



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

CRISPR como solución a las resistencias antibióticas

CRISPR as a solution to antibiotic resistance

Autor/es

Elisa García López

Director/es

Pedro Muniesa Lorda

María Climent Aroz

Facultad de Veterinaria

2018

---

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1.- RESUMEN .....  | 3  |
| 1.1.- ABSTRACT .....   | 4  |
| 2.- INTRODUCCIÓN.....  | 5  |
| Historia y concepto de resistencia antibiótica .....   | 5  |
| Impacto e informes de la OMS.....  | 7  |
| 3.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....   | 9  |
| 4.- METODOLOGÍA .....  | 10 |
| 5.- RESULTADOS .....   | 11 |
| 5.1.- ¿Qué es CRISPR y cómo se descubrió?.....   | 11 |
| 5.2.- Fundamentos del sistema CRISPR.....  | 13 |
| 5.3.- Clasificación y tipos de CRISPR.....   | 14 |
| 5.4.- El uso de CRISPR como solución a las resistencias antibióticas.....                      | 16 |
| a) Precedentes de los antimicrobianos CRISPR .....   | 17 |
| b) Nucleasas disponibles para antimicrobianos CRISPR.....                                      | 18 |
| c) Desarrollo de antimicrobianos CRISPR; uso de bacteriófagos como vehículos de entrega .....  | 19 |
| d) Oportunidades para mejorar la actividad antimicrobiana, la entrega y la especificidad ..... | 23 |
| 5.5.- Vías de administración .....   | 24 |
| 5.6.- Bioseguridad y otros posibles problemas .....  | 25 |
| 5.7.- Biotecnología y patentes.....  | 27 |
| 6.- DISCUSIÓN.....   | 28 |
| 7.- CONCLUSIONES .....   | 29 |
| 7.1.- CONCLUSIONS.....   | 29 |
| 8.- VALORACIÓN PERSONAL.....   | 30 |
| 9.- BIBLIOGRAFÍA.....  | 31 |

## 1.- RESUMEN

### “CRISPR como solución a las resistencias antibióticas”

Las resistencias antibióticas suponen en la sociedad actual uno de los mayores desafíos en cuanto a salud pública. Sólo en Europa mueren al año 25.000 personas a causa de estos patógenos y sus pérdidas y tratamientos ascienden a 1.500 millones de euros anuales. La aparición de nuevas bacterias resistentes gana la carrera a la creación y desarrollo de nuevos antibióticos; es por esto que otras opciones deben estudiarse para poder controlar el problema. Este es el caso de CRISPR cuyas siglas se traducen en “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas”, en una misma región del genoma. Se trata de una novedosa técnica genética que permite modificar el ADN específicamente como si se tratase de unas “tijeras moleculares”. Además, para el correcto funcionamiento de este proceso debe existir una endonucleasa asociada, llamada “Cas”, que es la encargada de producir el corte en el ADN. Son múltiples los tipos de CRISPR y por consiguiente, de endonucleasas existentes.

Diversos estudios han desarrollado bacteriófagos, modificados mediante CRISPR, cuya misión es eliminar estas bacterias resistentes o revertir este proceso de resistencia. En el desarrollo de estos experimentos se ha comprobado la utilidad de diversas endonucleasas, siendo las más útiles hasta el momento Cas3 y Cas9. Por otro lado, se han obtenido resultados satisfactorios en el empleo de fagémidos modificados, vehiculados también por fagos. Así como resultados también favorables en tratamientos de infecciones tópicas causadas por bacterias resistentes.

Por último, todavía quedan conceptos por seguir explorando, como la vía de administración y el escape a algunos sistemas inmunes bacterianos.

## 1.1.- ABSTRACT

### **“CRISPR as a solution to antibiotic resistance”**

Antibiotic resistance represents one of the greatest challenges in public health in our current society. Only in Europe 25,000 people die each year because of these pathogens and their losses and treatments amount to 1,500 million euros per year. The emergence of new resistant bacteria wins the race to the creation and development of new antibiotics; therefore other options should be explored in order to control the problem. This is the case of CRISPR whose acronym translates into "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", in a region of the genome. It is a new genetic technique that allows modifying the DNA specifically as a "molecular scissors". In addition, for the proper operation of this process, there must be an associated endonuclease, called "Cas", whose function is cutting the DNA. There are multiple types of CRISPR and therefore, various types of endonucleases exist too.

Several studies have developed bacteriophages, modified by CRISPR, whose mission is to eliminate these resistant bacteria or reverse this process of resistance. During the development of these experiments, the utility of different endonucleases has been checked, where Cas3 and Cas9 have been the most effective. On the other hand, satisfactory results have been obtained in the use of modified phagemids, also transported by phages. As well as favorable results in treatments of topical infections caused by resistant bacteria.

Finally, there are still concepts to continue exploring, such as the route of administration and the way to escape from some bacterial immune systems.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### Historia y concepto de resistencia antibiótica

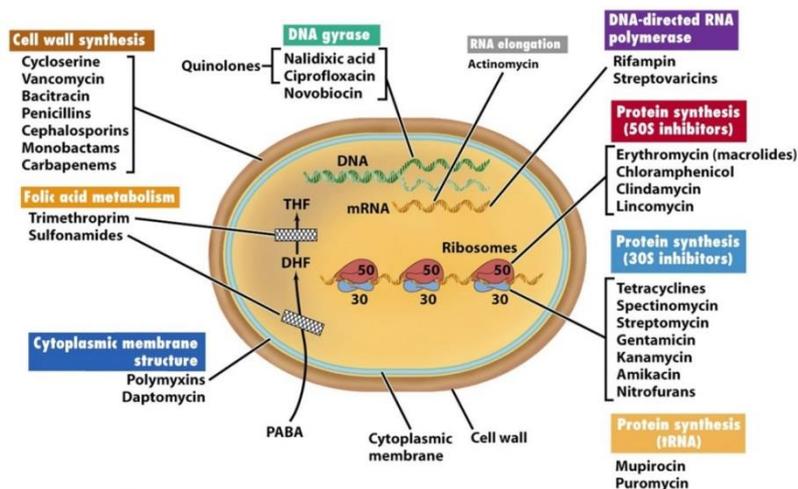
Las bacterias se encuentran en la Tierra desde hace 3,5 millones de años, muchas de ellas acompañándonos de forma beneficiosa y otras provocando graves enfermedades con las consecuentes pérdidas humanas producidas a lo largo de la historia.

El descubrimiento de los antibióticos a mediados del siglo XX, concretamente de la Penicilina durante el año 1928 por Alexander Fleming, en un cultivo de *Staphylococcus aureus*, supone uno de los grandes avances en la ciencia y en sanidad, otorgando a los humanos una herramienta fundamental de defensa frente a estos microorganismos.

La aparición de bacterias resistentes a ciertos antibióticos, con la consecuente pérdida de control en la curación de las enfermedades que causaban, fue pronto causa de preocupación y de análisis de los mecanismos implicados. El propio Fleming ya advertía esto, y a finales de los años 50 la mitad de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran resistentes a la Penicilina, gracias a la acción de las betalactamasas, unas enzimas que destruyen las moléculas de este antibiótico. Desde este momento, el número y tipo de bacterias que han ido adaptándose y adquiriendo resistencias ha aumentado de manera acelerada (1).

Hoy en día conocemos de forma mucho más precisa cómo se produce este fenómeno y la implicación que tiene en él la propia sociedad, derivada del uso de antibióticos en los sectores sanitario y productivo.

Se denomina **antibiótico** a la sustancia, química generalmente, que tiene la capacidad de eliminar o interrumpir el crecimiento y la proliferación de bacterias (2). Existen distintos mecanismos de acción de estas sustancias sobre la bacteria (**Figura 1**).



**Figura 1:** Clasificación de algunos antibióticos en función del lugar donde ejercen su acción. Imagen extraída de *Brock Biology of Microorganisms* (2).

Entendemos por **resistencia a los antibióticos** la capacidad de los microorganismos para no verse afectados por el antibiótico, lo que conlleva a la no curación de la enfermedad y a la persistencia de ese microorganismo patógeno. Esta resistencia se ha podido desarrollar de dos formas distintas:

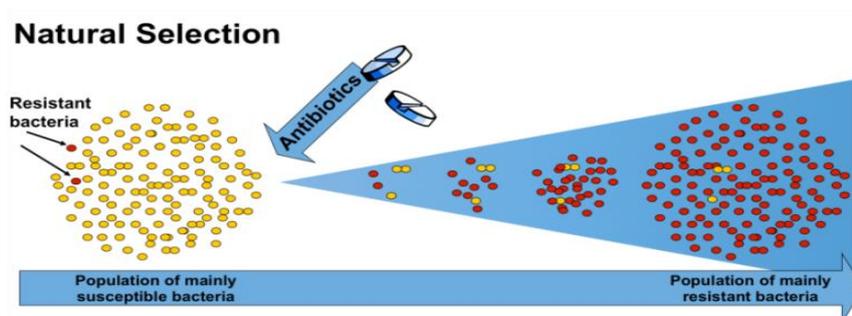
- Intrínseca o natural: cuando no hay actividad del antibiótico respecto a un grupo o tipo de microorganismo concreto.
- Adquirida, que a su vez se divide en:
  - Genética: se ha producido una mutación en un determinado gen o se ha adquirido uno nuevo. Esta es la verdadera resistencia y sobre la que vamos a desarrollar el grueso del trabajo.
  - Adaptativa: se trata de una forma de resistencia fenotípica, donde no intervienen los genes y en el momento que retiramos el antibiótico las bacterias que se van a multiplicar seguirán siendo sensibles.

La función que desempeñan los **genes de resistencia** es impedir la inhibición que sería llevada a cabo por el antibiótico. Es decir, no evitan que el antibiótico actúe, sino que le confieren características a esa bacteria para escapar a su acción (2).

A su vez, la adquisición de estos genes puede llevarse a cabo por diferentes procesos (2):

- Conjugación: contacto entre dos bacterias, donante y receptora
- Transducción: mediante bacteriófagos que hacen de vector del gen resistente
- Transformación: por presencia de un gen de resistencia libre en el ambiente

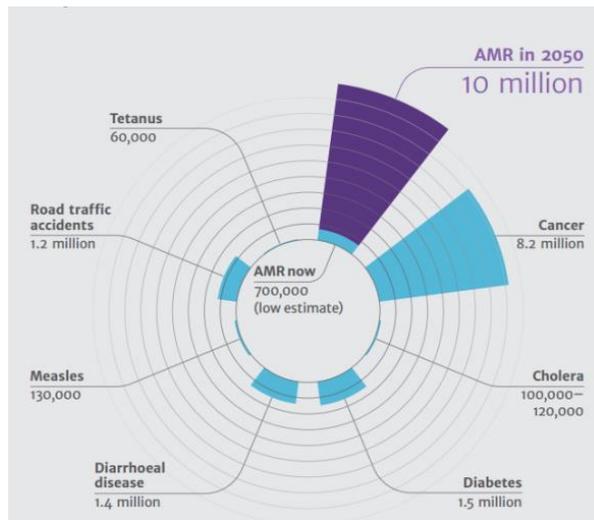
El problema surge cuando se produce una presión selectiva natural, al hacer uso de antibióticos, y solo nos quedamos con los patógenos resistentes, los cuales se multiplicarán y darán lugar a bacterias hijas también resistentes (**Figura 2**).



**Figura 2:** inicialmente, una población de bacterias donde la mayoría son susceptibles al antibiótico (amarillas) y sólo un par de ellas son resistentes a él de forma natural (rojas). Tras la administración de un antibiótico bactericida, las sensibles mueren y sólo sobreviven las que presentan resistencia, las cuales seguirán proliferando en presencia del antimicrobiano e incrementarán su número. El resultado final es una población que posee sólo bacterias resistentes. Imagen extraída de: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/mutation-and-selection/> (3).

## Impacto e informes de la OMS

El desarrollo de resistencia a los antibióticos es considerado en la actualidad como uno de los mayores problemas de salud pública que tenemos que afrontar. Solo en Europa, más de 25.000 muertes anuales se deben a este fenómeno y se producen pérdidas de 1.500 millones de euros cada año (4). Y lo que es peor, se estima que si sigue la tendencia actual, en el año 2050 se producirán alrededor de 10 millones de muertes a nivel mundial, considerándose por encima del número de muertes por cáncer (Figura 3).



**Figura 3:** número de muertes atribuidas a las resistencias antibióticas (AMR) en el año 2050, en comparación con el número de muertes actuales por otras causas mayores, en todo el mundo. Imagen extraída de *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations* (5).

Las instituciones sanitarias promueven el uso racional de los antibióticos debido al aumento de resistencias y al escaso desarrollo de nuevos antimicrobianos. Además, debido a la relación directa entre el uso de estas sustancias y la aparición de resistencias, se hace especial hincapié en la utilización de antibióticos clave en la terapéutica actual (por ejemplo, el Acuerdo para la Reducción del Consumo de Colistina en ganado Porcino) (6).

Por otro lado, la aplicación de estos tratamientos tanto en salud humana como animal ha generado vías de transmisión bidireccionales de microorganismos y resistencias que merecen una visión global para ser entendidas (7). El concepto **“One Health”** (Una Salud) permite plasmar esta idea, definiéndose como: *“término utilizado para describir un principio que reconoce que la salud humana y animal están interrelacionadas, que las enfermedades se transmiten de los seres humanos a los animales y viceversa y, por lo tanto, deben tratarse en ambos. También abarca el medioambiente, otro vínculo entre los seres humanos y los animales, así como una posible fuente de nuevos microorganismos resistentes. Dicho término está mundialmente reconocido y se ha utilizado ampliamente en la UE y en la Declaración Política de las Naciones Unidas sobre resistencia a los antimicrobianos de 2016.”*(8).

Algunas bacterias responsables de infecciones humanas graves ya son resistentes a casi todos los tratamientos disponibles, y la investigación de nuevas opciones no aporta muchas

esperanzas. Por tanto, las recomendaciones de la OMS (9) tienen como finalidad “preservar la eficacia de los antibióticos importantes para la medicina humana reduciendo su uso innecesario en animales” (6,9). En algunos países menos desarrollados, aproximadamente el 80% del consumo total de antibióticos corresponde al sector animal, principalmente para estimular el crecimiento en animales sanos. En relación a esto, la OMS (9) también insta a las industrias agropecuaria, piscícola y alimentaria a dejar de utilizar de forma sistemática estos productos como promotores del crecimiento y como metafilaxia en animales sanos (9).

Debido a todo lo anterior, son muchos los planes puestos en marcha (como el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (4) en nuestro país) y las medidas exhaustivas a estudiar y adoptar. No obstante, la Organización Mundial de la Salud (10) emitió en Septiembre del 2017, un informe donde asegura que “el mundo se está quedando sin antibióticos” (10). Probablemente esto se deba a que, mientras un nuevo antibiótico puede tardar en desarrollarse alrededor de cinco años, una bacteria pueda crear resistencias en tan sólo una hora (1).

La OMS (11), también publicó en 2017 una lista de bacterias que necesitaban urgentemente nuevos antibióticos, las cuales se reflejan en la siguiente tabla:

| Prioridad  | Bacteria                          | Resistente a                    |
|------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1) Crítica | <i>Acinetobacter baumannii</i>    | Carbapenémicos                  |
| 1) Crítica | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Carbapenémicos                  |
| 1) Crítica | <i>Enterobacteriaceae</i> (ESBL*) | Carbapenémicos                  |
| 2) Elevada | <i>Enterococcus faecium</i>       | Vancomicina                     |
| 2) Elevada | <i>Staphylococcus aureus</i>      | Meticilina/Vancomicina          |
| 2) Elevada | <i>Helicobacter pylori</i>        | Claritromicina                  |
| 2) Elevada | <i>Campylobacter</i> spp.         | Fluoroquinolonas                |
| 2) Elevada | <i>Salmonella</i>                 | Fluoroquinolonas                |
| 2) Elevada | <i>Neisseria gonorrhoeae</i>      | Fluoroquinolonas/ Cefalosporina |
| 3) Media   | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Penicilina                      |
| 3) Media   | <i>Haemophilus influenzae</i>     | Ampicilina                      |
| 3) Media   | <i>Shigella</i> spp               | Fluoroquinolonas                |

**Tabla 1:** Lista de bacterias que necesitan urgentemente nuevos antibióticos según la OMS. En función del color encontramos: rojo (bacterias con prioridad crítica), naranja (prioridad elevada) y amarillo (prioridad media). \*ESBL: betalactamasas de espectro extendido → enzimas producidas por bacterias intestinales que descomponen las moléculas de antibióticos comunes, como la penicilina. Generando por tanto, resistencia a ese tipo de antibióticos. Tabla adaptada de Comunicado de la OMS (11).

El descubrimiento en bacterias de los sistemas CRISPR de inmunidad adaptativa frente a ácidos nucleicos invasores de plásmidos y virus (12), puede representar una nueva estrategia para eliminar de manera específica estos microorganismos tan dañinos.

En el presente trabajo pretendemos realizar una descripción básica de dichos sistemas CRISPR y presentar una valoración preliminar de las estrategias propuestas para este fin.

### **3.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Debido a las grandes repercusiones que acarrea este problema en el mundo hoy en día (culpable de alrededor de 700.000 muertes a nivel mundial (5)) es primordial buscar soluciones prácticas, que puedan llevarse a cabo, además de que éstas sean efectivas, lo cual es lo más importante, desde el punto de vista resolutivo. El desarrollo de nuevos antibióticos se lleva a cabo en muchos laboratorios, y de manera ágil, pero su período para que una bacteria se haga resistente a él también es rápido, alrededor de unos 5 años tras su introducción (1).

Nuestra sociedad espera combatir la resistencia a los antibióticos utilizando múltiples enfoques. Las organizaciones médicas y de salud pública están trabajando para ayudar a educar al público sobre el uso adecuado de antibióticos (Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN), en España (5)) y son múltiples los comunicados de la OMS que alertan y aconsejan sobre este tema. Pero, aunque estos pasos son loables, es probable que no resuelvan el presente problema creciente.

Las estrategias que usan los antibióticos actuales no son específicas (síntesis de la pared bacteriana, replicación del ADN o síntesis de proteínas), de modo que dañan cualquier bacteria sin un gen de resistencia, permitiendo así a las bacterias resistentes multiplicarse y diseminar sus genes resistentes por toda la población de bacterias (13).

Además, también acaban con bacterias no causantes de la infección, muchas de ellas beneficiosas para los organismos, alterando la microbiota natural. En relación a esta última afirmación, algunos estudios sugieren la necesidad de una re-definición del uso de antibióticos por el impacto en la microbiota y la generación de resistencias, independientemente del rango de espectro que posean (14).

Pero, ¿y si pudiésemos dirigir la terapia solamente a esas bacterias resistentes, volviéndolas nuevamente sensibles al antibiótico, o directamente acabando con ellas? CRISPR puede proporcionarnos un método para hacer esto, aportándole un matiz muy novedoso. Mientras que los retos permanecen en la lucha contra estos agentes, los antimicrobianos CRISPR pueden ser nuestra nueva línea de defensa contra las bacterias (12).

El **objetivo principal** del trabajo radica en valorar el grado de desarrollo y escala de aplicabilidad de los métodos propuestos como antimicrobianos, mediante el uso de la técnica CRISPR, y sus posibles perspectivas de futuro.

Como **objetivos específicos** cabe señalar:

- Comprender qué son y cómo funcionan los sistemas CRISPR
- Clasificación y tipos de CRISPR susceptibles de ser utilizados en la lucha antimicrobiana
- Posibles usos de CRISPR como solución a resistencias antibióticas
- Analizar las posibles vías de administración
- Valorar bioseguridad y posibles inconvenientes relacionados con el uso de CRISPR
- Discutir las ventajas de estos nuevos antimicrobianos respecto a los actuales

#### 4.- METODOLOGÍA

El procedimiento para llevar a cabo este trabajo se basa en una **revisión bibliográfica** de los artículos publicados sobre esta técnica y en concreto, sobre las líneas de investigación referidas a su uso potencial como antibacteriano.

Se ha realizado utilizando buscadores específicos de bibliografía científica (*PubMed*, *WorldWideScience* y *Google Scholar* entre otros), además de identificar nodos y sitios relevantes disponibles on-line; destacando la página web de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la perteneciente a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). También se ha tenido acceso a artículos más restringidos, habiendo sido proporcionados por los tutores.

Respecto a las palabras claves utilizadas en la búsqueda sistemática, se corresponden con: “resistencias antibióticas”, “*antibiotic resistance*”, “CRISPR/Cas”, “Cas-9”, “*CRISPR antimicrobials*”, “*bacteriophage*”, “*phage therapy*”.

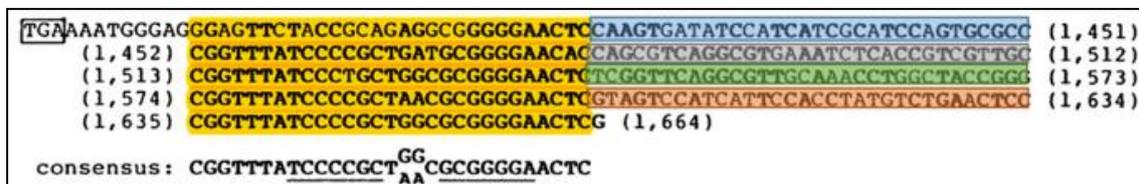
Finalmente, las referencias y citas bibliográficas se han elaborado mediante el estilo Vancouver, ampliamente utilizado en el ámbito de la biomedicina.

## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- ¿Qué es CRISPR y cómo se descubrió?

**CRISPR** es el acrónimo en inglés de “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, lo cual se traduce como “**repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas**”, en una misma región del genoma. Por otro lado, se encuentran las proteínas “Cas” (CRISPR-associated (Cas) proteins), endonucleasas esenciales para que este sistema sea funcional.

En el año 1987, en la Universidad de Osaka un grupo de investigación observó secuencias repetidas de 29 nucleótidos altamente conservadas en el genoma de *Escherichia coli* (15). Inicialmente se creía que estas secuencias de ADN resultaban ser simplemente ADN “basura”.



**Figura 4:** secuencia de una agrupación CRISPR en el genoma de *E. coli* (en amarillo), al lado la localización de los genes *iap* (responsable de las isozimas, implicadas en la conversión de la fosfatasa alcalina). Las secuencias repetidas están separadas por las secuencias espaciadoras (resto de colores), formadas por 32 nucleótidos variables. Imagen extraída de *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product* (15).

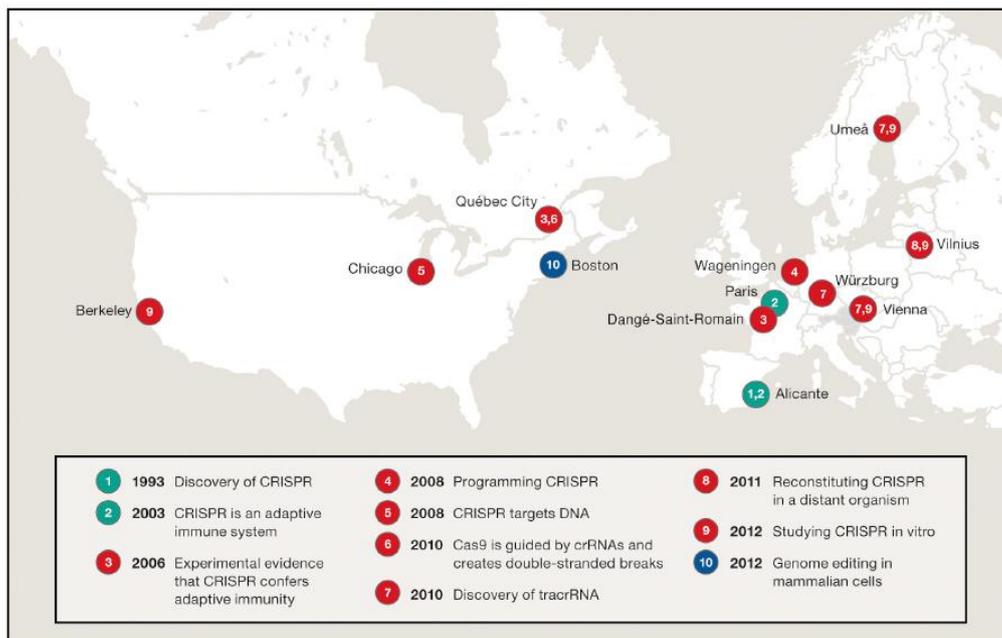
Durante el año 2000 el microbiólogo español **Francis Mojica** con ayuda de su equipo (16), descubren que estas familias CRISPR se encuentran ampliamente distribuidas en procariontes y en el año 2002 se acuña el término CRISPR además de definir la estructura de los genes Cas (17). Tras varios análisis bioinformáticos el grupo de Mojica y otros revelaron que existían unas secuencias «espaciadoras» entre esta serie de repeticiones que eran complementarias a secuencias de algunos bacteriófagos y virus que atacan a bacterias (18, 19). Todo lo anterior fundamentó las bases para describir que las bacterias poseían una especie de **sistema inmune con memoria** (18,19).

Más tarde, Koonin y Makarova demostraron que organismos como bacterias y arqueas integran fragmentos del ADN de los fagos que los infectan, en su propio genoma; de manera que cuando se produce una segunda infección, reconocen estos fragmentos y forman un complejo de doble cadena que detiene el proceso infeccioso, todo ello durante la fase de transcripción (20, 21).

En 2007, Barrangou desarrolla la primera evidencia experimental de que la funcionalidad de CRISPR está relacionada con un sistema inmune adaptativo primitivo, demostrando que *Streptococcus thermophilus* podía desarrollar resistencia a un fago, ya que al ser expuesto a él incorporaba un fragmento de su secuencia de ADN (22).

Con la naturaleza y funciones de CRISPR definidas, las siguientes investigaciones fueron encaminadas a estudiar las moléculas responsables de procesamiento del ARN con su secuencia complementaria (ARNcr) y la constitución del complejo CRISPR/Cas (23).

Poco después (una vez descubierta la actividad endonucleasa de Cas y la presencia de dos sitios de corte, añadiendo la alta especificidad de este ARNcr), se empezó a pensar en usar este sistema CRISPR/Cas para edición genómica, lo que finalmente fue desarrollado por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier (24) y adaptado a mamíferos por Feng Zhang (25) y George Church (26). En la **Figura 5** se resumen los principales hitos del desarrollo de CRISPR (27).



**Figura 5: La historia de CRISPR durante veinte años, se desarrolló en doce ciudades de nueve países.** El mapa muestra los lugares donde se desarrollaron las principales investigaciones y las primeras fechas de publicación de documentos. Los círculos verdes corresponden con el descubrimiento de CRISPR y su función; los rojos con la caracterización genética, bioquímica y molecular; y en azul el paso final de ingeniería genética para permitir la edición del genoma. Imagen extraída de *The Heroes of CRISPR* (27).

La simplicidad de los sistemas CRISPR de tipo II, con la endonucleasa Cas9, y de tipo V con Cas12a (ver clasificación más adelante), y su funcionamiento en una amplia variedad de organismos, ha convertido el sistema CRISPR-Cas en una de las herramientas más eficientes y precisas para la edición de genomas, con un potencial “prácticamente ilimitado”. Algunas de las áreas en las que se espera una mayor contribución serían las siguientes:

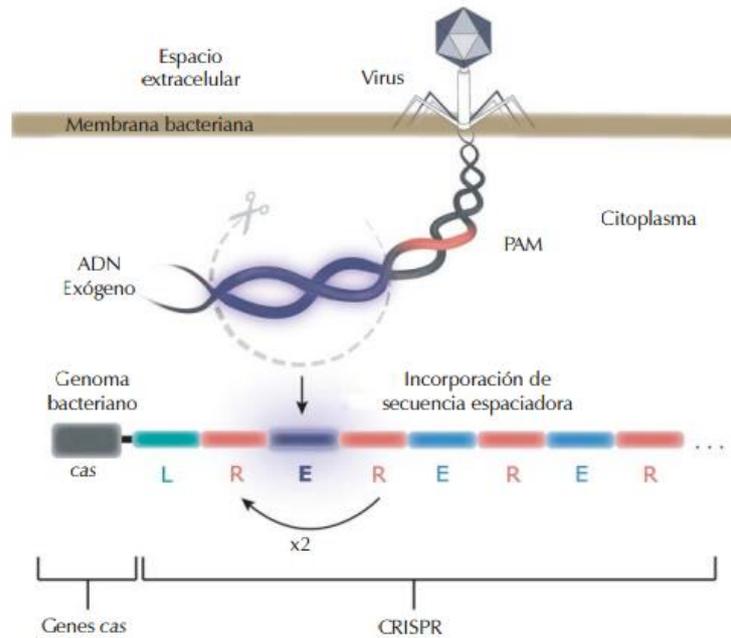
- En investigación básica y aplicada a escala genómica sobre la función biológica de los genes y su papel causal en muy diversas patologías, además de la identificación y validación de dianas terapéuticas para su tratamiento (28). Como ejemplo pueden servir estudios sobre la base genética del **cáncer** (29), o el desarrollo de terapias contra **VIH** (30).
- En agricultura, ganadería e ingeniería genética de plantas y animales domésticos (31,32).
- En el control de plagas mediante impulso génico y manipulación genética de mosquitos como **vectores de enfermedades** (33).
- En biotecnología alimentaria, como el mejoramiento del rendimiento de cultivos iniciadores en la **industria láctea** (34).

Pero sólo acaba de comenzar un largo camino a recorrer, ya que todavía queda mucho por comprender sobre las múltiples capacidades latentes de desarrollo sobre esta técnica, tan importante para nuestro futuro.

## 5.2.- Fundamentos del sistema CRISPR

Como hemos comentado anteriormente CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos, incluyendo elementos genéticos móviles, plásmidos y bacteriófagos (fagos). Sus dos componentes clave son un ARN que proviene de la secuencia CRISPR (**ARNcr**), y la endonucleasa **Cas**. La función de este ARN es dirigir a Cas a su secuencia complementaria, donde ésta realiza el corte. La estructura general de CRISPR está compuesta por un **líder o promotor** y distintas secuencias espaciadoras (de 20 a 50 nucleótidos), rodeadas por elementos repetidos, palindrómicos (de 32 nucleótidos).

Tras la exposición a un patógeno, la primera fase en esta respuesta inmunológica se basa en la adquisición de secuencias espaciadoras de este patógeno, ya sea material genético del propio virus o de un plásmido (**Figura 6**). Cuando estas secuencias se encuentran en el citoplasma, la bacteria reconoce una secuencia denominada como motivo adyacente al protoespaciador (**PAM**) e incorpora los nucleótidos adyacente al PAM como espaciador, junto al promotor de CRISPR. Mientras esto se lleva a cabo, también se encarga de generar una copia de la secuencia repetida para que ambas queden posicionadas en los flancos del nuevo fragmento (35).

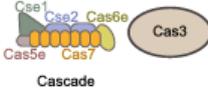
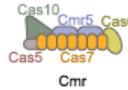
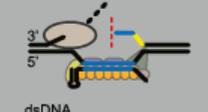
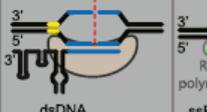
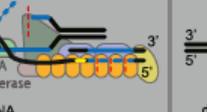
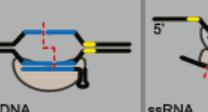


**Figura 6: Incorporación de secuencia espaciadora al genoma bacteriano.** En la imagen, un virus introduce su material genético al citoplasma bacteriano. La célula reconoce entonces la secuencia **PAM** e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como una nueva secuencia espaciadora (**E**). Durante este proceso, duplica la secuencia repetida (**R**) para flanquear la espaciadora por ambos lados. Dentro del genoma bacteriano, se encuentran los genes codificantes para la endonucleasa Cas (**Cas**) y la secuencia de CRISPR. CRISPR se compone de un líder (**L**) y distintas secuencias espaciadoras (**E**) flanqueadas por los elementos repetidos (**R**), usualmente palindrómicos. Imagen extraída de *La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas* (35).

### 5.3.- Clasificación y tipos de CRISPR

Se han descrito una amplia variedad de tipos de sistemas CRISPR-Cas. Se diferencian en función de las proteínas asociadas, responsables de la adquisición y destrucción de las secuencias diana y por su acción sobre el ADN o ARN. Actualmente se describen seis tipos básicos (tipos I a VI), aunque el tipo IV no ha sido todavía caracterizado experimentalmente (36).

Estos sistemas se dividen en dos clases (**Figura 7 y 8**). Los pertenecientes a la **Clase 1** (Tipo I, Tipo II y Tipo IV) utilizan un complejo de múltiples proteínas Cas para degradar los ácidos nucleicos extraños. En cambio los de la **Clase 2** (Tipo II, Tipo V y Tipo VI), poseen una sola proteína Cas de mayor tamaño para desempeñar la misma función (36). A su vez, estos seis tipos están divididos en 19 subtipos (38).

|                             | Type I  | Type II   | Type III   | Type V  | Type VI  |
|-----------------------------|---|---|--|---|--|
| Subtypes                    | A, B, C, D, E, F, G   | A, B, C   | A, B, C, D   | A, B, C, U (tentative)  | A, B, C  |
| Example effector protein(s) | Type I-E<br><br>Cascade  | Type II-A<br><br>Cas9  | Type III-B<br><br>Cmr   | Type V-A<br><br>Cpf1<br>(Cas12a)   | Type VI-A<br><br>C2c2<br>(Cas13a)   |
| Mechanisms                  | <br>Target: dsDNA<br>PAM: 5' AWG<br>Activity: Nick and 3' to 5' nuclease | <br>Target: dsDNA<br>PAM: 3' NGG<br>Activity: Blunt end cuts | <br>Target: ssRNA<br>PAM: 3' MMA (rPAM*)<br>Activity: Nicks in RNA fragment and related DNA cleavage | <br>Target: dsDNA<br>PAM: 5' TTN<br>Activity: Staggered ends<br>5' overhangs | <br>Target: ssRNA<br>PAM: 5' D (PFS)<br>Activity: Cleaves specifically and other RNAs nonspecifically |

\* rPAM is suggested but not a confirmed requirement for targeting ssRNA

**Figura 7:** Diversidad de sistemas CRISPR-Cas con sus respectivas proteínas Cas asociadas, además de sus mecanismos de acción. El sistema Tipo IV no se incluye, ya que no está categorizado experimentalmente. Imagen extraída de *Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials* (36).

En el sistema CRISPR **Tipo I**, se forma un complejo multiproteico en el que la nucleasa **Cas3** no solo corta el ADN sino que además tiene función exonucleasa 3'-5', con lo que tiene la capacidad de destruir grandes segmentos de ADN (38). Este hecho se considera como una característica muy favorable cuando se trata de destruir elementos no deseados, por lo que posee un gran atractivo para su utilización como antimicrobiano.

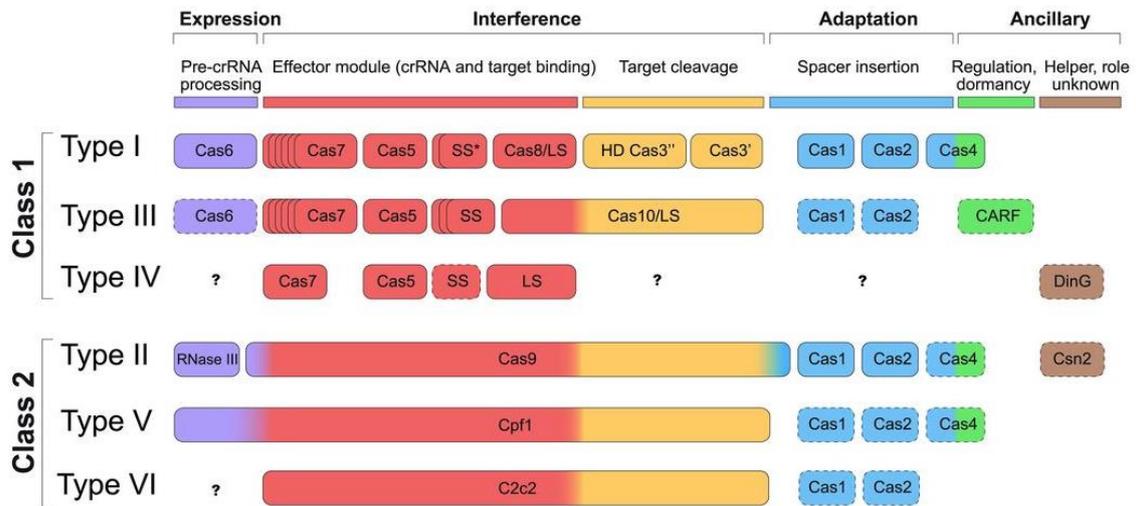
El sistema de **Tipo II**, que utiliza **Cas9** como única proteína efectora del corte del ADN, es el mejor estudiado y de más amplia utilización tanto en edición genómica de eucariotas, como en bacterias. En estas últimas se ha usado con éxito para eliminar genes de resistencia a antibióticos tanto codificados en plásmidos como en el genoma, así como la eliminación de genes esenciales o no esenciales en el cromosoma bacteriano (39). Un aspecto crítico de Cas9 es que genera rotura de la doble hebra con extremos romos potencialmente reparables, por lo que su uso como antimicrobiano se vería más comprometido (40).

El **Tipo III** utiliza **Cas10** como nucleasa y se asemeja al tipo I al formarse un complejo multiproteico. Sin embargo, exhibe una diferencia fundamental en el mecanismo de acción al actuar sobre ARN en vez de ADN, aunque es capaz de romper tanto el ARN como el ADN vecino (41).

El **Tipo IV**, como ya hemos comentado, no ha sido todavía caracterizado experimentalmente aunque sería también más parecido a los tipos I y III.

El **Tipo V** utiliza una única proteína **Cpf1 (Cas12a)** que rompe la doble hebra de ADN dejando extremos cohesivos, por lo que está adquiriendo una gran importancia en la introducción de segmentos de ADN en eucariotas.

Y por último el **Tipo VI**, utiliza también una única proteína **C2c2 (Cas13a)**, pero actuando sobre ARN de cadena sencilla (ssRNA) (41).



**Figura 8:** nucleasas Cas implicadas en los distintos procesos de expresión, interferencia, adaptación y ayuda auxiliar, en función del tipo de sistema.  
 Imagen extraída de: <http://proteopedia.org/wiki/index.php/Image:F2r.jpg>. (42).

Aunque los dos tipos más utilizados hasta la fecha son los sistemas que usan Cas9 y Cas3, cada uno de los tipos es potencialmente utilizable como agente antimicrobiano y estudios futuros determinaran la idoneidad o contexto en el que podrían ser utilizados con ventaja (36).

En el siguiente apartado se desarrollarán los modelos propuestos hasta el momento con este fin.

#### 5.4.- El uso de CRISPR como solución a las resistencias antibióticas

Resulta paradójico emplear un sistema que las propias bacterias usan como defensa para provocar la muerte de ellas mismas. No obstante, debido a la versatilidad de CRISPR esto puede llegar a ser posible.

Son dos los principales métodos de acción propuestos con actividad antimicrobiana (43):

-El **primero** está enfocado en producir directamente la muerte de la célula, en este caso de la bacteria resistente.

-El **segundo** tiene por objetivo la re-sensibilización de bacterias respecto al antibiótico, mediante el cual no se estaba logrando el objetivo deseado (43).

### a) Precedentes de los antimicrobianos CRISPR

Gracias a que estos sistemas CRISPR se encuentran de forma natural en la mitad de las bacterias aproximadamente, podríamos utilizarlos como antimicrobianos a través de la aplicación de un ARN guía dirigido al genoma de la bacteria (44,45).

No obstante, esta teoría resultaría limitada a bacterias con sistemas CRISPR/Cas activos y también estaría ligada a la expresión y estabilidad genética de dicho locus CRISPR/Cas (36).

Debido a la facilidad de diseñar un ARN guía, a la portabilidad del dúo endonucleasa-ARN guía y a elevada especificidad de unión y corte en el ADN diana, se han podido desarrollar otras múltiples aplicaciones.

Un diseño más implementado y mejor adaptado se basa en introducir un ARN guía y la nucleasa CRISPR. Estos estudios corroboran que la introducción de estos ARN guía a través de un sistema CRISPR/Cas, con el objetivo de alcanzar el genoma de la bacteria detiene el ciclo de esta célula, provocando la muerte o pérdida de grandes regiones del genoma que contienen la secuencia diana (36,44).

El mecanismo base de la edición del genoma con CRISPR se corresponde con la reparación dirigida del ADN escindido. Esto es así en células eucariotas, donde este ADN escindido se repara de manera eficiente a través de dos mecanismos intrínsecos (reparación homóloga directa y unión final no homóloga). En cambio, en bacterias diversos estudios demuestran que la división del ADN por las endonucleasas Cas a menudo no puede ser reparada y resulta letal, lo cual nos interesa mucho para el desarrollo de nuestro objetivo (44).

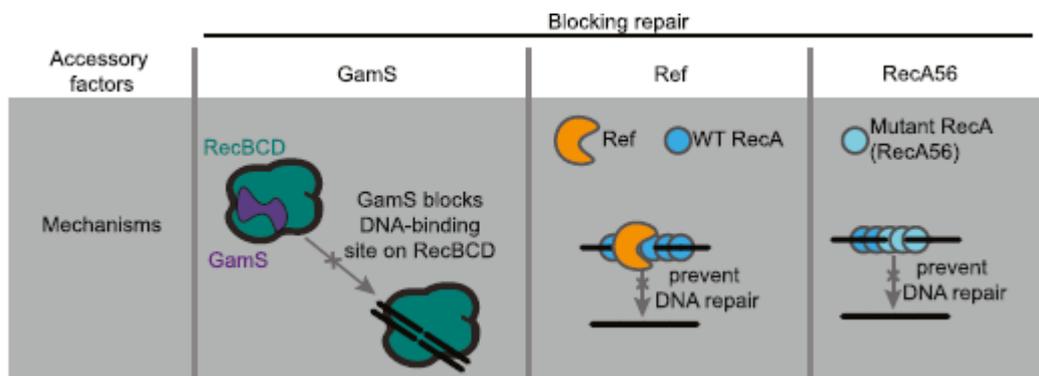
En base a esto, se propone el uso de nucleasas CRISPR como agentes antibacterianos programables (mediante la modificación del ARN guía) que podrían destruir de manera irreversible el ADN de bacterias seleccionadas. Es decir, obtendríamos una especie de **“antimicrobianos dirigidos”** que no afectarían al resto de bacterias con las que conviven; a diferencia de los antibióticos actuales.

## b) Nucleasas disponibles para antimicrobianos CRISPR

- Mediante el empleo de la nucleasa **Cas 9**, se han obtenido resultados favorables al atacar genes de resistencia a antibióticos (codificados en plásmidos o en el genoma) (27,40). Aunque su uso puede estar comprometido debido a que el ADN escindido por esta endonucleasa puede ser reparado; hecho reportado en la bacteria *E.coli* por Cui y Bikard (40).

Para evitar esta reparación, se pueden añadir efectores adicionales para aumentar la letalidad (**Figura 9**). Cui y Bikard demostraron que la expresión conjunta de Cas 9 y la proteína GamS del fago Mu (cuya función es inhibir la reparación del ADN mediante la enzima RecBCD) bloqueó la reparación del ADN y por lo tanto no sobrevivió ninguna bacteria (40).

Por otro lado, se han estudiado diversas proteínas víricas que inhiben la reparación del ADN, lo que podría mejorar también la eficacia de Cas 9 y otras endonucleasas (36).



**Figura 9:** Factores accesorios para aumentarla eficacia de los antimicrobianos CRISPR al bloquear la reparación del ADN escindido. Imagen extraída de *Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials* (36).

- Respecto a la nucleasa **Cas3**, asociada al sistema Tipo I, también se han alcanzado resultados esperanzadores como agente microbiano (36).

Por ello, varios grupos han utilizado el sistema **Tipo I-E**, obtenido de *E.coli*, para provocar letalidad en bacterias seleccionadas. Esta actividad antimicrobiana programable ha sido demostrada por Gomaa y colaboradores, tanto de manera endógena como heteróloga (45).

Estos mismos investigadores usaron este sistema de manera heteróloga para acabar con un individuo (en base a una secuencia genómica propia única) y para acabar con múltiples cepas (tomando como referencia secuencias compartidas).

De manera similar Yosef y colaboradores desarrollaron un proyecto para inmunizar a *E.coli* contra la absorción de plásmidos vinculados a resistencias antibióticas (46).

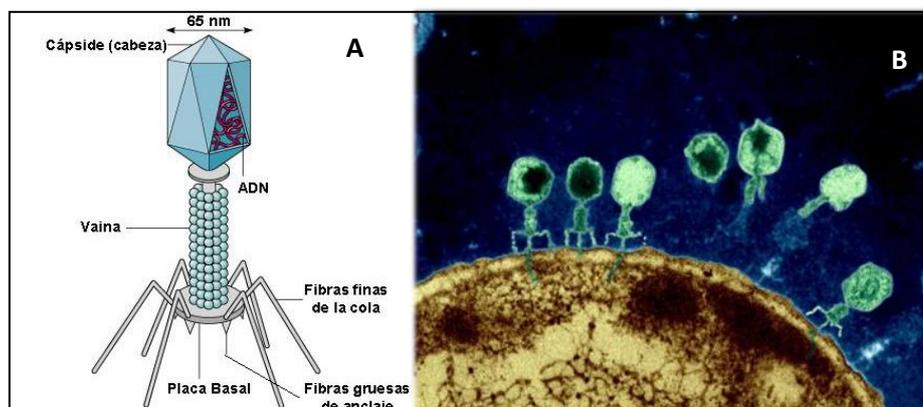
Caliando y Voigt diseñaron, por último, un sistema inducible I-E CRISPR/Cas integrado en los cromosomas de *E.coli* para que esta bacteria degradase regiones de su propio genoma (47).

- La proteína efectora Cpf1 del tipo V-A (**Cas12a**), tiene un funcionamiento parecido a Cas9, pero faltaría por comprobar si este tipo de corte puede ser reparado fácilmente, como ocurre con el corte que produce Cas9 (36).
- La nucleasa C2c2 (**Cas13a**), vinculada al sistema tipo VI-A, fue empleada por Abudayyeh (48), quien demostró que mediante su utilización, se podía detener el crecimiento celular, pero el efecto obtenido puede ser bacteriostático (36,48).

La mejor nucleasa para desarrollar antimicrobianos CRISPR no se ha determinado todavía, y esta elección podría estar en función del modo de entrega y la fisiología de la bacteria a atacar. En vistas a seleccionarla; además de desarrollar otros agentes accesorios, se continúa avanzando para desarrollar un diseño general de estos novedosos antimicrobianos.

### c) Desarrollo de antimicrobianos CRISPR; uso de bacteriófagos como vehículos de entrega

Se entiende por bacteriófago (fago para abreviar; **Figura 10**) al virus que infecta bacterias. Estos suelen ser específicos de especies o cepas de bacterias, provocando un menor impacto en la microbiota concomitante. Para su uso como terapia se realiza un aislamiento y purificación del virus salvaje (49).



**Figura 10: A)** Estructura de un bacteriófago. Extraída de: [http://es.steven-universe.wikia.com/wiki/Archivo:Virus\\_Bacteriofagos.jpg](http://es.steven-universe.wikia.com/wiki/Archivo:Virus_Bacteriofagos.jpg)

**B)** Bacteriófagos infectando una bacteria. Extraída de: <https://nacionfarma.com/avances-estudio-virus-sugieren-posible-aprovechamiento-bacterias-enfermedades/>

La terapia con fagos ha sido utilizada desde 1940 en varios países de la antigua Unión Soviética para tratar infecciones causadas por bacterias patógenas. Siendo muchos los pacientes de otros países, portadores de infecciones causadas por bacterias multirresistentes a los antibióticos empleados, que acuden a centros y Universidades como la de Eliava (Georgia) para ser sometidos a estos procedimientos, obteniendo un éxito del 90% (50) .

Además, el empleo de fagos resulta mucho más específico a la hora de atacar a la bacteria, que los antimicrobianos a los que estamos acostumbrados y pueden ser utilizados tanto en medicina humana, veterinaria, como en industria alimentaria. Respecto a esta última cabe destacar estudios realizados con resultados muy positivos en el **control de *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes***, con esperanzadoras prospecciones de futuro encaminadas a controlar otros muchos patógenos presentes en los alimentos. En estos mismos estudios no se han encontrado evidencias de que su uso en personas sea perjudicial; *“estos fagos se encuentran de forma natural en el ambiente y son ingeridos por personas y animales mediante el agua y alimentos cada día”* (51).

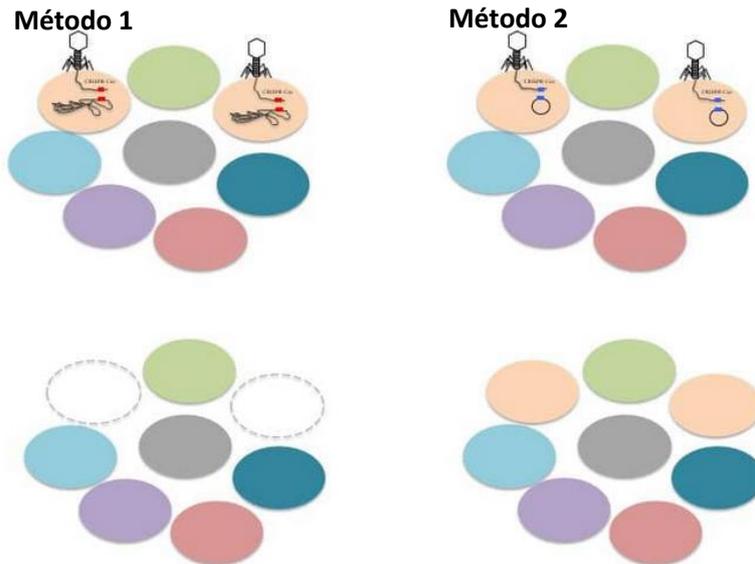
Con ayuda de los sistemas CRISPR todavía podríamos aumentar más la especificidad de estos virus sobre el hospedador diana, sin afectar al resto de bacterias. Esta teoría fue puesta en marcha por Barrangou en modelos animales, donde se consiguió salvar a ratones de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos, los cuales no hubiesen sobrevivido por medio de la aplicación de ningún antibiótico (49).

El mayor desafío para llevar esto a cabo es introducir las nucleasas dentro de la célula diana, lo cual puede obtenerse mediante el empleo de estos fagos (ya que son capaces de atravesar la pared bacteriana e introducir su material genético dentro del citoplasma de la célula anfitriona); de manera que actúan como vector del sistema CRISPR, inyectándolo en el interior de la bacteria.

Haciendo alusión a los dos métodos propuestos, las posibilidades serían (**Figura 11**):

**Método 1:** Elaboración de un bacteriófago que se una específicamente a la bacteria patógena y tras inyectar su material genético (previamente habiendo modificado su ARN guía, el cual lo dirigirá), CRISPR-Cas reconocerá el ADN diana, perteneciente al cromosoma del patógeno, atacándolo y produciendo con ello su muerte.

**Método 2:** Creación de un bacteriófago, el cual se una también de forma específica a la bacteria en cuestión, pero en este caso el ADN diana será el gen de resistencia al antibiótico codificado en un plásmido. Este plásmido será atacado y destruido, no obteniendo la muerte de la bacteria, pero sí su “re-sensibilización” al antibiótico (13).



**Figura 11:** Representación esquemática de la vehiculización de CRISPR-Cas a través de bacteriófagos, según los dos métodos descritos. Imagen adaptada de: <http://www.dciencia.es/crispr-antimicrobianos/>

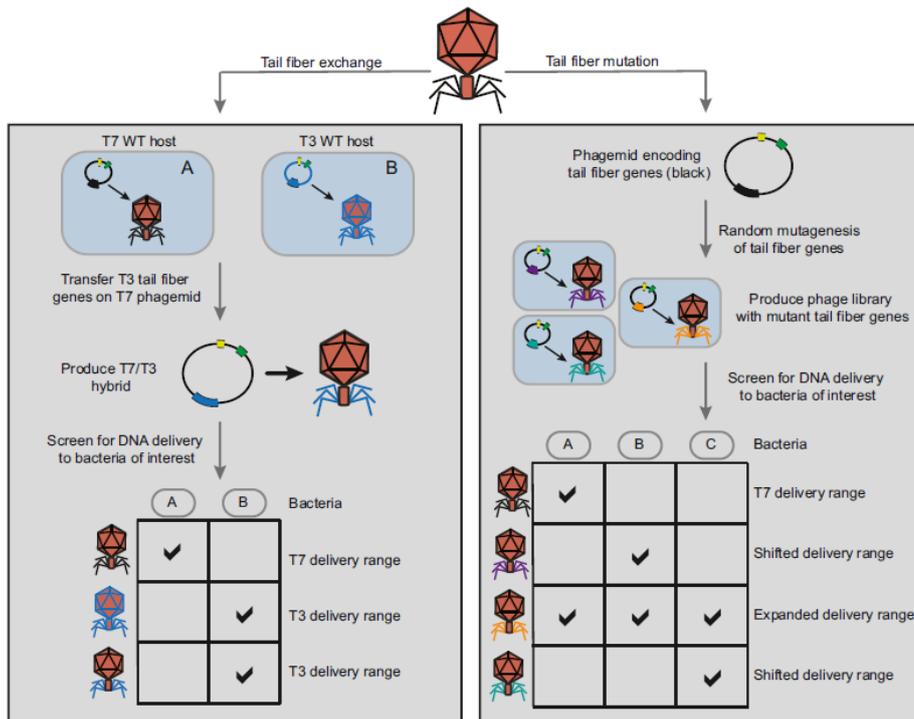
Para llevar a cabo el **método 1** se tiene que introducir el ADN correspondiente al antimicrobiano CRISPR directamente en el genoma del fago (siendo esta manipulación más dificultosa que en la propuesta 2 y añadiendo la posibilidad de introducir componentes del fago no deseados). No obstante, también se obtienen algunos beneficios, ya que normalmente mediante la modificación del genoma de los fagos, determinados procesos pueden bloquear algunos sistemas inmunes bacterianos que degradan el ADN extraño (36).

Yosef y colaboradores consiguieron introducir un sistema CRISPR-Cas Tipo I en el genoma del *fago λ* (46) el cual una vez integrado en el genoma de la bacteria, dificulta la transmisión hereditaria de plásmidos multirresistentes, frenando la propagación de resistencias a fármacos en una población de bacterias (36,46).

Todo esto ha sido llevado a cabo en genomas de fago **temperado o lisogénico**, de modo que CRISPR es el único agente de muerte celular. Pero por otro lado, se puede considerar el uso de fagos líticos como vehículos de entrega, aumentando la capacidad natural de matar del fago. Por esto sería interesante saber si el fago modificado que se emplea posee ciclo lítico o lisogénico para aumentar las posibilidades como antimicrobiano (36).

Para que estos fagos realicen la función que buscamos y entreguen de forma eficaz su carga genética, deben unirse específicamente a la superficie de las bacterias diana, es decir, que el proceso de **adsorción** sea satisfactorio. De forma natural los fagos se adsorben a un rango estrecho de bacterias, donde la gran mayoría están limitados a un subconjunto de cepas dentro de una misma especie. Este hecho podría resultar beneficioso para atacar un grupo de bacterias resistentes semejantes, pero también genera un desafío para utilizarlos como vehículos generales de entrega de ADN. Una posible solución se basa en el empleo conjunto de varios fagos o en la utilización de fagos con un amplio rango de hospedadores, como el *fago P1* (36,52).

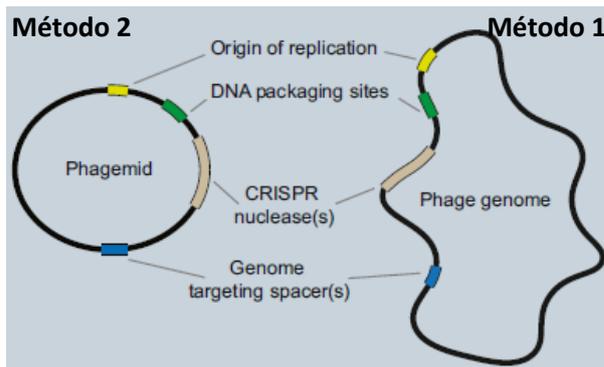
Algunos investigadores están explorando otras opciones, como alterar o intercambiar proteínas de la fibra de la cola del fago, las cuales son responsables de unir al fago a la superficie de la bacteria (**Figura 12**). Gracias al empleo del **fago T7** (que infecta a la mayoría de cepas de *E.coli*), se consiguió acomodar proteínas de la fibra de la cola de otros fagos relacionados, permitiendo la entrega del material genético a bacterias entéricas viables (36,53). Yosef y colaboradores promueven esta técnica, consiguiendo con ello una mayor tasa de infección en cepas bacterianas específicas, que se desean atacar (53).



**Figura 12:** Estrategias para modificar las proteínas de la fibra de la cola para modificar el rango de huésped del fago. Extraída de *Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials* (36).

De esta manera, se podría adaptar de forma rápida el rango de hospedadores para apuntar a las bacterias u otros patógenos de forma específica o conjunta.

Para desarrollar el **método 2**, deberemos hacerlo a través de un **fagémido**. Un fagémido se define como un tipo de plásmido perteneciente a un fago, pero cuyo material genético no codifica ningún componente del fago adicional. En su estructura contiene señales de ensamblaje, un marcador de selección y un origen de replicación (**Figura 13**). Gracias a su naturaleza, estos elementos pueden ser equipados con antimicrobianos CRISPR, mediante técnicas de ensamblaje in vitro. Han sido ya diversos los grupos que han usado esta técnica mediante fagémidos, para lograr una llegada eficaz de las secuencias CRISPR mediante fagos a bacterias patógenas, como son *E.coli* y *Staphylococcus* (36,39,54).



**Figura 13:** el ADN codificado de los antimicrobianos CRISPR puede ser incorporado a un fagémido (**método 2**) o al genoma del fago (**método 1**) para el empaquetamiento viral y su posterior administración intracelular.

Adaptada de *Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials* (36).

#### d) Oportunidades para mejorar la actividad antimicrobiana, la entrega y la especificidad

Hasta el momento se conocen varios tipos de sistemas inmunes bacterianos (restricción-modificación, CRISPR-Cas e infección abortiva), los cuales pueden variar mucho entre bacterias. Aunque mediante los antimicrobianos CRISPR obtenemos una entrega muy eficiente y específica hacia la célula diana, el ADN que codifica a estos antimicrobianos debe evitar el sistema inmune del huésped, para permitir que pueda expresarse de manera correcta (36).

Múltiples técnicas se han desarrollado para superar este obstáculo, mediante la mejora en la modificación del ADN (55). No obstante, se necesita profundizar más en este tema para comprender cuáles son las principales barreras en cada cepa y cómo podemos solventar cada una de ellas.

Dejando este tipo de barreras a un lado, se dan otros escenarios donde un antimicrobiano CRISPR funcional puede fallar en matar a la bacteria diana. Se han demostrado diversos modos de resistencia (los cuales son heredados), como la pérdida del sitio diana de destino, o la mutación de los receptores superficiales encargados de la adsorción de los fagos (39).

También se ha reportado la existencia de proteínas anti-CRISPR en fago lisogénico, lo cual podría inhibir la entrega de estos antimicrobianos. La presencia de fagos en este estado de ciclo, puede bloquear infecciones de fagos similares mediante exclusión por superinfección (36).

En contra de todo lo anterior, algunos estudios han demostrado que las mutaciones deletéreas que se producen en el genoma de los antimicrobianos CRISPR son la principal vía de escape en relación a la resistencia bacteriana innata. Bikard y colaboradores se dieron cuenta de que todas las bacterias, en este caso *S.aureus*, que habían sobrevivido a los antimicrobianos CRISPR-Cas9 vehiculados por fagos, resultaron susceptibles en una segunda infección por este

mismo fago (36). Por otro lado, Goma y su equipo encontraron que las células de *E.coli* (las cuales expresan el sistema I-E de CRISPR-Cas y cuyos plásmidos fueron atacados) sobrevivieron por recombinación de los ARN guía antes del aislamiento del plásmido (45).

En consecuencia, la resistencia a estos novedosos antimicrobianos puede resultar menos evidente, aunque las futuras investigaciones deberían encaminarse al control de estos mecanismos de escape bacteriano más observados.

En algunos casos la introducción de Cas9 también ha resultado desfavorable, porque interactúa con matrices huérfanas de CRISPR Tipo II (forma elemental de ARNs guía) de *Enterococcus faecalis*, lo cual accidentalmente podría resultar en una auto-focalización equívoca (56).

En último lugar, el uso de estos antimicrobianos podría también ser perjudicial para bacterias inespecíficas. Esto puede deberse a tres causas: actividad de escisión realizada en una diana distinta de la programada (*off target*), actividad citotóxica de la endonucleasa y sobreexpresión de los genes responsables de la actividad de escisión (36).

Todos estos desafíos pueden solventarse mediante el uso de una **nucleasa poco común**, cuyas probabilidades de ser compatibles con una matriz endógena son bajas. Además este tipo de nucleasas poseen la ventaja de tener pocas proteínas anti-CRISPR.

Aunque son numerosos los obstáculos potenciales a los que se enfrentan este tipo de antimicrobianos (entrega eficiente y letalidad focalizada), la versatilidad y el manejo de los sistemas CRISPR-Cas y del fago otorga esperanzas para superarlos mediante esfuerzos basados en ingeniería genética (36).

## 5.5.- Vías de Administración

Un estudio reciente demuestra que las condiciones de aplicación afectan mucho a la eficacia de estos antimicrobianos, concretamente en este caso, a la capacidad bactericida mediada por CRISPR/Cas9. Aplicando este tipo de tratamiento contra una infección cutánea de *S.aureus* sobre piel seca, no se consiguió acabar con las bacterias en la superficie de la piel (probablemente a causa de que la baja actividad de agua suprime actividades como la transcripción o la traslación de *S.aureus*, provocando que la maquinaria de CRISPR/Cas 9 no se pudiera expresar). En cambio, cuando se administró con base en un hidrogel, sí se consiguió acabar con la infección en la zona tratada (57).

Por otro lado, la administración intravenosa de estos mecanismos vehiculados por fagos lisados, puede provocar respuestas inmunes, que resultarían en un aumento de la producción de anticuerpos, disminución de la eficacia y posibles reacciones alérgicas. Es por esto, que la aplicación más práctica (al menos de aquellos que estén vehiculados por este tipo de fagos), es la tópica; ya sea para tratar infecciones cutáneas, superficies contaminadas de dispositivos hospitalarios o alimentos. En relación a estos últimos, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos aprobó el uso de cócteles de fagos contra *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (57).

Aunque la terapia mediante fagos es hasta ahora la más explorada, se están valorando otros métodos de entrega. Uno de ellos es el empleo de **nanopartículas**, las cuales están formadas por polímeros desarrollados, cuya función se basa en entregar un complejo formado por una ribonucleoproteína (Cas9-sgRNA) directamente a las bacterias (58). Hasta el momento, la eficiencia de esta entrega es baja, pero este enfoque totalmente independiente del ADN representa muchas ventajas; evita interferencias inmunológicas bacterianas, sobre todo contra elementos genéticos móviles, además de no interferir en los procesos de transcripción/transducción de la maquinaria del anfitrión (36).

## 5.6.- Bioseguridad y otros posibles problemas

El **primer** posible inconveniente que se va a tratar es la escasez de espaciadores diana en sistemas activos CRISPR-Cas, presentes de forma natural en el genoma de las bacterias. Aunque esta adquisición se produce de manera aleatoria durante el contacto con un espaciador de una partícula extraña, la cantidad de estos espaciadores para poder secuenciarlos y crear un ARN diana hacia ellos no es muy elevada (36).

Además, el equipo de Goua y colaboradores observaron que los sistemas CRISPR Tipo I pueden tener mayor interés como antimicrobianos que los sistemas Tipo II. Aunque la entrega y expresión mediante el Tipo I puede resultar más complicada (ya que requieren la expresión sincrónica de cuatro a siete proteínas) son los sistemas CRISPR-Cas más frecuentes en la naturaleza (21). Es por esto que podríamos diseñar un ARN guía dirigido al genoma de la bacteria a través de estos sistemas endógenos activos (45).

En **segundo** lugar, los fagos diseñados como vehículos de los sistemas CRISPR deben superar algunos obstáculos; como por ejemplo la vía de administración (mencionado anteriormente), ya que para tratar una infección endógena se requeriría una gran cantidad de fagos y esto podría conllevar problemas.

El empleo de estos elementos también podría resultar potencialmente un transmisor de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias sensibles. Además del desarrollo de resistencias incluso a fagos diseñados; momento en el cual los investigadores tendría que modificar sus fagos y estrategias con mucha frecuencia para hacer frente a las mutaciones bacterianas.

No obstante, debido al gran avance de las resistencias antibióticas, Elizabeth Kutter (microbióloga en *Evergreen State College* en Olympia, Washington) insta a avanzar en el estudio y desarrollo de la terapia de fagos, previamente diseñados; acompañada de la terapia de fagos naturales, *“los cuales han sido diseñados durante cientos de miles de años”* (49).

Hablando de un **tercer** posible problema, cabe destacar el hecho de una posible “autoedición accidental del investigador”, debido a la robustez que presenta este sistema de edición. La forma más viable para disminuir esta posibilidad es diseñando ARNs guía que se dirijan a secuencias no conservadas en humanos (13).

En **cuarto** lugar debemos hablar sobre la regulación de este tipo de tratamientos por la administración. En algunos países, como Estados Unidos y Suiza, se está llevando a cabo una aceptación generalizada. Mientras que en Europa, la EFSA ha comenzado su estudio como paso previo a su autorización. Sin embargo, el desarrollo de este sistema de edición con fines distintos a los antimicrobianos ha sido sentenciado en Europa, como perteneciente a la normativa de Organismos transgénicos (OMG) (59).

Por último, debemos tener en cuenta dos aspectos clave en la investigación y desarrollo de estos productos:

- 1) Conocimientos profundos y precisos sobre los mecanismos de acción de los fagos al atacar a su huésped (las bacterias).
- 2) Esfuerzos encaminados a reducir al mínimo las posibilidades de adaptación y resistencia de las bacterias al fago y la estabilidad de este, frente a mutaciones.

No existen razones demostradas para considerar a los fagos peligrosos para la salud humana, pero se deben realizar todas las pruebas necesarias antes de su producción industrial y su lanzamiento al mercado. No obstante, resultan buenos candidatos para su uso generalizado ya que no incorporan ningún riesgo biológico adicional al medio ambiente, ni es probable que tengan efectos potenciales dañinos para personas ni animales (51).

## 5.7.- Biotecnología y Patentes

El desarrollo de la terapia mediante fagos ha sido lento, en parte debido a que la infección provocada por estos virus ocurre de forma natural y por ello no puede ser patentado (49).

Hasta el momento, son varias las compañías que han diseñado bacteriófagos, con ayuda del sistema CRISPR para acabar con bacterias. Entre ellas podemos destacar los siguientes:

-**Locus Biosciences** en Research Triangle Park (Carolina del Norte), donde **Rodolphe Barrangou** con ayuda de su equipo consiguieron salvar ratones de infecciones provocadas por bacterias resistentes, principalmente con el uso del sistema Tipo I y la endonucleasa Cas3.

-**Eligo Bioscience** (París), este equipo liderado por **Xavier Duportet**, trabajan principalmente con Cas9 y enfocan sus esfuerzos en luchar contra bacterias patógenas presentes en el intestino de los humanos.

El objetivo primordial de ambas compañías es tratar infecciones bacterianas que causan enfermedad. Pero entre otros objetivos secundarios, se encuentra el desarrollo de fagos que permitan manipular el microbioma humano de forma muy precisa; con el fin de eliminar bacterias que están relacionadas con diversas patologías, como la obesidad, el autismo y algunos cánceres. Estos nexos entre bacterias y condiciones patológicas no están totalmente demostrados, pero este modelo propuesto busca como resultado, lograr descifrarlo. Según palabras textuales de Barrangou creen *“poder alcanzar cualquier ubicación en el cuerpo humano y eliminar solamente aquella bacteria elegida”*. Además el uso de estos fagos puede ser útil para manipular los microbiomas en animales de experimentación, para intentar resolver cómo influyen este tipo de bacterias en las condiciones antes expuestas (49).

-**Synthetic Genomics** en la Jolla (California). Desarrollan un proyecto denominado *“Supercharged phages”*, donde intentan añadir funciones especiales a estos fagos, como puede ser: enzimas que degradan biofilms o proteínas que intentan esconder a los fagos del sistema inmune (49).

-**Universidad de Alicante** (España). **Francis Mojica** como investigador principal desarrolla un proyecto con fechas de duración entre el año 2016 y el 2019, donde el principal objetivo es el *“uso de lisinas de bacteriófagos como alternativa a los antibióticos tradicionales”*. Además en el presente año, tiene fecha fin otro proyecto, denominado: *“Inmunización en bacterias: adaptación del sistema CRISPR-CAS I-E de Escherichia coli y Salmonella entérica”* (60).

## 6.- DISCUSIÓN

Una de las mayores ventajas de los antimicrobianos CRISPR es la probable reducción de efectos secundarios, tales como los que presentan los antibióticos actuales. Esto se debe a la capacidad de reprogramación mediante CRISPR para atacar sólo a las bacterias que estén causando la infección y, que en este caso, no sean sensibles a ningún antibiótico comercializado en el momento. Este sería un gran logro, ya que el resto de bacterias comensales no se verían afectadas por el tratamiento y seguirían siendo viables para recolonizar el nicho biológico de forma adecuada, impidiendo infecciones oportunistas de organismos como *Clostridium difficile*.

Todo esto es posible, en parte, gracias a que la gran mayoría de bacterias presentan una deficiente maquinaria de unión final no homóloga, por lo que la inducción mediante CRISPR de una rotura de doble cadena (DSB) en el genoma bacteriano provoca su muerte.

Si esta rotura de doble cadena ocurre en un plásmido, éste será eliminado de la bacteria, lo cual bien, puede provocar la muerte de ella o resultar en una re-sensibilización al antibiótico.

En conclusión, la característica más innovadora de estos antimicrobianos es la **especificidad**, porque podemos “personalizarlos” y dirigirlos a algunas secuencias concretas de una sola especie bacteriana, o incluso a un gen de resistencia a antibióticos. Por el contrario, el modo de acción de los antibióticos convencionales se dirige hacia un proceso esencial para casi todas las bacterias, provocando la muerte tanto de bacterias patógenas, como de muchas otras beneficiosas.

Otra gran ventaja que cabe destacar es la capacidad de **reprogramación** mediante ingeniería genética de estos componentes. Ya que, aunque se produzcan fenómenos de resistencia frente a fagos (algo que resulta inevitable), sus posteriores modificaciones podrían otorgarnos muchas soluciones (13).

Haciendo referencia a los dos métodos de tratamiento propuestos con fagos; el desarrollo de fagémidos para eliminar plásmidos, donde se encuentran generalmente los genes de resistencia, (método 2) resulta muy interesante ya que obtenemos bacterias que vuelven a ser sensibles al antibiótico y evitamos la transmisión de esos genes. No obstante, la administración de antibióticos convencionales seguiría estando presente, favoreciendo la aparición de posteriores mutaciones genéticas y provocando una recirculación del problema inicial.

En cambio, si empleamos fagos que causen la muerte directa de las “bacterias problema” (método 1), acabaríamos con la infección y dejaríamos de lado el uso de los antibióticos, pudiendo conservarlos para otras situaciones críticas.

## 7.- CONCLUSIONES

1. El sistema CRISPR representa, además de un sistema de inmunidad adaptativa en bacterias, una formidable herramienta para la ingeniería genética de los organismos, incluyendo las propias bacterias.
2. Son varios los tipos de CRISPR/Cas potencialmente utilizables. Básicamente son los sistemas que utilizan Cas9 y Cas3 los que están siendo utilizados principalmente en la lucha antimicrobiana. Sólo futuros desarrollos definirán cual es la herramienta más adecuada para este fin.
3. Los dos principales métodos propuestos están enfocados en producir directamente la muerte de la bacteria o su re-sensibilización.
4. La administración de CRISPR con bacteriófagos es la vía más ampliamente utilizada y constituye uno de los elementos críticos para la eficacia del sistema. Será necesario desarrollar nuevas vías y formas de administración.
5. El uso de CRISPR como antimicrobiano presenta como gran ventaja la especificidad sobre la bacteria diana patógena, dejando intacta el resto de la microbiota, siendo la gran diferencia respecto a los antibióticos actuales.
6. Además de su alta especificidad no se han encontrado problemas graves de bioseguridad asociados al sistema CRISPR, lo cual valida su uso como excelentes candidatos en la lucha antimicrobiana.
7. La experimentación en este campo se encuentra en niveles iniciales y se debe profundizar en algunos de los problemas expuestos, como la vía de administración.

### 7.1.- CONCLUSIONS

1. The CRISPR system represents, besides a system of adaptive immunity in bacteria, a formidable tool for the genetic engineering of organisms, including the bacteria themselves.
2. There are several potentially usable types of CRISPR/Cas. Basically the systems that use Cas9 and Cas3 are those who are being used mainly in the antimicrobial fight. Only future developments will define which is the most appropriate tool for this purpose.
3. The two main methods proposed are focused on directly producing the death of the bacteria or its re-sensitization.
4. The administration of CRISPR with bacteriophages is the most widely used route and constitutes one of the critical elements for the effectiveness of the system. It will be necessary to develop new ways and forms of administration.

5. The use of CRISPR as antimicrobial presents as advantage the specificity on the pathogenic target bacterium, leaving intact the rest of the microbiota, being the vast difference to current antibiotics.
6. In addition to its high specificity, no serious biosecurity problems have been found associated with the CRISPR system, which validates its use as excellent candidates in the antimicrobial fight.
7. Experimentation in this field is at initial levels and some of the problems exposed should be studied in depth, such as the route of administration.

## **8.- VALORACIÓN PERSONAL**

Desde un punto de vista más propio, considero este tipo de investigaciones como algo crucial en estos momentos; cuanto más, ante una posible solución a las bacterias resistentes.

Respecto a la técnica CRISPR sólo cabe mencionar su gran utilidad y versatilidad, que la hacen ser uno de los descubrimientos más importantes de la biotecnología y medicina en los últimos años, habiendo sido nominada al Premio Nobel de Medicina y Química en el año 2017. En el momento que conocí su existencia, sentí una gran curiosidad y seguí indagando en sus avances, hasta dar con una aplicación sobre un tema de gran repercusión, como son las resistencias antibióticas, donde también está muy implicada la ciencia veterinaria.

Desde un enfoque académico, me ha supuesto un reto personal entender los fundamentos de la técnica y desarrollar el grueso del trabajo, al tratarse de un descubrimiento tan novedoso; pero finalmente resulta gratificante el esfuerzo realizado.

Para terminar, agradecer la labor de mis tutores Pedro Muniesa y María Climent, por todos sus conocimientos aportados, y por ser los responsables de darme a conocer este nuevo mundo, desconocido hasta ahora para mí. Sin olvidar a mi familia y amigos, quienes han supuesto un pilar fundamental durante estos cinco intensos años de estudio del Grado en Veterinaria.

## 9. - BIBLIOGRAFÍA

1. Cowen DL, Segelman AB. *Antibiotics in historical perspective*. 1981. Merck Sharp & Dohme International.
2. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. 2017. 15 edition; Person.
3. Reaction on Antibiotic Resistance (ReAct). *Mutations and selection*. [Internet]. 2017 [Consultado el 26 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/mutation-and-selection/>
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Plan Nacional Resistencia Antibióticos. *Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos*. 2014; p. 14-5.
5. O'Neill J. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014; p. 7-16.
6. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Plan Nacional Resistencia Antibióticos. *Acuerdo para la Reducción del Consumo de Colistina en ganado Porcino*. 2016.
7. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Plan Nacional Resistencia Antibióticos. *Categorización de antibióticos en veterinaria*. 2017.
8. COMUNICACIÓN DE LA COMISIÓN AL CONSEJO Y AL PARLAMENTO EUROPEO. *Plan de Acción europeo «Una sola salud» para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos*. Bruselas. 2017. p. 3.
9. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimento*. [Internet]. 2017. [Consultado el 2 de abril de 2018] Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/cia\\_guidelines/es/](http://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/es/)
10. World Health Organization (WHO). *Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*. [Internet]. 2017. [Consultado el 10 de abril de 2018]. Disponible en: [http://www.who.int/medicines/news/2017/IAU\\_AntibacterialAgentsClinicalDevelopment\\_webfinal\\_2017\\_09\\_19.pdf](http://www.who.int/medicines/news/2017/IAU_AntibacterialAgentsClinicalDevelopment_webfinal_2017_09_19.pdf)
11. Organización Mundial de la Salud (OMS). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. [Internet]. 2017. [Consultado el 10 de

- abril de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
12. Mojica F, Montoliu L. *On the origin of CRISPR-Cas Technology: From prokaryotes to mammals*. Trends in Microbiol. 2016. 24(10), p.811-20.
  13. Gearing M. *CRISPR ANTMICROBIALS*. CRISPR 101: A Desktop Resource.2017. 2nd Edition: p. 176-8.
  14. Ruppé EC, Burdet N, de Lastours GV, Lescure FX, Andremont A, Armand-Lefèvre L. *Impact of antibiotics on the intestinal microbiota needs to be re-defined to optimize antibiotic usage* [Internet]. CMI: L. Leibovic. 2018. [Consultado el 25 de abril de 2018]. Disponible en: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(17\)30530-X/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(17)30530-X/fulltext)
  15. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J. Bacteriol.1987. Volume 169; p. 5429–33.
  16. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. *Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria*. Mol. Microbiol. 2000. 36(1), p. 244–6.
  17. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Mol. Microbiol. 2002. 43, p. 1565–75.
  18. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, and Soria E. *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. J. Mol. Evol.2005. 60, p. 174–82.
  19. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G, *CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies*. Microbiol.2005. 151, p. 653–63.
  20. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. Science.2008. 321, p. 960–4.
  21. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E. *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action*. Biol. Direct. 2006. p. 1-7.
  22. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science.2007. 315, p. 1709–12.

23. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature. 2011. 471 (7340), p. 602-7.
24. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science. 2012. 17,p. 816-21.
25. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science.2013.339,p. 819-23.
26. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science.2013. 339,p. 823–26.
27. Lander ES, *The Heroes of CRISPR*. Cell. 2016. 164 (1-2), p. 18-28.
28. Fellmann C., Gowen B.G., Lin P.C., Doudna J.A., Corn J.E., *Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy*. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(2): p.89-100.
29. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. *Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids*. 2015. Nat. Med. 21, p. 256–62.
30. Hua W, , Kaminskia R, Yanga F, Zhanga Y, Cosentinoa L, Lia F, Luob B, Alvarez-Carbonellc D, Garcia-Mesac Y, Karnc J, Mod X, Khalilia K. *RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection*. [Internet]. 2014. [Consultado el 11 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/pnas/early/2014/07/17/1405186111.full.pdf>
31. Demirci Y, Zhang B, Unver T. *CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing*. J Cell Physiol. 2018.233(3), p. 1844-59.
32. Tan W, Proudfoot C, Lillico SG, Whitelaw CB. *Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors*. Transgenic Res. 2016.25(3), p. 273-87.
33. Macias VM, Ohm JR, Rasgon JL, *Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed?* .Int J Environ Res Public Health. 2017. 2;14(9).
34. Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. *Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in Streptococcus thermophiles*. J Bacteriol. 2008. 190 (4), p. 1401-12.
35. Lammoglia-Cobo MF, Lozano-Reyes R, García-Sandoval CD, Avilez-Bahena CM, Trejo-Reveles V, Muñoz-Soto RB, López-Camacho C. *La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas*. [Internet].2016. Vol 2. [Consultado el 8 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2016/ir162e.pdf>

36. Fagen JR, Collias D, Singh AK, Beisel CL, *Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials*. ELSEVIER.2017. p. 57-64.
37. Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA, *Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering*.2016. 164 (1-2), p. 29-44.
38. Westra ER, Dowling AJ, Broniewski JM, van Houte S. *Evolution and Ecology of CRISPR*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2016. 47 (1), p. 307–31.
39. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. *Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials*. Nat Biotechnol. 2014. 32, p. 1146–5039.
40. Cui L, Bikard D, *Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 2016. 44, p. 4243–51.
41. Leon LM, Mendoza SD, Bondy-Denomy J, *How bacteria control the CRISPR-Cas arsenal*. ELSEVIER.2017. p. 87-95.
42. Prilusky J, Hodis E, Canner D, Decatur W, Oberholser K, Martz E, Berchanski A, Harel M, Sussman JL. *Protopedia. A status report on the collaborative, 3D web-encyclopedia of proteins and other biomolecules*. J Struct Biol. 2011.
43. Greene AC. *CRISPR-Based Antibacterials: Transforming Bacterial Defense into Offense*. CellPress.2017.
44. Selle K, Klaenhammer TR, Barrangou R. *CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015. 112, p. 8076–81.
45. Goma AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL, *Programmable removal of bacterial strains by use of genometaiming CRISPR-Cas systems*. MBio. 2014. 5, p. 928–13.
46. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. *Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015. 112, p. 7267–72.
47. Caliendo BJ, Voigt CA. *Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome*. Nat Commun. 2015.
48. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, et al. *C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector*. Science. 2016.
49. Reardon S, *Modified viruses deliver death to antibiotic-resistant bacteria*. Nature. 2017. 546, p. 587-8.
50. Prada-Peñaranda C, Holguín-Moreno V, González-Barrios AF, Vives-Flórez MJ. *Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia Univ. Sci*. 2014. 20 (1), p. 43-60.

51. AINIA. *Seguridad alimentaria y bacteriófagos: Hacia dónde va la I+D orientada al control de patógenos*. [Internet].2015.[Consultado el 20 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/seguridad-alimentaria-y-bacteriofagos-hacia-donde-va-la-i-d-orientada-al-control-de-patogenos/>
52. Yen M, Cairns LS, Camilli A, *A cocktail of three virulent bacteriophages prevents Vibrio cholerae infection in animal models*. Nat Commun. 2017. 8:14187.
53. Yosef I, Goren MG, Globus R, Molshanski-Mor S, Qimron U, *Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction*. Mol Cell. 2017. 66, p. 721–8.
54. Park JY, Moon BY, Park JW, Thornton JA, Park YH, Seo KS. *Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against Staphylococcus aureus*. Sci Rep. 2017. 7:44929.
55. Waller MC, Bober JR, Nair NU, Beisel CL. *Toward a genetic tool development pipeline for host-associated bacteria*. Curr Opin Microbiol. 2017. 38, p. 156–64.
56. Price VJ, Huo W, Sharifi A, Palmer KL. *CRISPR-Cas and restriction-modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in Enterococcus faecalis*. mSphere.2016. 1, e00064–16.
57. Park JY, Moon BY, Park JW, Thornton JA, Park YH, Seo KS. *Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against Staphylococcus aureus*. Scientific Reports. 2017.
58. Kang YK, Kwon K, Ryu JS, Lee HN, Park C, Chung H. *Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance*. Bioconjugate Chem. 2017. 28, p.957–67.
59. Ángela Bernardo. *Victoria ecologista: la modificación con CRISPR se regula como si fueran transgénicos*. [Internet]. 2018. [Consultado el 1 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://hipertextual.com/2018/07/crispr-cas-edicion-genomica-tribunal-justicia-union-europea>
60. Martínez Mojica FJ. Universidad de Alicante. [Internet].Actualizada en 2018. [Consultada el 13 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://imem.ua.es/en/about-us/francisco-juan-martinez-mojica.html>