azad NS. Colorectal cancer in the young: epidemiology, prevention, management. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2020 Apr 21; (40):75-88. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_279901](https://doi.org/10.1200/EDBK_279901)
6. Gil Parada FL, Torres Amaya M, Riveros Santoya SV, et al. Guía de práctica clínica para la tamización del cáncer colorrectal. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2015;30 Supl 1:67-74.
7. Hoevenaar WH, Janssen A, Quirindongo AI, Ma H, Klaasen SJ, Teixeira A, et al. Degree and site of chromosomal instability define its oncogenic potential. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15279-9>
8. Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol*. 2019;247(5):574-88. <https://doi.org/10.1002/path.5229>
9. Wyant T, McDowell S, Kalidas M. Treating colorectal cancer (internet). American Cancer Society. The American Cancer Society Medical and Editorial Content Team; 2020 (citado 2021 oct 27). Disponible en: <https://thedefender.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8607.00.pdf>
10. Sur D, Samasca G, Sur LM, Emanuela F. Treatment of colorectal cancer: actual strategies and promising perspectives. *World J Pharm Pharm Sci*. 2018;7(8):32-44. <https://doi.org/10.20959/WJPPS20188-12033>
11. Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges. *Cancer Lett*. 2019;447:48-55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>
12. Jiang C, Meng L, Yang B, Luo X. Application of CRISPR-Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. *Clin Gen*.

- 2019;97(1):73-88. <https://doi.org/10.1111/cge.13589>
13. Sayed S, Paszkowski-Rogacz M, Schmitt LT, Buchholz F. CRISPR/Cas9 as a tool to dissect cancer mutations. *Methods*. 2019;164-165:36-48. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.007>
14. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365. <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
15. De Rosa M, Ugo P, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delirio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015;34(3):1087-96. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4108>
16. Mork ME, You YN, Ying J, Bannon SA, Lynch PM, Rodriguez-Bigas MA, Vilar E. High prevalence of hereditary cancer syndromes in adolescents and young adults with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3544-9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.4503>
17. Li J, Woods SL, Healey S, et al. Point mutations in exon 1B of APC reveal gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach as a familial adenomatous polyposis variant. *Am J Hum Genet*. 2016;98(5):830-42. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.001>
18. Slowik V, Attard T, Dai H, Shah R, Septer S. Desmoid tumors complicating familial adenomatous polyposis: a meta-analysis mutation spectrum of affected individuals. *BMC Gastroenterology*. 2015;15(84). <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0306-2>
19. Adam R, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, Kirfel J, et al. Exome sequencing identifies biallelic MSH3 germline mutations as a recessive subtype of colorectal adenomatous polyposis. *Am J Hum Genet*. 2016;99(2):337-51. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.015>
20. Rohlin A, Eiengård F, Lundstam U, Zagoras T, et al. Grem 1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosom Cancer*. 2015;55(1):95-106. <https://doi.org/10.1002/gcc.22314>
21. Win AK, Dowty JG, Cleary SP, Kim H, Buchanan DD, Young JP, et al. Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH, with and without a family history of cancer. *Gastroenterology*. 2014;146(5):1208-11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.022>
22. Buchanan DD, Clendenning M, Zhuoer L, Stewart JR, Joseland S, Woodall S, et al. Lack of evidence for germline RNF43 mutations in patients with serrated polyposis syndrome from a large multinational study. *Gut*. 2016;66(6):1170-2. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312773>
23. Quintana I, Mejías-Luque R, Terradas M, Navarro M, Piñol V, Mur P, et al. Evidence suggests that germline RNF43 mutations are a rare cause of serrated polyposis. *Gut*. 2018;67(12):2230-2. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315733>
24. Gay Muñoz PM, López Padilla SO. Síndrome de Peutz-Jeghers. *Acta Méd Grupo Ángeles (internet)*. 2018;16(1):78-9. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-72032018000100078](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-72032018000100078)
25. Haidle JL, MacFarland SP, Howe JR. Juvenile polyposis syndrome. En: *GeneReviews (internet)*. Seattle (WA): University of Washington; 1993-2022 (citado 2021 oct 27). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1469/>

26. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, Zhao W, Jones D, Frankel WL, et al. Assessment of tumor sequencing as a replacement for Lynch syndrome screening and current molecular tests for patients with colorectal cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(6):806. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.0104>
27. Nieminen TT, O'Donohue ME, Wu Y, Lohi H, Scherer SW, Paterson AD, et al. Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology.* 2014;147(3):595-8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.009>
28. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 2016;35(4). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>
29. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed-Forootan F, Nasr-Esfahani MH, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci.* 2019;9(97). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>
30. Zhan T, Rindtorff N, Betge J, Ebert MP, Boutros M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2019;55:106-19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
31. Patel M, Horgan PG, McMillan DC, Edwards J. NF- $\kappa$ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Transl Res.* 2018;197:43-56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.02.002>
32. Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016;65(3):233-40. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
33. Martinez Oliva BG. CRISPR, una herramienta para editar genomas. *Gac Med Bol.* 2020;43(2):179-83. <https://doi.org/10.47993/gmb.v43i2.66>
34. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9(1911). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
35. Chow RD, Chen S. Cancer CRISPR screens in vivo. *Trends Cancer.* 2018;4(5):349-58. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.03.002>
36. Khan FA, Pandupuspitasari NS, Chun-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget.* 2016;7(32):52541-52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9646>
37. Hsu DS, Kornepati AVR, Glover W, Kennedy EM, Cullen BR. Targeting HPV16 DNA using CRISPR/Cas inhibits anal cancer growth in vivo. *Fut Virol.* 2018;13(7):475-82. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0010>
38. Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, Ali MA, Oshima H, Yamamoto D, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes. *PNAS.* 2019;116(31):15635-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904714116>
39. Wan C, Mahara S, Sun C, Doan A, Chua HK, Xu D, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 screen of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling identifies therapeutic targets for colorectal cancer. *Sci Adv.* 2021;7(21). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf2567>
40. Hazafa A, Mumtaz M, Farooq MF, Bilal S, Chaudhry SN, Firdous M, et al. CRISPR/Cas9: a powerful genome editing technique for the

treatment of cancer cells with present challenges and future directions. *Life Sci.* 2020;263:118525. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118525>

41. Zare K, Shademan M, Ghahramani Seno MM, Dehghani H. CRISPR/Cas9 knockout strategies to ablate CCAT1 lncRNA gene in cancer cells. *Biol Proced Online.* 2018;20(1). <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0086-5>

42. Evron T, Caspi M, Kazelnik M, Shor-Nareznay Y, Armoza-Eilat S, Kariv R, et al. A CRISPR knockout screen reveals new regulators of canonical Wnt signaling. *Oncogenesis.* 2021;10(9). <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00354-7>

43. Haiwen Li, Lixia Zhao, Yeh Siang Lau, Chen Zhang, Renzhi Han. Genome-wide CRISPR screen identifies LGALS2 as an oxidative stress-responsive gene with an inhibitory function on colon tumor growth. *Oncogene.* 2020;40(1):177-88. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01523-5>

44. Wang Z, Kang B, Gao Q, Huang L, Di J, Fan Y, Yu J, Jiang B, Gao F, Wang D, Sun H, Gu Y, Li J, Su X. Quadruple-editing of the MAPK and PI3K pathways effectively blocks the progression of KRAS-mutated colorectal cancer cells. *Cancer Sci.* 2021;112(9):3895-3910. <https://doi.org/10.1111/cas.15049>

45. Boos SL, Loevenich LP, Vosberg S, Engleitner T, Öllinger R, Kumbrink J, Rokavec M, Michl M, Greif PA, et al. Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer. *Mol Cancer Res.* 2021;13(2):517-40. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.10.008>

46. Lei ZN, Teng QX, Wu ZX, Ping FF, Song P, Wurpel JND, Zhe-Sheng Chen ZS. Overcoming multidrug

resistance by knockout of ABCB1 gene using CRISPR/cas9 system in SW620/AD300 colorectal cancer cells. *Med Comm.* 2021;16(2):1-13. <https://doi.org/10.1002/mco2.106>

47. Li T, Liu D, Lei X, Jiang Q. PAR3L enhances colorectal cancer cell survival by inhibiting LKB1/AMPK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;482(4):1037-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.154>

48. O'Cathail SM, Wu CH, Thomas R, Hawkins MA, Maughan TS, Lewis A. Nrf2 mediates therapeutic resistance to chemoradiation in colorectal cancer through a metabolic switch. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* MDPI. 2021;10(9):1380. <https://dx.doi.org/10.3390/antiox10091380>

49. Yu S, Li L, Fan K, Li Y, Gao Y. A genome-scale CRISPR knock-out screen identifies microrna-5197-5p as a promising radiosensitive biomarker in colorectal cancer. *Front Oncol.* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.696713>

50. Li W, Cho MY, Lee S, Jang M, Park J, Park R. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLOS ONE.* 2019;14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220860>

51. Watanabe S, Tsuchiya K, Nishimura R, Shirasaki T, Katsukura N, Hibiya S, et al. TP53 mutation by CRISPR system enhances the malignant potential of colon cancer. *Mol Cancer Res.* 2019;17(7):1459-67. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1195>

52. Han S, Yang W, Zong S, Li H, Liu S, Li W, et al. Clinicopathological, prognostic and predictive value of CD166 expression in colorectal

- cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(38):64373-84. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17442>
53. Blanas A, Cornelissen LA, Kotsias M, van der Horst JC, Van de Vrugt HJ, Kalay H, et al. Transcriptional activation of fucosyltransferase (FUT) genes using the CRISPR-dcas9-VPR technology reveals potent N-glycome alterations in colorectal cancer cells. *Glycobiology*. 2018;29(2):137-50. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy096>
54. Giordano G, Febbraro A, Tomaselli E, Sarnicola ML, Parcesepe P, Parente D, et al. Cancer-related CD15/FUT4 overexpression decreases benefit to agents targeting EGFR or VEGF acting as a novel RAF-mek-erk kinase downstream regulator in metastatic colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0225-7>
55. Auslander N, Cunningham CE, Toosi BM, McEwen EJ, Yizhak K, Vizeacoumar FS, et al. An integrated computational and experimental study uncovers FUT 9 as a metabolic driver of colorectal cancer. *Mol Syst Biol*. 2017;13(12):956. <https://doi.org/10.15252/msb.20177739>
56. Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, van Kooyk Y, van Vliet SJ. Fucosylated antigens in cancer: an alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Front Oncol*. 2018;8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00039>
57. Durán-Vinet B, Araya-Castro K, Calderón J, Vergara L, Weber H, Retamales J, Araya-Castro P, Leal-Rojas P. CRISPR/Cas13-based platforms for a potential next-generation diagnosis of colorectal cancer through exosomes micro-RNA detection: a review. *Cancers*. 2021;13(18):4640. <https://doi.org/10.3390/cancers13184640>
58. Bender G, Fahrioglu Yamaci R, Taneri B. CRISPR and KRAS: a match yet to be made. *J Biomed Sci*. 2021;28(77). <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00772-0>
59. Nagasaka M, Potugari B, Nguyen A, Sukari A, Azmi AS, Ignatius Ou SH. KRAS inhibitors - yes but what next? Direct targeting of KRAS - vaccines, adoptive T cell therapy and beyond. *Cancer Treat Rev*. 2021;101:102309. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102309>
60. Durán-Vinet B, Araya-Castro K, Calderón J, Vergara L, Weber H, Retamales J, Araya-Castro P, Leal-Rojas P. CRISPR/Cas13-based platforms for a potential next-generation diagnosis of colorectal cancer through exosomes micro-RNA detection: a review. *Cancers*. 2021;13(18):4640. <https://doi.org/10.3390/cancers13184640>