



Estado actual de terapias CRISPR: nueva esperanza en el armamento dermatológico

Andrea Isabel Cachutt Díaz ¹ .

Ingrid Rivera ² .

Oscar Reyes Jaimes ³ .

Félix J. Tapia ⁴ .

¹Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela y Hospital Vargas de Caracas, Ministerio de Salud, Venezuela

²Unidad Médica Láser UNIMEL, C.C. Terras Plaza, Torre Médica piso 11, Terrazas del Club Hípico, Caracas, Venezuela

³Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela y Hospital Vargas de Caracas, Ministerio de Salud, Venezuela

⁴Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela y Hospital Vargas de Caracas, Ministerio de Salud, Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 04 de Marzo del 2024 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Actualmente el sistema CRISPR/Cas se incluye dentro de las terapias de edición génica en dermatología para el tratamiento de las genodermatosis, especialmente epidermólisis bullosa. Estudios recientes en modelos murinos ha demostrado ser una estrategia prometedora para el manejo de dermatosis inflamatorias como psoriasis, dermatitis atópica, así como infecciones. El uso de esta terapia asociado al tratamiento sintomático será crucial para obtener mejores resultados a largo plazo. El sistema CRISPR/Cas necesita estrategias de

entrega precisas para ejercer su función en el tratamiento de enfermedades y permitir su implementación a gran escala. Considerando que la mayoría de las enfermedades cutáneas surgen de mutaciones en el ADN se plantea la incorporación de terapias CRISPR como una nueva esperanza en el armamento dermatológico.

PALABRAS CLAVE: CRISPR, edición génica, infecciones, dermatitis atópica, psoriasis, dermatología.

CURRENT STATE OF CRISPR THERAPIES: NEW HOPE IN THE DERMATOLOGICAL ARMAMENT

SUMMARY

Currently, the CRISPR/Cas system is included among gene editing therapies in dermatology for the treatment of genodermatoses, especially epidermolysis bullosa. Recent studies in murine models have shown to be a promising strategy for the management of inflammatory dermatoses such as psoriasis, atopic dermatitis, as well as infections. The use of this therapy combined with symptomatic treatment will be crucial to obtain better long-term results. The CRISPR/Cas system needs precise delivery strategies to treat diseases and enable large-scale implementation. Considering that the majority of skin diseases arise from mutations in DNA, the incorporation of CRISPR therapies is proposed as a new hope in the dermatological armament.

KEY WORDS: CRISPR, gene editing, infections, atopic dermatitis, psoriasis, dermatology.

ESTADO ACTUAL DE TERAPIAS CRISPR: NUEVA ESPERANZA EN EL ARMAMENTO DERMATOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

El manejo de las enfermedades cutáneas incluye el manejo de los síntomas más que de la causa, siendo estas soluciones a corto plazo para enfermedades crónicas, con riesgo de desarrollo de efectos adversos, como infecciones y disrupción de barrera cutánea por lo que surge la necesidad de desarrollar y aplicar terapias dirigidas a la causa subyacente. Considerando que la mayoría de las enfermedades cutáneas surgen de mutaciones en el ADN se plantea la incorporación de terapias CRISPR como una nueva esperanza en el armamento dermatológico.

El sistema CRISPR, cuyas siglas en inglés se traducen en “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”, se observó por primera vez en genomas de arqueas a finales de 1980. Sin embargo, posteriormente fue detectado en una amplia gama de microorganismos bacterianos, por lo que son comunes en procariotas. ⁽¹⁾

Característicamente este sistema son secuencias de ADN cortas (23-45bp de largo); palindrómicas porque los nucleótidos que la conforman se leen igual del extremo 5' a 3' y del 3' al 5'; repetidas en una región genómica, agrupadas ordenadamente e interespaciadas regularmente por secuencias que no son iguales entre ellas mismas. ⁽¹⁾

Estas secuencias interespaciadoras son iguales a regiones o secuencias de ADN

pertenecientes a bacteriófagos, las cuales fueron adquiridas durante una infección primaria, e incorporadas al genoma bacteriano por el complejo Cas1-Cas2. Conociendo este proceso como adaptación o adquisición.⁽¹⁾

Las secuencias CRISPR y las secuencias espaciadoras se transcribirán como un solo ARN, llamado pre-crARN. Posteriormente, se transcribirán los ARN transactivadores (tracrARN) los cuales acudirán al pre-crARN participando en su maduración.⁽¹⁾

Seguidamente una ribonucleasa III separa las secuencias de este crARN, en secuencias crARN más pequeñas, con secuencias espaciadoras individuales. Siendo este el proceso de expresión.⁽¹⁾

Finalmente, una proteína o enzima Cas se transcribe y forma un complejo con la secuencia crARN, formando el complejo de interferencia CRISPR/Cas.⁽¹⁾

Durante una próxima infección por el mismo fago o plásmido, el material viral interactuará con el complejo CRISPR/Cas que posee la secuencia espaciadora de este bacteriófago. La secuencia viral bicatenaria posee una secuencia PAM (Motivo adyacente de protoespaciador) en el extremo 3'. Estos PAM solo se encuentran en el material genético viral y el sistema CRISPR/Cas debe reconocerlo para activarse.⁽¹⁾

Al reconocer estos PAM el complejo comienza a separar la hebra bicatenaria del material viral y las enzimas Cas utilizan su actividad de endonucleasa, cortando o degradando el material viral e inactivándolo.⁽¹⁾ (Figura 1)

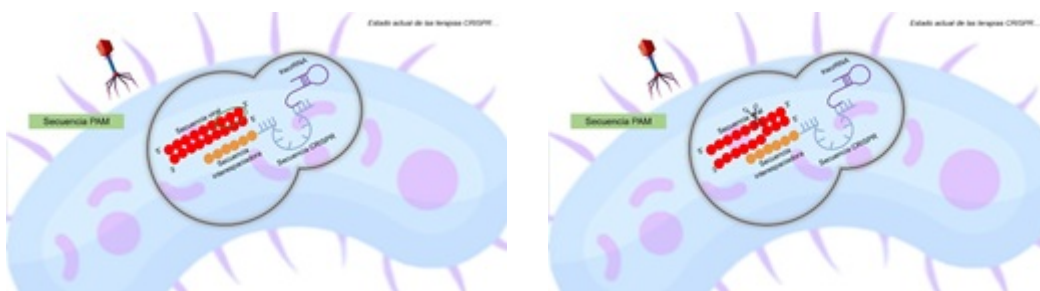


Figura 1. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas

De esta manera, se observa que el sistema CRISPR/Cas le confiere a la célula una forma única y hereditaria de inmunidad adaptativa.⁽¹⁾

Durante los últimos 15 años se ha avanzado en la comprensión de las funciones alternativas del sistema CRISPR/Cas.⁽¹⁾

Dentro de sus funciones, además de la inmunidad adaptativa, se encuentran la modulación de la fisiología celular, virulencia y comportamiento bacteriano, incluyendo la formación del *biofilm*, regulación de genes y remodelación del genoma. ⁽¹⁾

Dado el creciente potencial del sistema CRISPR/Cas el campo de aplicación es amplio e incluye inhibición de transferencia horizontal de genes, tipificación de especies bacterianas, y edición genética. ⁽¹⁾

A través de sistema CRISPR mediado por Cas9 se logran introducir roturas en el dsDNA de células de mamíferos, utilizando RNA de guía única (sgRNA), portador de una secuencia complementaria a la secuencia objetivo, logrando modificar esta secuencia. Esto ha permitido plantear el uso del sistema CRISPR/Cas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, trastornos genéticos, autoinmunes, oncológicos, inflamatorios, bacterianos, incluso para desarrollar vacunas contra SARS-CoV-2. ⁽¹⁾

Debido a los avances en estudios genéticos y biología molecular se sabe que las enfermedades cutáneas derivan de cambios en el ADN. Tal es el caso de las genodermatosis como epidermólisis bullosa e ictiosis congénita, en donde ocurren mutaciones genéticas monogénicas, por lo que han sido modelos para la aplicación de terapias de edición génica en modelos murinos y celulares. ⁽⁵⁾

CRISPR y las nucleasas asociadas a CRISPR (Cas) permiten la edición de objetivos moleculares precisos, secuencias de ARN o ADN, por lo que este grupo de enfermedades han sido modelo para la aplicación de por CRISPR/Cas9. ^{(4) (5)}

Hasta la fecha los ensayos clínicos de terapia génica en las genodermatosis se centran en epidermólisis bullosa (epidermólisis ampullosa de la unión y epidermólisis ampullosa distrófica recesiva o RDEB) y síndrome de Netherton. ⁽⁴⁾

Dada todas las consecuencias derivadas de la edición génica como mutagénesis insercional, las terapias de edición génica en RDEB deben ser de alta precisión mediante el empleo de nucleasas como nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN) y por supuesto, CRISPR/Cas. ⁽⁶⁾

En un estudio realizado por Bonafont y colaboradores en el año 2019 se demuestra la eficacia y seguridad de una terapia que emplea Cas9 guiado por sgARN administrado en forma de ribonucleoproteína por electroporación para extirpar con precisión el exón 80 del gen COL7A1 que porta la mutación en la RDEB, incorporando intrones funcionales de donantes. Se confirmó la restauración adecuada estudiando la transcripción de COL7A1 mediante RT-PCR, demostrando la prevalencia de transcritos que carecen de E80 en células editadas. ⁽⁶⁾

Las limitaciones del sistema CRISPR/Cas9 incluyen la división inespecífica en sitios no deseados (actividad fuera del objetivo) que sean similares a la secuencia objetivo. Sin embargo, no existen herramientas para predecir si esto ocurrirá, pudiendo conducir este error a mutaciones o reordenamientos inesperados que pueden culminar en oncogénesis. ⁽⁴⁾

CRISPR/Cas tiene el potencial de revolucionar la terapia celular y génica para la

genodermatosis, siempre que las limitaciones actuales sean superadas. ⁽⁴⁾

Al conocer que las genodermatosis presentan mutaciones genéticas monogénicas, que son blanco terapéutico en dichas terapias de edición génica por CRISPR/Cas, surge el interés por conocer en cuáles otras enfermedades dermatológicas pudieran ser manejadas con edición génica.

NUEVAS PROPUESTAS PARA EL USO DE TERAPIAS DE EDICIÓN DE GENES DIRECCIONADAS POR CRISPR EN DERMATOLOGÍA

a. Enfermedades inflamatorias como psoriasis y dermatitis atópica:

Los inflammasomas son complejos supramoleculares de proteínas, responsables de la activación de respuestas inflamatorias y la identificación de patógenos. Entre los subtipos de inflammasomas se encuentra la familia de receptores tipo NOD, NLRP3, quien junto a sus productos de activación (IL-1 β , IL-8, IL-1 α) está implicado en afecciones cutáneas inflamatorias como psoriasis y dermatitis atópica. La sobreexpresión de este inflammasoma y CASP-1 (que codifica caspasa-1) puede causar resistencia a los glucocorticoides, modulando los niveles celulares del receptor de glucocorticoides en células del sistema inmunitario, disminuyendo los efectos transcripcionales. ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

Dada la función crítica del proteasoma NLRP3 en enfermedades cutáneas inflamatorias, se han investigado el potencial de moléculas capaces de inhibir al mismo. Sin embargo, la mayoría de las moléculas solo muestran efectos moderados, ya que el inflammasoma se ubica en epidermis y dermis, y las moléculas administradas vía oral tienen acceso limitado a la capa subcutánea. ⁽¹⁶⁾

Para identificar el potencial de la terapia CRISPR/Cas en dermatitis atópica y psoriasis indujeron lesiones similares de cada enfermedad en ratones a través del uso de dinitroclorobenceno aplicando posteriormente un parche de micro agujas cargado con CRISPR/Cas en forma de ribonucleoproteína durante 5 semanas consecutivas. ⁽¹⁶⁾ **(Figura 2)**

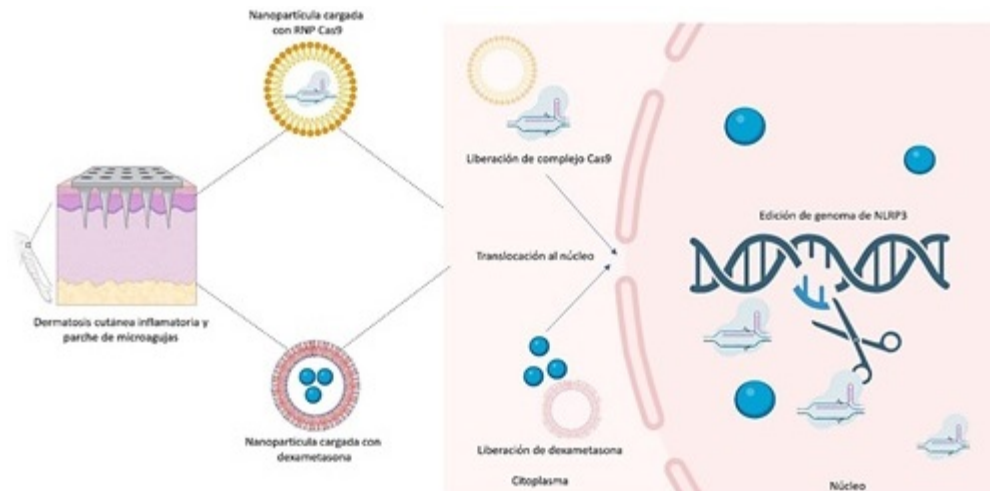


Figura 2. CRISPR/Cas como terapia génica en dermatosis inflamatorias (*)
 (*) Adaptado de Bonafont y col. (2019)

En este caso CRISPR/Cas9 es dirigido al locus genómico de NLRP3, para inhibir su activación dentro de los queratinocitos y células inmunitarias. Mediante la detección de diferentes secuencias de ARN de guía única (sgARN) en el locus en células DC2.4, se logra la eliminación, inserción y sustitución de bases en el PAM en la secuencia objetivo. ⁽¹⁶⁾

La entrega de dexametasona en forma de nanopartículas (dosis: 0,1-0,4 gr/ml) produce dilatación de los poros nucleares durante su proceso de translocación, contribuyendo a la entrada nuclear de agentes de edición de genoma. ⁽¹⁶⁾

Para confirmar la eficacia del parche en la interrupción del proteasoma NLRP3 mediada por CRISPR/Cas9 se detectó la expresión de las citocinas producto de su activación, los cuales se bajo-regularon en comparación con aquellos modelos no tratados con el parche. De igual forma, se observó reducción de las concentraciones IgE e IL-4, indicadores importantes de dermatitis atópica. ⁽¹⁶⁾

Con esta técnica no sólo se disminuye la respuesta inflamatoria, sino que mejora la sensibilidad a glucocorticoides. ⁽¹⁶⁾

En el caso del modelo de dermatitis atópica se observó mejoría de edema, escoriación, erosión y prurito (principal síntoma de actividad de la enfermedad), así como crecimiento del pelo en espalda. No hubo evidencia de toxicidad sistémica. Hubo reducción de la pérdida transepidérmica de agua mejorando hidratación de la piel, efecto no alcanzado con cremas de dexametasona o tracrólimus. Se demostró histológicamente reducción de infiltración de mastocitos dérmicos. ⁽¹⁶⁾

En el modelo de psoriasis se confirmó la inhibición de NLRP3 a través de la expresión de IL-1, pro-IL1, IL-18 y NLRP3 en piel, los cuales se redujeron significativamente, así como las citocinas claves relacionadas con la psoriasis (TNF- α , IL-17, IL-12, IL-23). Se observó una reducción en puntaje de score de PASI. ⁽¹⁶⁾

El análisis histológico reveló disminución de la hiperplasia epidérmica e infiltrado de células inflamatorias en comparación con los ratones tratados con monoterapia (dexametasona, tacrólimus, parche en blanco o solo con dexametasona).⁽¹⁶⁾

Por lo antes mencionado, la administración combinada de CRISPR/Cas9 RNP y dexametasona en forma de parche con micro agujas podría ser una estrategia prometedora para tratar inflamación en dermatitis atópica y psoriasis.⁽¹⁶⁾

b. Infecciones bacterianas:

Ante la creciente resistencia antimicrobiana los investigadores han apuntado a diseñar estrategias que modifiquen al genoma bacteriano para inactivar el patógeno y prevenir la replicación e infección.

Lam y colaboradores, en el año 2021, emplearon un bacteriófago, capaz de infectar E. coli y enterobacterias así como de empaquetar y entregar sistemas CRISPR/Cas dirigidos a un gen específico denominado *sfgfp*, lo cual provocó un crecimiento de colonias deteriorados e indujo delecciones cromosómicas en el gen objetivo.⁽¹⁷⁾

Selle y colaboradores en el 2020, evaluaron la actividad antimicrobiana contra *Clostridium difficile* de CRIPR/Cas3 utilizando fagos in vitro e in vivo, reduciendo las alteraciones de la microbiota intestinal que contribuyen con las recaídas. Observaron una mayor reducción y poca recuperabilidad del cultivo tras 24 horas y una carga fecal de *C. difficile* significativamente reducida. Siendo un enfoque prometedor de terapias CRISPR como antimicrobiano, así como modulador del microbioma.⁽¹⁸⁾

Estos estudios marcan precedentes para considerar en un futuro el uso de estas terapias en el manejo de infecciones de piel por *S. aureus* MRSA, foliculitis por *P. aeruginosa* e incluso acné en casos de alergias o refractariedad a antibióticos.⁽⁵⁾

AVANCES EN LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN A LA PIEL DE TERAPIAS DIRECCIONADAS POR CRISPR

En general la absorción de biomacromoléculas está muy restringida debido a su composición, ya que la piel solo permite la absorción de moléculas pequeñas y moderadamente lipofílicas, por lo que la administración de genes resulta desafiante. Otro reto lo representa la falta de vasculatura en la epidermis y la estrecha zona de unión epidérmica-dérmica que impiden el suministro o penetración de biomacromoléculas.⁽³⁾

El sistema CRISPR/Cas necesita estrategias de entrega in vitro, in vivo y ex vivo para ejercer su función en el tratamiento de enfermedades, lo cual dependerá de las propiedades de barrera de la piel, la carga genética, el alto peso molecular, cargas negativas e inestabilidad biológica. Este sistema puede administrarse a las células de tres formas diferentes⁽³⁾:

ARNm + sgRNA: Es una estrategia rápida pero el mRNA puede traducirse en el citoplasma.

Con mala estabilidad debido a su rápida degradación, lo que limita la duración de la edición de genes. Presenta bajo efecto fuera del objetivo. ⁽²⁾

ADN plasmídico (pADN): Este codifica Cas9 y sgRNA. Estabilidad alta, baja eficiencia ya que amerita ingreso al núcleo. ⁽²⁾

Complejo de ribonucleoproteína sgARN (RNP): Alta eficiencia de edición, no requiere procesos de transcripción y traducción, por lo que inicia la edición del genoma rápido y reduce efectos fuera del objetivo, baja inmunogenicidad, difícil de empaquetar por el gran tamaño de la enzima Cas9. ⁽²⁾

Esto demuestra que entregar el sistema CRISPR/Cas a su objetivo con alta eficacia y precisión es complejo y difícil. Por ello se diseñaron métodos de entrega física, entrega viral y entrega no viral. ⁽²⁾ (Figura 3)

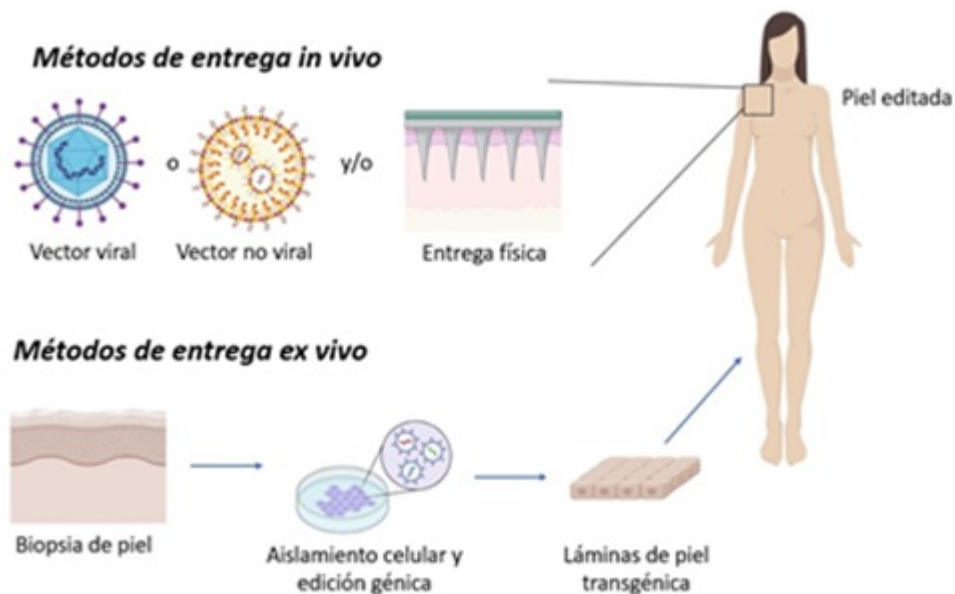


Figura 3. Métodos de entrega del sistema CRISPR/Cas (*)

(*) Adaptado de Huang y col. (2022)

Métodos de entrega física: Los métodos físicos y disruptivos de barrera tienen un gran potencial para la entrega de genes a la piel. ⁽³⁾

Electroporación: Es el método más ampliamente estudiado. Genera pulsos eléctricos de alta intensidad (50-500 V) que produce una alteración del potencial eléctrico de la membrana celular creando transitoriamente poros acuosos en las bicapas lipídicas del estrato córneo lo que facilita la entrada de biomacromoléculas, como ARN/ADN o CRISPR/Cas por el impulso

eléctrico, con posterior reparación de la membrana. Dentro de sus desventajas se incluyen la muerte celular por cambios de pH. (2)(3)(19)

Iontoforesis: Implica la aplicación de corrientes eléctricas fisiológicamente aceptables (0,1-1,0 mA/cm²) para conducir fármacos iónicos a través de la piel a favor del gradiente de potencial y concentración. (19)

Sonoporación o aplicación de ultrasonido: Permeabiliza temporalmente la membrana celular y facilita la penetración de carga genética en las células, a través de frecuencias de ultrasonidos bajas y medias (20kHz a 16MHz), desencadenando la formación de burbujas llenas de vapor, que finalmente colapsan y forman poros en la membrana celular, con la limitante de que la transferencia en comparación con la electroporación no es uniforme. (3)(19)

Microagujas: Interrumpen el estrato córneo mediante la formación de poros microscópicos a través de los cuales las biomacromoléculas pequeñas penetran en la epidermis, cerrándose en 1 hora y dejando la piel intacta. Permiten el paso desde pequeñas moléculas hidrófilas hasta macromoléculas de alto peso molecular. Son indoloras, mínimamente invasivas ya que la longitud es de 500 micras por lo que no alcanzan los nervios de la dermis. Combina la facilidad del uso de un parche transdérmico con la eficacia de administrar fármacos con jeringas y agujas hipodérmicas. Se diseñan matrices para mejorar el contacto con la piel y facilitar la penetración. Dentro de sus limitantes se encuentra la capacidad de carga limitada y cuando se trate de administraciones en todo el cuerpo. (3)

Métodos de entrega de vectores no virales:

Es un campo de investigación emergente. Permite mediar el transporte de los componentes de CRISPR por las propiedades fisicoquímicas de los vectores sintéticos o naturales. Actualmente los vectores no virales reportados en la literatura son las nanopartículas (de lípidos, polímeros, ADN, inorgánicas). Pueden utilizarse in vitro o in vivo, permitiendo mejorar la seguridad y reducir la inmunogenicidad. (2)

Las nanopartículas de lípidos (LNP) son unos de los sistemas más utilizados y avanzados. Consiste en combinar un ácido nucleico con carga negativa y liposomas con carga positiva, generando interacción electrostática, formando nanopartículas lipídicas. Este componente lipídico permite al ácido nucleico cruzar la capa lipídica externa, evitando la reacción inmunitaria. Permitiendo la entrega de material genético de cualquier tamaño. (2)(3)

Las nanopartículas de polímeros catiónicos forman complejos esféricos con carga genética negativa por interacciones electrostáticas. Transportan componentes CRISPR a través de las membranas mediante endocitosis permitiendo entregar la carga a los objetivos y una liberación controlada. Los polímeros más utilizados son la polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAMAM) y quitosano (CS). Sin embargo, dependiendo del tamaño pueden causar citotoxicidad, por lo que son parámetros que deben mejorarse para las aplicaciones clínicas. (2)(3)

Los exosomas son nanovesículas liberadas de forma natural por las células con un tamaño

que oscila entre 40 y 160 nm. Su biocompatibilidad, capacidad de transporte, estabilidad en el torrente sanguíneo y su capacidad de ingeniería han hecho considerable su uso como posible tecnología de entrega para los componentes CRISPR. Varios estudios han indicado que mediante la electroporación, el ADN plasmídico o los mRNA basados en Cas9 pueden cargarse en los exosomas purificados. Esta tecnología ha demostrado muchas ventajas como baja inmunogenicidad, alta biocompatibilidad, cruce de barreras biológicas, pero existe riesgo de integración de fragmentos de ADN durante la edición del genoma a gran escala. ⁽²⁾

Métodos de entrega de vectores virales:

Los vectores virales son los portadores más efectivos para la entrega de genes debido a su capacidad innata para infectar tanto células en división como quiescentes. ⁽³⁾

Los vectores virales contienen virus adenoasociados (AAV), adenovirus (AdV) y lentivirus. Los AAV y AdV tienen la capacidad de infección inherente sin desencadenar problemas por mutagénesis por inserción. El conjunto de partículas virales se empaqueta con Cas9 y sgARN, luego infectan la célula objetivo que se transportan al cuerpo o se estudian in vitro. ^{(2) (3)}

Los AAV tienen un buen perfil de seguridad y potencial terapéutico, por lo que se han aprobado para ensayos clínicos en terapia génica. Su inmunogenicidad es significativamente menor que otros virus. ⁽²⁾

AdV son virus de dsDNA, que pueden infectar tanto células en división como no en división. Ha sido utilizado en el establecimiento de enfermedades (Maddalo y colaboradores en el 2014), descubrimiento de fármacos (Voets en el 2017) y tratamiento de enfermedades existentes. ⁽²⁾

El lentivirus es un virus ARN monocatenario. Está desprovisto de múltiples propiedades virales y no activan al sistema inmunitario. Como retrovirus se integra en el genoma del huésped, aumentando el riesgo de mutagénesis insercional fuera del objetivo. ⁽²⁾

El mayor de los desafíos es el tamaño limitado de la carga que pueden llevar, siendo superado muchas veces por lo que han diseñado vectores duales, uno para Cas y otro para sgRNA, que debe ser entregado simultáneamente. Por lo que el diseño de estos vectores virales requiere procesos de fabricación complejos y costosos. ⁽³⁾

En general para avanzar en el campo de la terapia génica cutánea se necesita una mejor comprensión de cómo administrar la terapia génica de manera segura y eficiente en células diana. Se necesita incorporar el uso de modelos relevantes para humanos. Esto aumentará las perspectivas de implementación a gran escala.

CONCLUSIONES

La edición de genes a través de terapias CRISPR/Cas asociado al tratamiento sintomático será crucial para obtener mejores resultados a largo plazo. Se ha demostrado en estudios actuales resultados sumamente prometedores. Sin embargo, aún hay muchas preguntas abiertas y áreas por mejorar, entre ellas las vías de administración y modelos de estudio por lo que se debe insistir en la búsqueda de respuestas aumentando así las perspectivas de implementación a gran escala.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devi V, Harjai K, Chhibber S. CRISPR-Cas systems: role in cellular processes beyond adaptive immunity. *Folia Microbiol.* 2022; 67: 837-50.
2. Huang J, Zhou Y, Li J, Lu A, Liang C. CRISPR/Cas systems: Delivery and application in gene therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 942325.
3. Ain QU, Campos EVR, Huynh A, Witzigmann D, Hedtrich S. Gene Delivery to the Skin – How Far Have We Come?. *Trends Biotechnol.* 2021; 39: 474-87.
4. De Rosa L, Latella MC, Secone Seconetti A, et al. Toward Combined Cell and Gene Therapy for Genodermatoses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020; 12: 035667.
5. Bhat P, Garibyan L. The Potential of CRISPR-Guided Therapies in the Dermatology Clinic. *JID Innov.* 2022; 2: 100103.
6. Bonafont J, Mencía Á, García M, Torres R, Rodríguez S, Carretero M, et al. Clinically Relevant Correction of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa by Dual sgRNA CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Mol Ther.* 2019; 27: 986-98.
7. Wu W, Lu Z, Li F, Wang W, Qian N, Duan J, et al. Efficient in vivo gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114: 1660-1665.
8. Izmiryan A, Ganier C, Bovolenta M, Schmitt A, Mavilio F, Hovnanian A. Ex Vivo COL7A1 Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018; 12: 554-67.
9. Tsai YC, Tsai TF. Overlapping Features of Psoriasis and Atopic Dermatitis: From Genetics to Immunopathogenesis to Phenotypes. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 5518.
10. Capon F. The Genetic Basis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 2526.
11. Mahil SK, Catapano M, Di Meglio P, Dand N, Ahlfors H, Carr IM, et al. An analysis of IL-36 signature genes and individuals with IL1RL2 knockout mutations validates IL-36 as a psoriasis therapeutic target. *Sci Transl Med.* 2017; 9: 2514.
12. Al-Shobaili HA, Ahmed AA, Alnomair N, Alobead ZA, Rasheed Z. Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. *Int J Health Sci (Qassim).* 2016; 10: 96-120.
13. Moosbrugger-Martinz V, Leprince C, Méchin MC, Simon M, Blunder S, Gruber R, et al. Revisiting the Roles of Filaggrin in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 5318.
14. Kezic S, O'Regan GM, Lutter R, Jakasa I, Koster ES, Saunders S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 1031-1039.
15. Primiano MJ, Lefker BA, Bowman MR, Bree AG, Hubeau C, Bonin PD, et al. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine

- Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J Immunol.* 2016; 197: 2421-2433.
16. Wan T, Pan Q, Ping Y. Microneedle-assisted genome editing: A transdermal strategy of targeting *NLRP3* by CRISPR-Cas9 for synergistic therapy of inflammatory skin disorders. *Sci Adv.* 2021; 7: 2888.
 17. Lam KN, Spanogiannopoulos P, Soto-Perez P, Alexander M, Nalley MJ, Bisanz JE, *et al.* Phage-delivered CRISPR-Cas9 for strain-specific depletion and genomic deletions in the gut microbiome. *Cell Rep.* 2021; 37: 109930.
 18. Selle K, Fletcher JR, Tuson H, Schmitt DS, McMillan L, Vridhambal GS, *et al.* *In Vivo* Targeting of *Clostridioides difficile* Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. *mBio.* 2020; 11: 00019-20.
 19. Alkilani AZ, McCrudden MT, Donnelly RF. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics.* 2015; 7: 438-470.