

# SISTEMAS CRISPR-CAS PARA COMBATIR LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

## CRISPR-CAS SYSTEMS TO COMBAT ANTIBIOTIC RESISTANCE

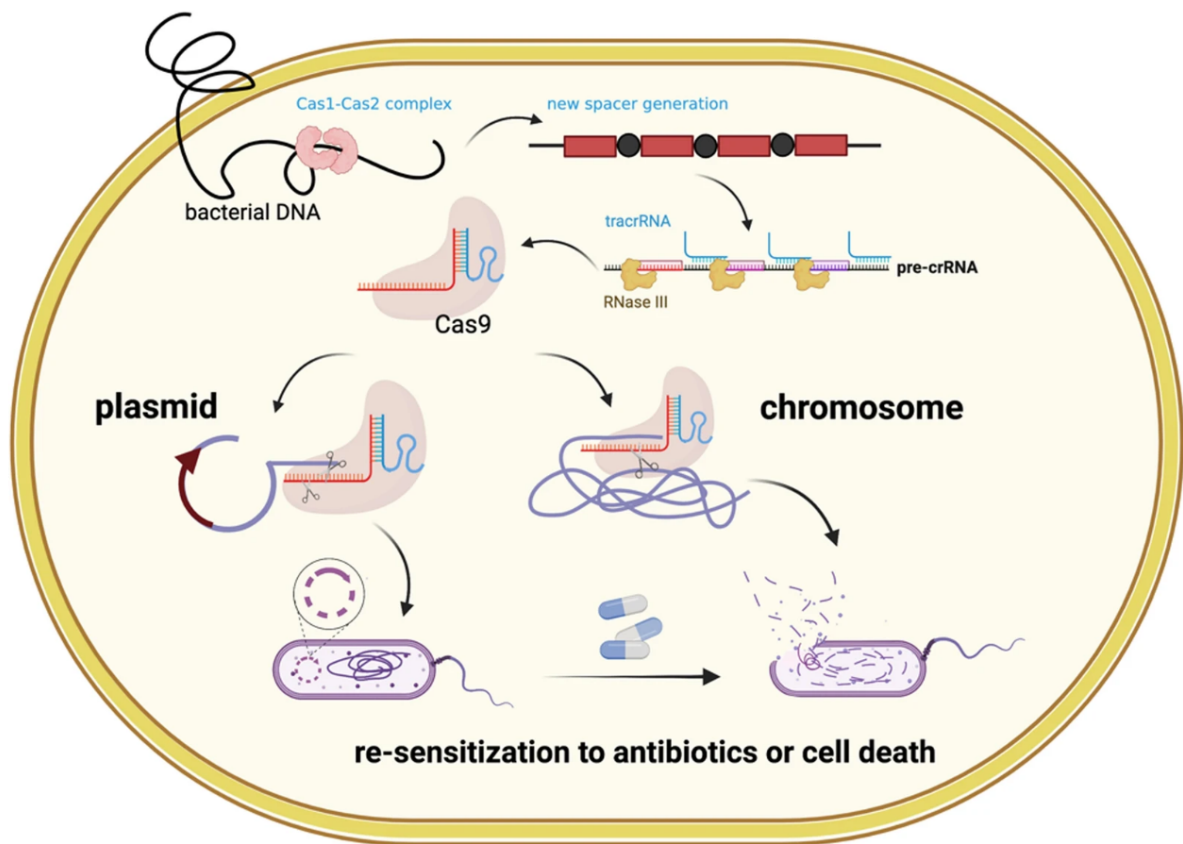


Figura tomada de Wu et al., 2021<sup>(18)</sup>

Trabajo de Fin de Grado  
**ADRIÁN GÓMEZ DEL ROSARIO**

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth  
Grado en Biología. Julio de 2023

# Índice

---

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
1.1 Problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos.....	2
1.2 Estrategias para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos.....	4
1.3 Técnicas CRISPR-Cas: componentes, funcionamiento y aplicaciones.....	5
<b>2. Objetivos</b> .....	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
<b>3. Metodología</b> .....	10
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	11
4.1 Uso de técnicas CRISPR-Cas para combatir bacterias resistentes a los antibióticos.....	11
4.1.1 <i>Detección de bacterias resistentes a los antibióticos por sistemas CRISPR-Cas</i> .....	11
4.1.2 <i>Eliminación de genes de resistencia</i> .....	14
4.1.3 <i>Destrucción directa de las bacterias resistentes a los antibióticos</i> .....	16
4.2 Modos de aplicación de sistemas CRISPR-Cas.....	17
4.2.1 <i>Bacteriófagos</i> .....	17
4.2.2 <i>Plásmidos</i> .....	21
4.2.3 <i>Nanopartículas</i> .....	23
4.3 Limitaciones e inconvenientes del uso de sistemas CRISPR-Cas.....	24
<b>5. Conclusiones</b> .....	26
<b>Conclusions</b> .....	27
<b>Bibliografía</b> .....	28

## Resumen

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel global. Esta se ha visto agravada por la escasez de nuevos antibióticos efectivos disponibles en la práctica clínica, lo que ha llevado a la necesidad de investigar nuevas estrategias para combatir la RAM. Entre ellas están los sistemas CRISPR-Cas. En este TFG se planteó realizar una revisión bibliográfica para conocer las aproximaciones que se están investigando para utilizar los sistemas CRISPR-Cas como antimicrobianos específicos. Estos sistemas están mostrando una alta especificidad y efectividad para la detección rápida de las bacterias resistentes, la resensibilización de las bacterias y la eliminación directa de las cepas resistentes. Además, son varios los vehículos que se están empleando de manera efectiva para la administración de estos sistemas al interior bacteriano. La utilización de los sistemas CRISPR-Cas no está carente de efectos secundarios, y que, como cualquier tecnología, tiene limitaciones técnicas. Así, algunas proteínas Cas pueden ser citotóxicas, aunque esto puede ser paliado con el vehículo adecuado. Un desafío técnico a superar es la elección del vehículo. En conclusión, los sistemas CRISPR-Cas se vislumbran como una excelente alternativa para combatir la RAM.

**Palabras clave:** resistencia a los antibióticos, genes de resistencia, CRISPR-Cas

## Abstract

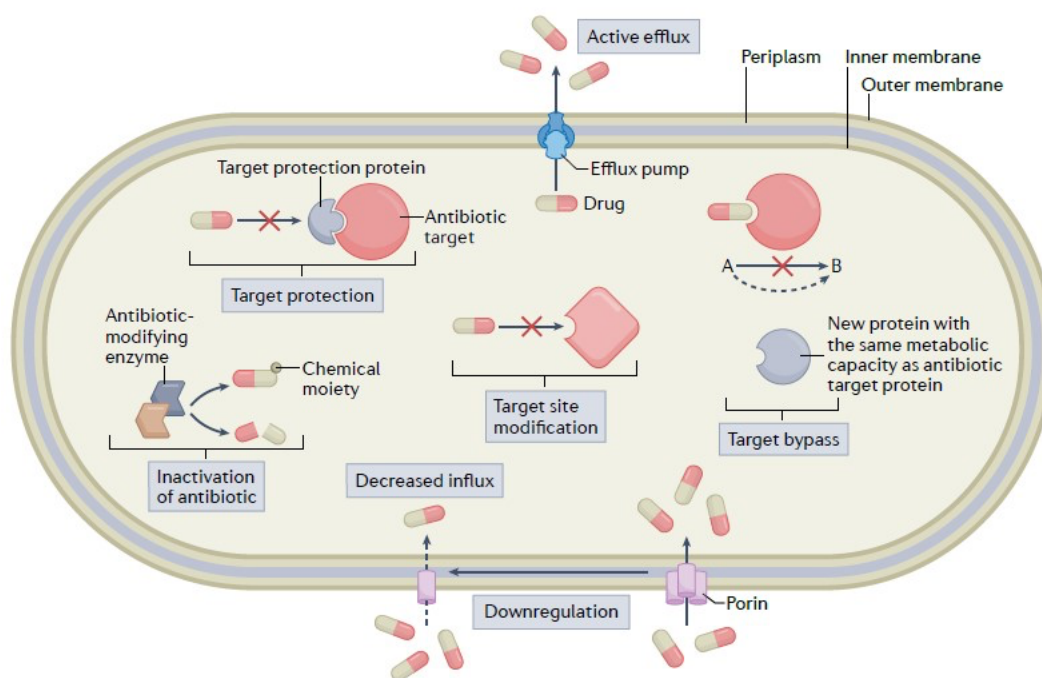
Antimicrobial resistance (AMR) is one of the major global health problems. It has been further exacerbated by the lack of new effective antibiotics available in clinical practice, which has led to the need for exploring new strategies to combat AMR. Among these strategies are CRISPR-Cas systems. In this TFG, a literature review was conducted to understand the approaches that are being investigated for using CRISPR-Cas systems as specific antimicrobials. These systems are showing high specificity and effectiveness in the rapid detection of AMR bacteria, resensitization of bacteria, and direct elimination of resistant strains. Additionally, several delivery vehicles are being effectively used for administering these systems into bacterial cells. The use of CRISPR-Cas systems is not without side effects, and like any technology, it has technical limitations. For instance, some Cas proteins can be cytotoxic, although this can be mitigated with the appropriate delivery vehicle. A technical challenge to overcome is the choice of the delivery vehicle. In conclusion, CRISPR-Cas systems are emerging as an excellent alternative for combating AMR.

**Keywords:** antibiotic resistance, resistance genes, CRISPR-Cas

# 1. Introducción

## 1.1 Problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos

Las bacterias resistentes a los antimicrobianos (RAM) son aquellas que han desarrollado mecanismos para neutralizar o mitigar el efecto de estos fármacos disminuyendo así su eficacia (**Figura 1**). Alguno de los mecanismos de resistencia más comunes son la destrucción enzimática del antibiótico, siendo el ejemplo más representativo el de las  $\beta$ -lactamasas, las cuales son unas enzimas encargadas de inhabilitar la familia de los  $\beta$ -lactámicos mediante la hidrólisis de su anillo  $\beta$ -lactámico.<sup>(2)</sup> La presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico hacia el exterior impidiendo de esta forma su acción.<sup>(3)</sup> Y la formación de biopelículas, dificultando que el antibiótico llegue al interior bacteriano y pueda actuar.<sup>(4)</sup>

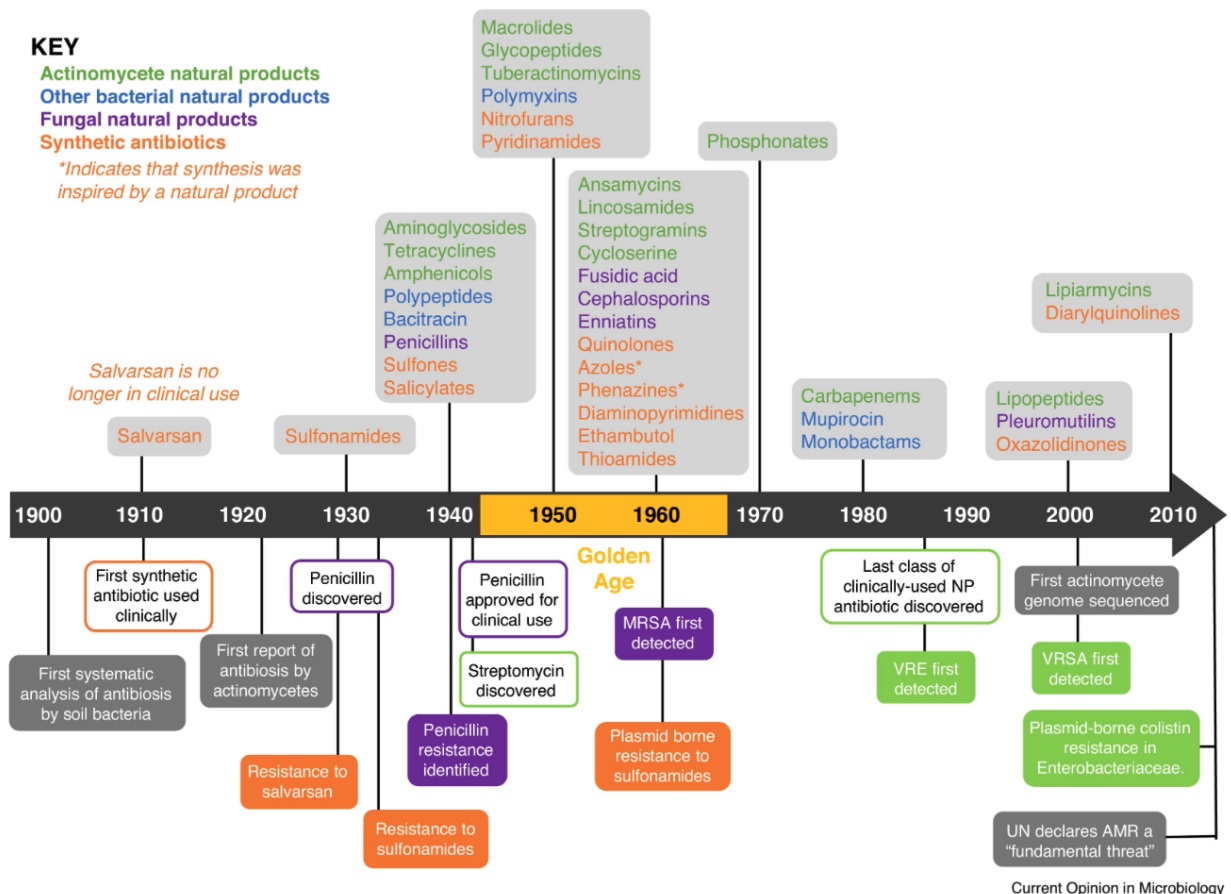


**Figura 1.** Descripción general de los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos.<sup>(1)</sup>

Una cepa bacteriana puede volverse resistente a los antibióticos por dos vías principalmente: mediante mutaciones génicas o mediante la transmisión horizontal de genes de resistencia, principalmente a través de plásmidos mediante el mecanismo de conjugación.<sup>(5)</sup>

La problemática de las bacterias RAM se remonta a prácticamente desde la introducción del primer antibiótico en la práctica clínica a principios del siglo XX, la penicilina. En la década

de 1930 se detectaron las primeras cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a sulfonamidas.<sup>(6)</sup> Posteriormente, en los años 40, surgieron *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistentes a la penicilina en hospitales en Londres. Los años 60 estuvieron marcados por la aparición de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), el primer antibiótico antirresistencia. Durante la década de 1980 surgieron los Enterococos resistentes a Vancomicina (ERV). Por último, recién iniciado el siglo XXI, se desarrollaron cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (SARV). (Figura 2)



**Figura 2.** Cronología que muestra la década en la que llegaron las nuevas clases de antibióticos al mercado. Los antibióticos están coloreados según su origen: verde = actinomicetos, azul = otras bacterias, morado = hongos y naranja = sintéticos. En la parte inferior de la línea de tiempo se encuentran las fechas clave relacionadas con el descubrimiento de antibióticos y la resistencia antimicrobiana, incluidos los primeros informes de cepas resistentes a los antibióticos como el *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a la vancomicina (SARV) y la resistencia a la colistina transmitida vía plásmidos en *Enterobacteriaceae*.<sup>(7)</sup>

En la actualidad, la RAM de las bacterias es una de las mayores amenazas para la salud a combatir durante los próximos años. Un estudio de 2019 reveló que durante ese año fallecieron en torno a 4,95 millones de personas por causas relacionadas con bacterias RAM, incluyendo

unos 1,27 millones de muertes alrededor de todo el mundo por causas directamente atribuibles a bacterias RAM.<sup>(8)</sup> Las previsiones indican que este problema se agravará en las próximas décadas, ya que se estima que para el 2050 morirán alrededor de 10 millones de personas anualmente por causas relacionadas con bacterias RAM si se mantiene la misma tendencia.<sup>(9)</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017 una lista de las 12 familias bacterianas más peligrosas para la salud humana, y las dividió en tres categorías según la urgencia que hay en desarrollar nuevos antibióticos para combatirlas.<sup>(10)</sup> Las tres categorías establecidas por la OMS son: prioridad 1 (CRÍTICA), en la que se incluyen *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceae resistentes a los carbapenémicos; prioridad 2 (ELEVADA), constituida por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp. resistente a las fluoroquinolonas, *Salmonellae* resistentes a las fluoroquinolonas y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a la cefalosporina y a las fluoroquinolonas; prioridad 3 (MEDIA), conformada por *Streptococcus pneumoniae* sin sensibilidad a la penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina y *Shigella* spp. resistente a las fluoroquinolonas.

No obstante, hay otras decenas de bacterias no incluidas en la lista de la OMS que también suponen un riesgo para la salud humana, como cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB), *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación entre otras.<sup>(11)</sup>

## **1.2 Estrategias para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos**

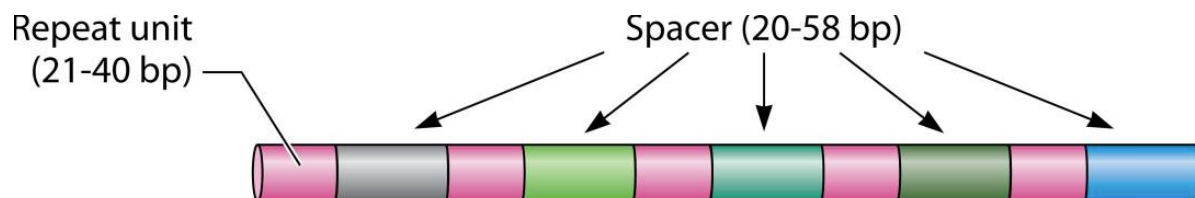
La conocida como “Edad de Oro” de los antibióticos fue el periodo que abarcó desde mediados de los 40, hasta la década de los 60, y es conocida por ser el periodo de mayor auge en el descubrimiento de antibióticos de la historia. A partir de entonces, debido al abuso de estos fármacos en el ganado y en humanos empezó a aumentar la RAM de forma significativa.<sup>(12)</sup> Paralelamente, en la década de los 90 se detuvo casi por completo el desarrollo de nuevos antibióticos.<sup>(13)</sup> Por todo ello, se están investigando alternativas para combatir las cepas RAM.

Entre estas alternativas destaca el uso de anticuerpos que eliminan a estas bacterias de forma específica;<sup>(14)</sup> los bacteriófagos, los cuales son unos virus especializados en infectar

bacterias;<sup>(15)</sup> vacunas para prevenir las infecciones bacterianas;<sup>(16)</sup> péptidos antimicrobianos que destruyen a los microorganismos;<sup>(17)</sup> y también los sistemas CRISPR-Cas, que al ser herramientas de edición genética, permite combatir la resistencia desde múltiples frentes.<sup>(18, 19)</sup>

### 1.3 Técnicas CRISPR-Cas: componentes, funcionamiento y aplicaciones

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas asociadas a proteínas Cas o más comúnmente conocido como complejo CRISPR-Cas (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Cas proteins*), es un mecanismo de inmunidad adquirida presente en bacterias y arqueas. Estas repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas provienen de una sección de ADN bacteriano llamado matriz CRISPR, que a su vez tiene dos componentes: repeticiones y espaciadores (**Figura 3**). Las repeticiones son segmentos de ADN de unas 21-40 pb que tienen la misma secuencia. Se denominan palindrómicas ya que poseen un tramo de bases seguido por las bases complementarias de la secuencia en el orden inverso. Por otro lado, los espaciadores son pequeños fragmentos de ADN (normalmente vírico) de unas 20-58 pb que sirven como memoria inmune de infecciones previas, para identificar y combatir con mayor eficacia a las mismas. Estas se encuentran entre las repeticiones, y suelen ser secuencias distintas.<sup>(20, 21)</sup>

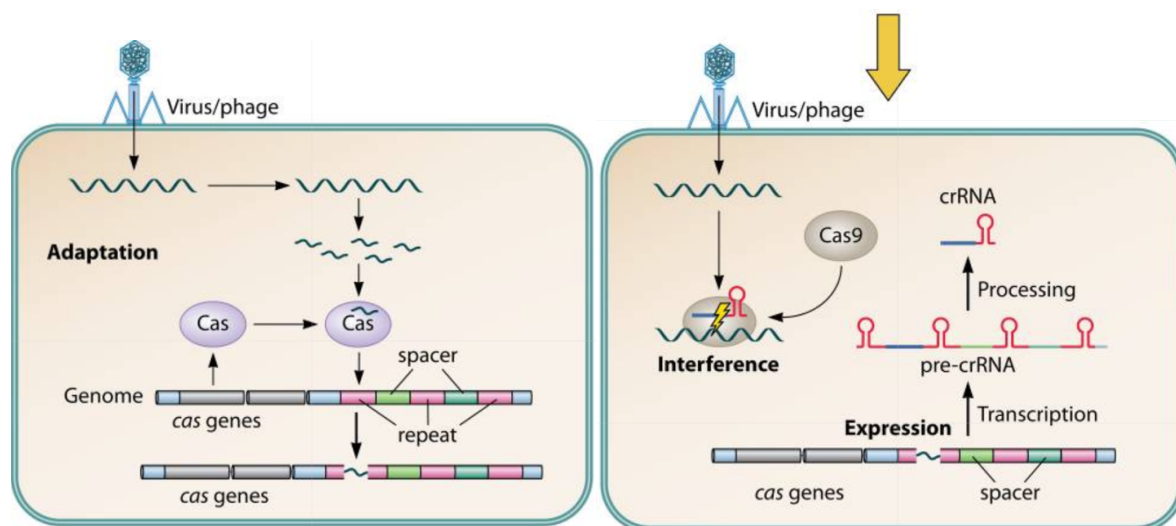


**Figura 3.** Esquema de una matriz CRISPR. Se observan a las repeticiones intercaladas por espaciadores.<sup>(21)</sup>

El sistema CRISPR-Cas tiene dos componentes principales, una proteína encargada de cortar el ADN, perteneciente a la familia Cas y una molécula de ARN guía (ARNg), que contiene una secuencia complementaria al fragmento de ADN de interés.

La respuesta inmune del complejo CRISPR-Cas comprende tres fases diferentes: adaptación, expresión e interferencia (**Figura 4**). Durante la fase de adaptación, una proteína Cas localiza y se une a una secuencia en el ADN objetivo llamada PAM (del inglés *Protospacer Adjacent*

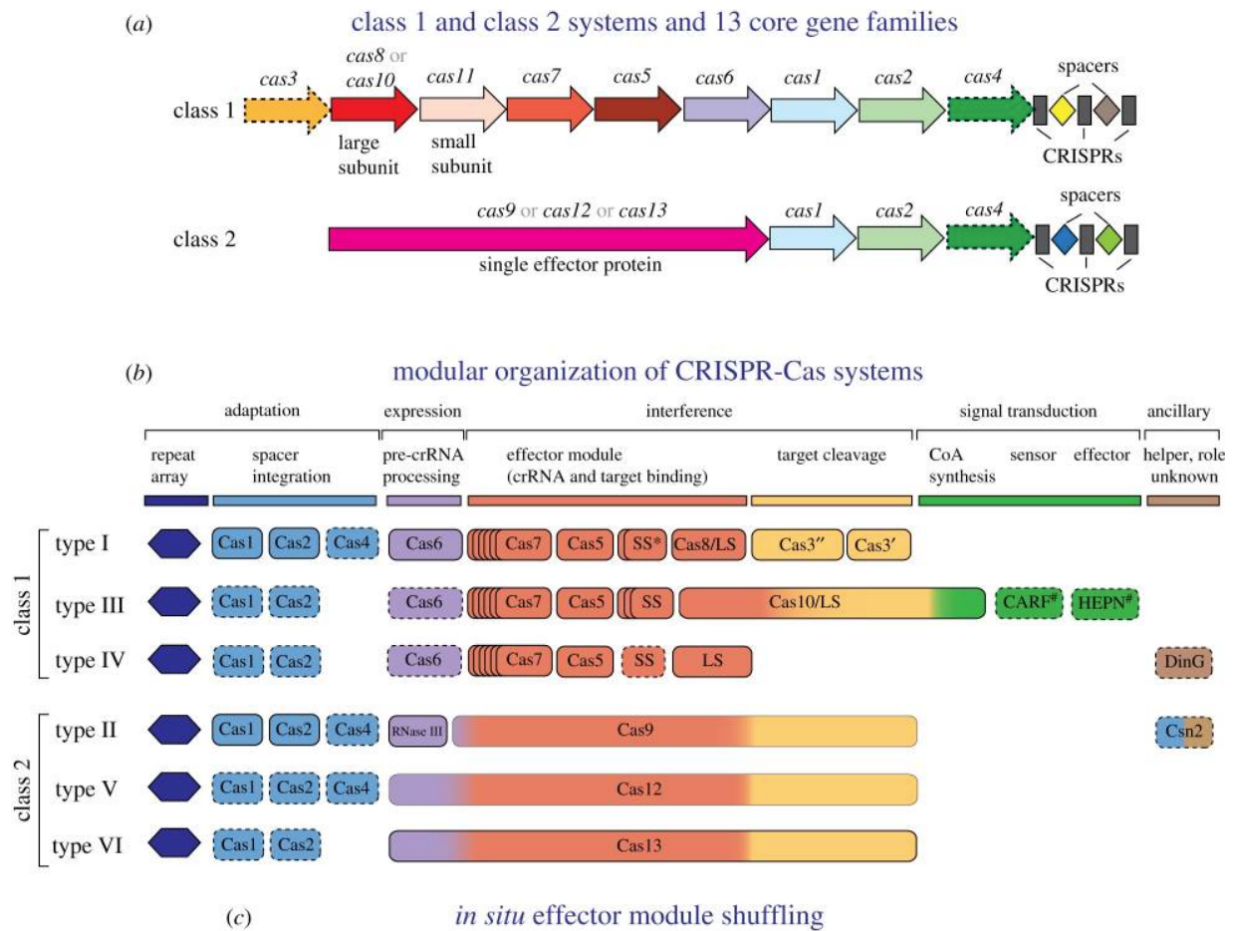
*Motive*) o motivo adyacente del protoespaciador, de 2-4 pb y provoca una rotura de la doble cadena, lo que provoca la liberación de un fragmento de ADN. Este fragmento conocido como protoespaciador, se une entre dos repeticiones de la matriz CRISPR del genoma bacteriano, pasando a ser a partir de este momento un espaciador propiamente dicho. Cabe destacar que en algunos sistemas CRISPR-Cas, la adquisición de espaciadores se obtiene a partir de fragmentos de ARN por medio de una transcriptasa inversa (RT). A continuación, en la etapa de expresión, la matriz CRISPR se transcribe en pre-ARNcr, que a su vez se procesa por medio de Cas6 o una ARNasa externa hasta obtener ARNcr (ARN CRISPR) totalmente maduro. Por último, en la etapa final de interferencia, se usa este ARNcr como ARNg. La proteína Cas se une a la secuencia PAM del ADN objetivo (por ejemplo, de un bacteriófago), se desenrolla parte del ADN y esto permite al ARNg unirse a su secuencia complementaria en el mismo. Posteriormente, la proteína Cas provoca una rotura de la doble cadena.<sup>(22)</sup> Cabe destacar que estas fases difieren según la clase y tipo de sistema CRISPR-Cas que estemos hablando.



**Figura 4.** Proceso inmunitario de CRISPR-Cas. (Izquierda) Adaptación, expresión (derecha) e interferencia (derecha).<sup>(21)</sup>

Los sistemas CRISPR-Cas se dividen en dos clases diferentes. Los sistemas de Clase 1 tienen complejos efectores con múltiples subunidades de proteínas Cas. Por el contrario, los sistemas de Clase 2 poseen una única proteína Cas grande y multidominio (**Figura 5**). A su vez, cada clase de CRISPR-Cas se divide en tres tipos cada uno. La Clase 1 en los tipos I, III y IV; mientras que la Clase 2 en los tipos II, V y VI. Los tipos también se dividen en diferentes subtipos dependiendo principalmente de la proteína Cas asociada y su modo de actuación.<sup>(22)</sup>



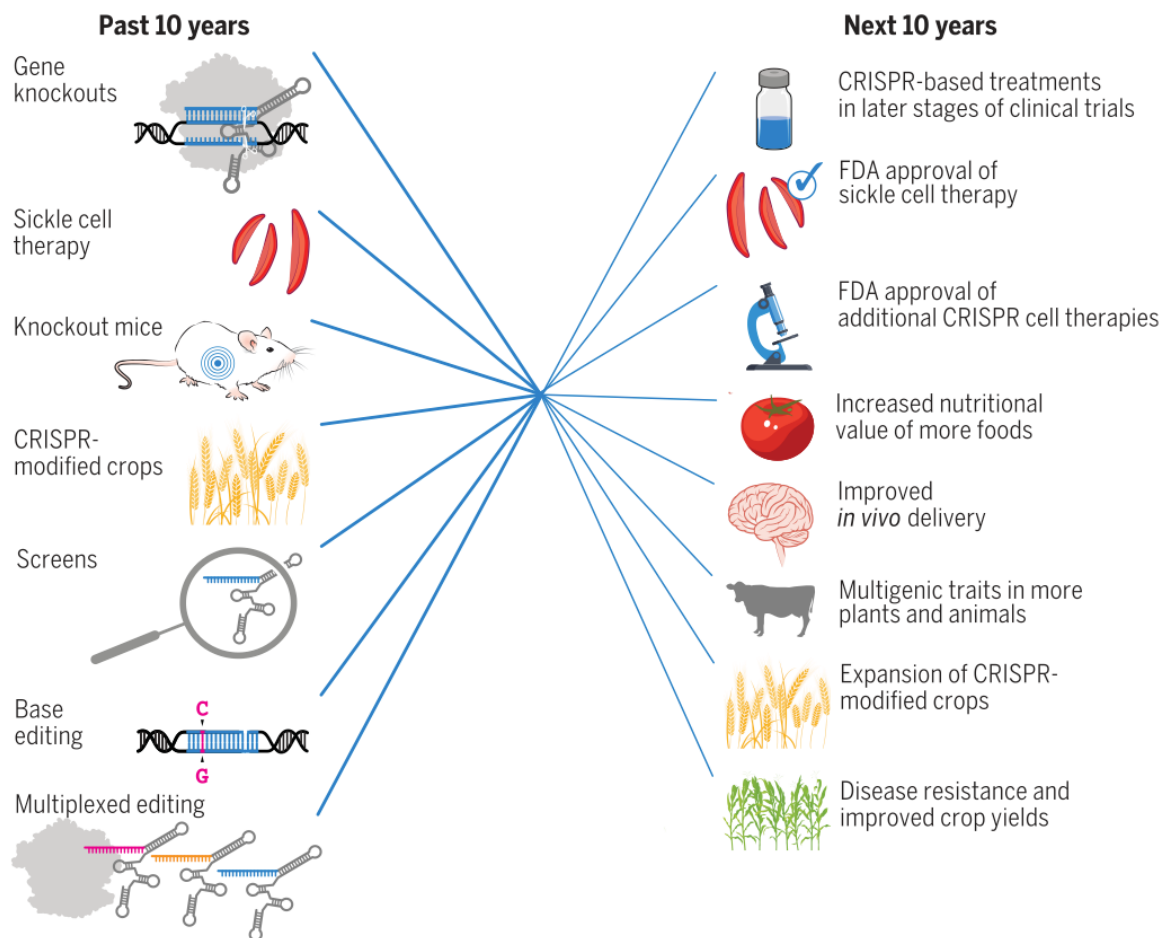


**Figura 5.** Sistemas CRISPR-Cas de clase 1 y clase 2: características principales, organización modular (a) La estructura general de los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 (complejo efector de múltiples proteínas) y clase 2 (complejo efector de una única proteína). Los genes se muestran como flechas; los genes homólogos se muestran con el mismo color. (b) Los principales componentes básicos de los tipos de sistemas CRISPR-Cas. Un asterisco indica la supuesta subunidad pequeña (SS) que podría fusionarse con la subunidad grande en varios subtipos de tipo I. El # junto a las etiquetas de dominio CARF y HEPN indica que otros dominios desconocidos de sensores y efectores. Los genes prescindibles se indican con un contorno discontinuo.<sup>(22)</sup>

Los sistemas CRISPR-Cas fueron propuestos como herramientas de edición genética por primera vez en 2012 por las ganadoras del Premio Nobel de Química 2020 Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna.<sup>(23)</sup> Desde entonces, los sistemas CRISPR-Cas han sido empleados como una de las tecnologías de edición genética con mayor potencial en la actualidad, debido a su adaptabilidad y especificidad. Actualmente tienen una gran cantidad de aplicaciones, entre las que encontramos: inactivación de genes, cribado, tratamiento de enfermedades celulares, modificación de cultivos, edición de bases y edición multiplexada. En los próximos años se prevee que se aprueben múltiples tratamientos de enfermedades de toda índole basados en sistemas CRISPR-Cas, incrementar el valor nutricional de los alimentos

mediante edición genética basada en CRISPR-Cas, así como aprobar y comercializar el tratamiento de múltiples enfermedades celulares entre otros. (Figura 6)

Todas estas son aplicaciones muy fascinantes que pueden significar una auténtica revolución en infinitud de campos científicos, no obstante, es importante tener en cuenta que la utilización de estas técnicas conllevan importantes consideraciones éticas y de seguridad. A efectos de este TFG nos centraremos en las investigaciones que se están llevando a cabo para explorar las utilidades de los sistemas CRISPR-Cas para combatir las bacterias RAM.



**Figura 6.** La última década de la tecnología CRISPR se ha centrado en desarrollar plataformas para generar la inactivación de genes, crear ratones y otros modelos animales con genes inactivados, realizar tamizajes genéticos y realizar edición multiplexada. Las aplicaciones de CRISPR en medicina, agricultura y ganadería ya están empezando y serán el enfoque de la próxima década.<sup>(24)</sup>

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Llevar a cabo una revisión bibliográfica para conocer las diferentes aproximaciones que se están investigando con la finalidad de usar las técnicas CRISPR-Cas para combatir la resistencia a los antibióticos.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Describir las diferentes estrategias que se están utilizando para luchar contra las bacterias resistentes a los antibióticos empleando los sistemas CRISPR-Cas.

2. Analizar los diferentes vehículos utilizados para administrar los sistemas CRISPR-Cas en las células.

3. Presentar los posibles efectos secundarios y riesgos asociados al uso de tecnologías CRISPR-Cas para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos.

4. Discutir la efectividad y viabilidad del uso de técnicas CRISPR-Cas, identificando los desafíos y obstáculos técnicos que deben superarse para que esta tecnología pueda aplicarse con el fin de luchar frente a la resistencia a los antibióticos.

### **3. Metodología**

Para la elaboración del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha realizado una labor de investigación y recopilación bibliográfica en bases de datos con gran prestigio y rigor científico, con el fin de obtener información lo más veraz y contrastada posible. Las bases de datos empleadas han sido: MEDLINE, mediante el motor de búsqueda PubMed, ScienceDirect (Elsevier) y Google Académico. También se ha consultado páginas web de organismos oficiales como la OMS. Así mismo, se analizaron artículos de reconocidas revistas científicas como Science y The Lancet relacionados con la temática del presente trabajo.

En primera instancia, se seleccionaron una serie de artículos que constituyeron la base sobre la cual se construyó la introducción de este trabajo. Posteriormente, se realizó una búsqueda de información orientada a tratar el objetivo general y los objetivos específicos. Se dio prioridad a aquellos artículos y otras publicaciones escritos en inglés y español con fechas que abarcan desde el 2015 hasta 2023, con la intención de obtener información actualizada. De forma excepcional, cuando se consideró necesario obtener información adicional, se consultaron artículos anteriores al 2015. Para la búsqueda de los artículos deseados se emplearon diferentes combinaciones de palabras clave como: “CRISPR-Cas systems”, “antibiotic resistance”, “AMR”, solo por nombrar algunos ejemplos. A los anteriores hay que añadirles el uso de operadores booleanos como: “AND”, “OR”, “NOT” y “[ ]” según las necesidades de búsqueda.

Una vez realizadas las búsquedas correspondientes, se evaluó el contenido de dichos artículos (títulos, resúmenes, etc) con el fin de identificar, seleccionar y extraer la información que se consideró más relevante, únicamente de aquellos artículos directamente relacionados con los objetivos planteados en el presente TFG. De forma adicional, se consultó la bibliografía presente en aquellos artículos y que no fueron localizados en primera instancia empleando los criterios anteriormente expuestos, con el fin de complementar la información.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Uso de Técnicas CRISPR-Cas para combatir bacterias resistentes a los antibióticos

Las técnicas CRISPR-Cas están siendo investigadas para combatir la resistencia a los antibióticos mediante diferentes enfoques: detección rápida de bacterias resistentes (funcionando como eficaces detectores), eliminando los genes de resistencia (volviendo a estas bacterias sensibles a los antibióticos nuevamente); o provocando la muerte directa de estas bacterias mediante la destrucción específica de genes vitales para su supervivencia. A continuación, se abordará cada una de estas aproximaciones y se destacarán las principales ventajas y desventajas de cada una de ellas.

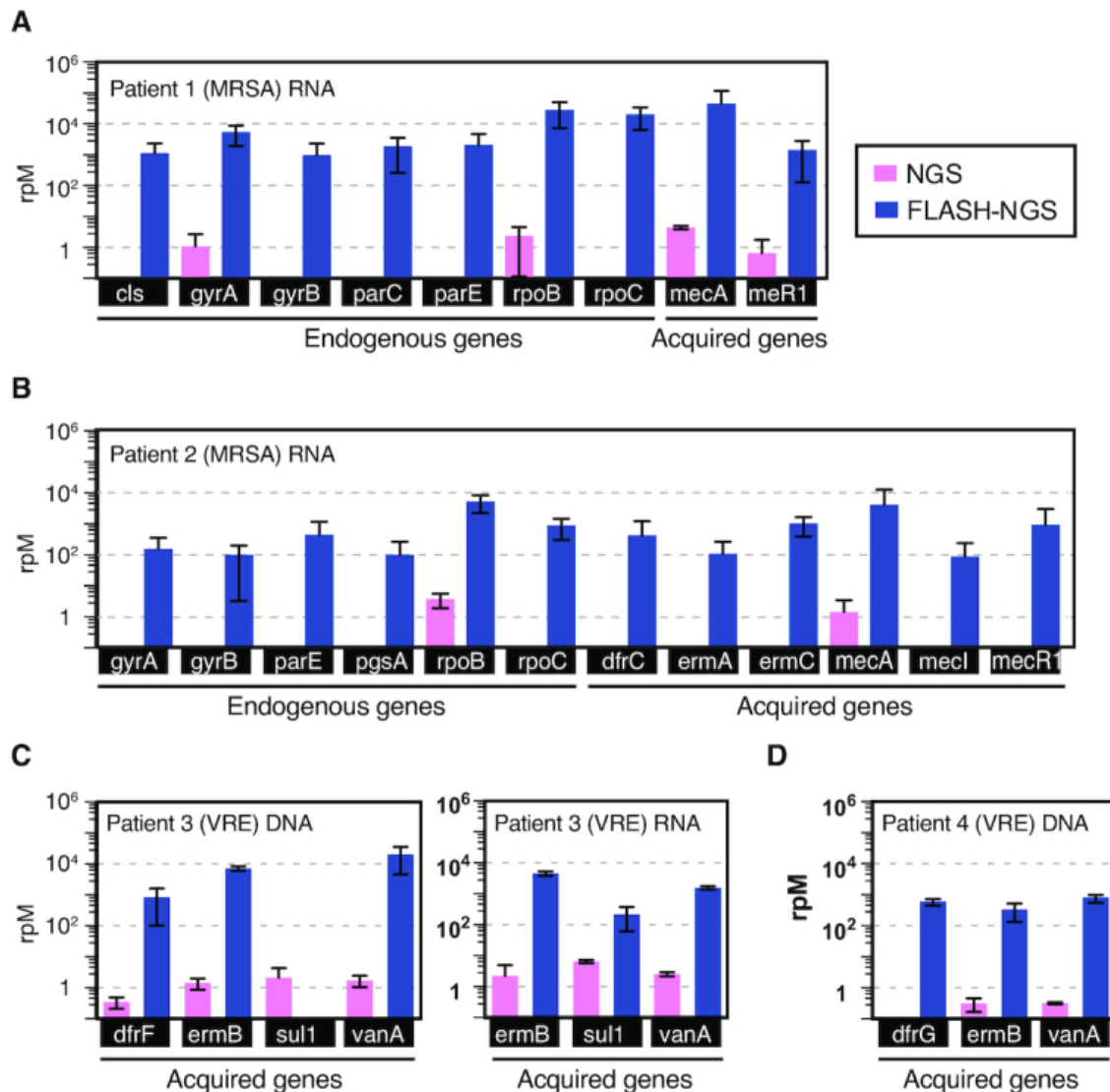
#### 4.1.1 Detección de bacterias resistentes a los antibióticos

Un aspecto de vital importancia para combatir las bacterias RAM es la capacidad de poder llevar a cabo una detección rápida y precisa de las cepas resistentes. En la actualidad, los protocolos de detección en hospitales y laboratorios emplean los inmunoensayos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) con este fin. Adicionalmente, los sistemas CRISPR-Cas han surgido como una potente alternativa gracias a su gran modularidad y especificidad. A continuación, se muestran algunos ejemplos de investigaciones que emplean los sistemas CRISPR-Cas para detectar genes de resistencia.

Quan *et al.* En 2019 <sup>(25)</sup> desarrollaron una innovadora técnica denominada FLASH-NGS (del inglés, *Finding Low Abundance Sequences by Hybridization-Next Generation Sequencing*). FLASH utiliza el complejo CRISPR-Cas9 para la detección multiplexada de genes de resistencia a los antibióticos. Esta técnica emplea un conjunto de CRISPR-Cas9 diseñados para escindir una secuencia de ADN del tamaño adecuado para la secuenciación con la plataforma Illumina. En primer lugar, el ADN objetivo es bloqueado por una fosfatasa y posteriormente es fragmentado por el complejo CRISPR-Cas9. Los productos resultantes son ligados con unos adaptadores, amplificados y finalmente secuenciados.<sup>(25)</sup>

En dicho estudio se obtuvieron muestras procedentes de cuatro pacientes positivos en infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (Pacientes A y B: SARM, Pacientes C y D: ERV), y todas fueron sometidas a Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y FLASH-NGS. Como se observa en la **Figura 7**, el enriquecimiento medio por muestra fue

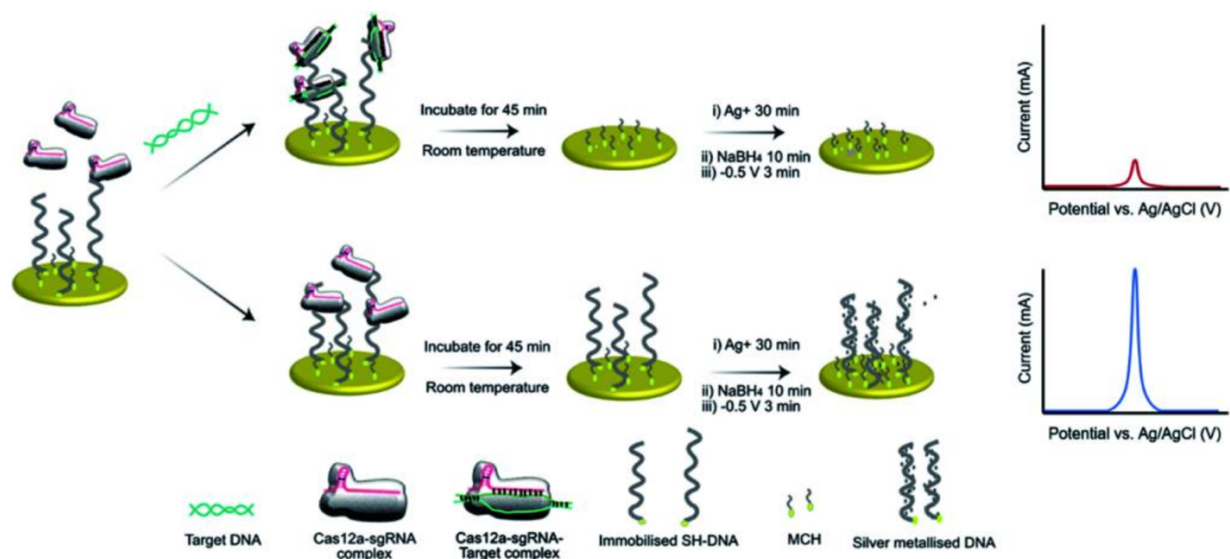
unas 5000 veces superior en FLASH-NGS en comparación con la NGS únicamente. Además, en muchas ocasiones la técnica FLASH-NGS fue capaz de detectar genes que la NGS estándar no detectó. De esta manera, se concluyó que la técnica FLASH-NGS basada en CRISPR-Cas9 era más precisa y específica que la NGS ordinaria.<sup>(25)</sup>



**Figura 7.** Resultado de la técnica FLASH en muestras respiratorias. Número de lecturas que se alinean con genes específicos en experimentos de secuenciación NGS y FLASH-NGS en muestras de líquido respiratorio de (A) paciente 1, (B) paciente 2, (C) paciente 3 y (D) paciente 4. Las barras y barras de error representan la media y la desviación estándar.<sup>(25)</sup>

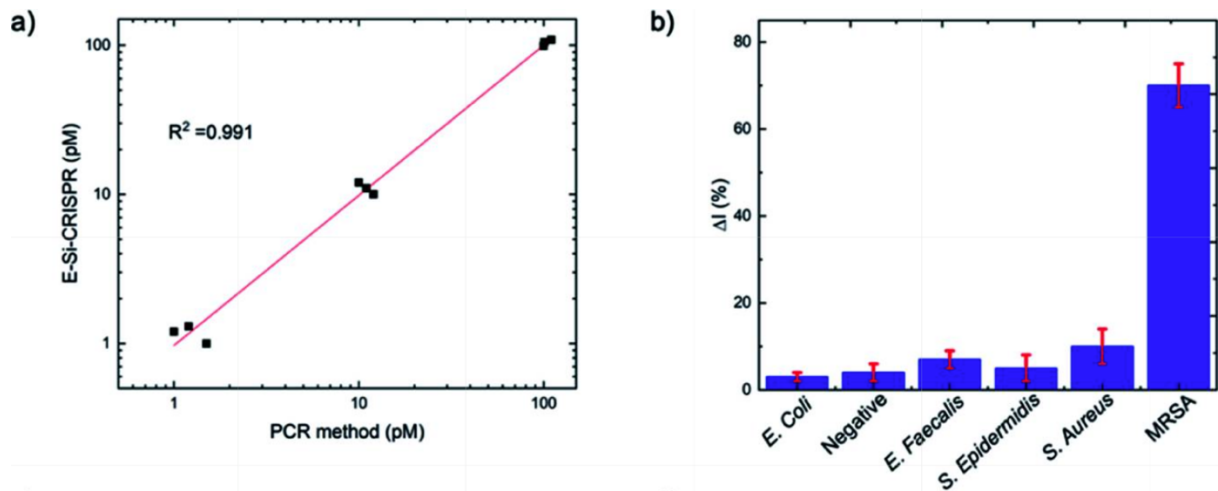
Suea-Ngam, Howes, & deMello en 2021 <sup>(26)</sup> desarrollaron un biosensor electroquímico ultrasensible CRISPR-Cas12a que emplea la metalización con plata para detectar, sin amplificación previa, el gen *mecA*, que genera resistencia a la meticilina en cepas SARM

(Figura 8). Esta técnica se denominó biosensor electroquímico CRISPR/Cas sin amplificación que utiliza metalización con plata (E-Si-CRISPR). Funciona de la siguiente manera: en presencia del gen *mecA*, el complejo CRISPR-Cas12a lo detecta y realiza una escisión en cis (donde la encima Cas corta específicamente el gen objetivo unido al protoespaciador). Esto activa la escisión en trans (cortes aleatorios en la monocadena de ADN), lo que degrada la capa superficial de la monocadena de ADN en la superficie del electrodo. Posteriormente, se realiza la metalización con plata, con el objetivo de mejorar la detección, ya que el grado de deposición de plata será proporcional a la cantidad de ADN monocatenario restante, y por ende, a la cantidad inicial del gen *mecA*. La señal electroquímica final se lee mediante voltametría de onda cuadrada.<sup>(26)</sup>



**Figura 8.** Esquema de la técnica E-Si-CRISPR. El ADN monocatenario inmovilizado en el electrodo es eliminado por Cas12a, sólo en presencia de un gen objetivo. La adición posterior de Ag<sup>+</sup> y NaBH<sub>4</sub> produce la metalización por plata, y se aplica un potencial de -0,5 V, produciendo una señal mínima (resultado positivo en el objetivo). En ausencia del gen diana, el ADN monocatenario no se puede eliminar, lo que produce una señal electroquímica más alta (resultado negativo en el objetivo).<sup>(26)</sup>

Como se puede observar en la **Figura 9**, se observa que la técnica E-Si-CRISPR permite la detección del gen *mecA* con una alta sensibilidad, selectividad y precisión incluso en soluciones con bacterias lisadas o múltiples especies y cepas bacterianas (*E. coli*, *E. faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus* y SARM). Por último, se compararon los resultados con los obtenidos mediante una PCR estándar, demostrando un rendimiento muy similar.<sup>(26)</sup>



**Figura 9.** Comparación de las concentraciones de *mecA* entre el E-Si-CRISPR y la PCR a 1, 10 y 100 pM. (b) Prueba de especificidad para SARM frente a otras bacterias para la técnica E-Si-CRISPR, revelando una excelente especificidad.<sup>(26)</sup>

Estos estudios <sup>(25,26)</sup> y otros similares <sup>(27,28,29)</sup> demuestran que los sistemas CRISPR-Cas tienen un gran potencial para detectar genes de resistencia tanto en el cromosoma como en plásmidos.

Estos sistemas tienen una gran especificidad, sensibilidad y rapidez a la hora de detectar genes RAM y siendo capaces de detectar múltiples de estos genes simultáneamente. En contraposición, son técnicas que requieren una alta cualificación, los costos de su uso pueden ser altos debido a ser técnicas aún no muy estandarizadas, requieren de más estudios para su validación y optimización, y por último puede ser ineficaz para detectar nuevas variantes RAM.

#### 4.1.2 Eliminación de genes de resistencia

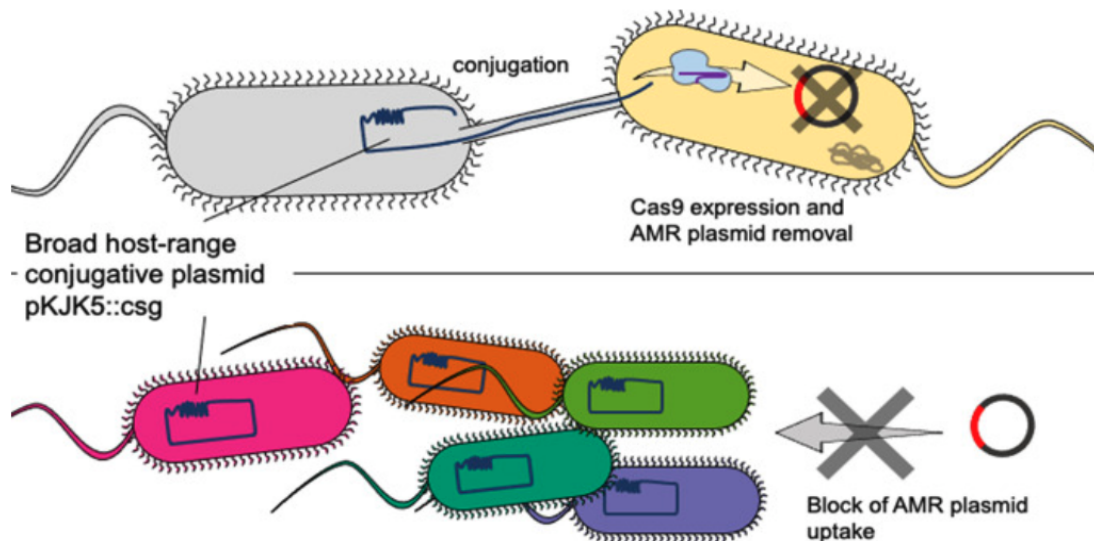
Una segunda aproximación se centra en la eliminación de los genes que provocan resistencia a los antibióticos, para de esta forma resensibilizar a las bacterias nuevamente a los antibióticos. Como se comentó en el punto 1.1 del presente TFG, los genes de resistencia a antibióticos se pueden localizar tanto en el cromosoma como en plásmidos. Por tanto, los diferentes enfoques para eliminar los genes de resistencia a los antibióticos van a dividirse según el objetivo sea destruir genes presentes en los plásmidos o aquellos presentes en el cromosoma.

Algunos de los genes RAM que están siendo el foco de muchos estudios son aquellos genes de resistencia a betalactámicos como *blaNDM*,<sup>(30)</sup> de resistencia a fluoroquinolonas como *gyrA*,<sup>(31)</sup> resistencia a tetraciclinas como *tet(A)* <sup>(32)</sup> y de resistencia a aminoglucósidos como *aac(6')*.<sup>(33)</sup>



Qiu *et al.* En 2018 <sup>(34)</sup> realizaron un experimento basado en CRISPR-Cas9 mediado por plásmido para revertir la resistencia a quinolonas provocada por el gen *gyrA* presente en los cromosomas de algunas cepas de *E. coli*. Comprobaron que tras exponer la cepa S462231L83S de *E. coli* resistente a quinolonas a CRISPR-Cas9, esta sufría una mutación en la posición 249, volviéndola sensible a ciprofloxacina y la enrofloxacin, revirtiendo en gran parte su resistencia a quinolonas.<sup>(34)</sup>

Por otra parte, Walker-Sünderhauf *et al.* <sup>(35)</sup> en 2023 han diseñado un experimento basado en CRISPR-Cas9 para la eliminación del plásmido pHERD30T portador del gen *aacC1* que codifica resistencia a gentamicina. Eligieron al plásmido pKJK5 como vehículo para transportar el complejo CRISPR-Cas9 por su amplio rango de huéspedes y su relativa facilidad de propagación. Tal y como la **Figura 10** muestra, el plásmido pKJK5::csg (plásmido pKJK5 recombinado con CRISPR-Cas9) actuaba de dos formas distintas: por un lado, actuaba como barrera impidiendo la entrada de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos (pHERD30T) y por otro lado, si el plásmido pHERD30T ya se encontraba en el interior bacteriano, CRISPR-Cas9 se encargaba de eliminarlo.<sup>(35)</sup>



**Figura 10.** En la parte superior se observa como el plásmido pKJK5::csg elimina el plásmido con genes RAM. En la parte inferior se observa como el plásmido pKJK5::csg impide la entrada de otros plásmidos portadores de genes RAM.<sup>(35)</sup>

Estos estudios <sup>(34, 35)</sup> y otros similares <sup>(36, 37, 38)</sup> demuestran que los sistemas CRISPR-Cas son una gran herramienta para resensibilizar las bacterias RAM, eliminando genes de resistencia

tanto en cromosomas como en plásmidos incluso evitando la adquisición de los mismos por transferencia horizontal.

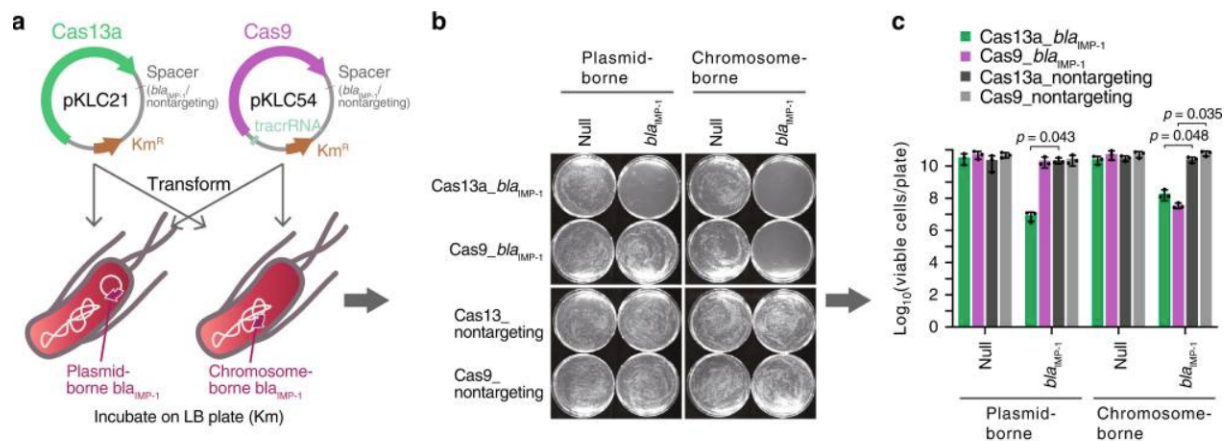
Como principales ventajas puede destacarse la gran efectividad, especificidad y adaptabilidad de estos sistemas para destruir múltiples genes RAM, así como el uso de terapias combinadas CRISPR-Cas conjunto a antibióticos ya que al eliminar estos genes de resistencia podrían usarse los antibióticos ya existentes en el mercado para su tratamiento. La principal limitación son las vías de entrega para liberar estos sistemas en el interior bacteriano, ya que estas cepas resistentes suelen tener múltiples mecanismos que dificultan esta entrega.

#### **4.1.3 Destrucción directa de las bacterias resistentes a los antibióticos**

Otra de las aproximaciones es usar los sistemas CRISPR-Cas como antimicrobianos específicos capaces de detectar y destruir las cepas RAM. A continuación se presentan algunos ejemplos de complejos CRISPR-Cas usados para este fin.

Kiga *et al.*, en el año 2020 <sup>(39)</sup> quisieron comprobar la efectividad del complejo CRISPR-Cas13a vehiculizado por un plásmido como antimicrobiano específico frente a cepas de *E. coli* portadoras del gen *blaIMP-1* que codifica resistencia a carbapenémicos, y que se ubican tanto en el cromosoma como en plásmidos.<sup>(39)</sup>

En primer lugar, quisieron probar la eficacia del complejo CRISPR-Cas13a en la destrucción de esta cepa resistente de *E. coli* en comparación con el efecto causado por el complejo CRISPR-Cas9. Tal y como se observa en la **Figura 11**, se diseñaron dos plásmidos, pKLC21 y pKLC54, cada uno de los cuales albergaba a CRISPR-Cas13a y CRISPR-Cas9 respectivamente, dirigidos a *blaIMP-1*. Estos se introdujeron en *E. coli* portadora de este gen. Se observó que CRISPR-Cas13a disminuyó el número de bacterias portadoras de *blaIMP-1*, tanto en el cromosoma (de  $2,6 \times 10^{10}$  a  $2,0 \times 10^8$  UFC/ml) como en el plásmido (de  $2,3 \times 10^{10}$  a  $8,7 \times 10^6$  UFC/ml). Por otra parte, CRISPR-Cas9 redujo el número de bacterias portadoras de *blaIMP-1* en el cromosoma (de  $6,3 \times 10^{10}$  a  $3,6 \times 10^7$  UFC/ml) pero no el plásmido (de  $2,8 \times 10^{10}$  a  $2,2 \times 10^{10}$  UFC/ml).<sup>(39)</sup>



**Figura 11.** (a) Se preparó un diagrama esquemático de transformación de CRISPR-Cas13a y CRISPR-Cas9 con orientación *bla<sub>IMP-1</sub>* en *bla<sub>IMP-1</sub>*-expresando *E. coli* STBL3. (b) *E. coli* STBL3 expresando *bla<sub>IMP-1</sub>* a partir de un plásmido (*bla<sub>IMP-1</sub>*) transmitido por plásmidos y cromosoma (*bla* Los transformadores resultantes se colocaron en una placa LB que contenía kanamicina (Km) para probar la eliminación bacteriana específica de la secuencia por CRISPR-Cas13a y CRISPR-Cas9. Km se utilizó para mantener los plásmidos. (c) Se contó el número de bacterias en la placa obtenidas en el experimento de (b).<sup>(39)</sup>

Los resultados de este trabajo <sup>(39)</sup> y otros similares <sup>(40,41)</sup> demuestran que los sistemas CRISPR-Cas son una gran alternativa a los antibióticos convencionales, para funcionar como antimicrobianos específicos.

Como principales ventajas, puede destacarse la gran efectividad, especificidad y adaptabilidad de estos sistemas para eliminar bacterias RAM, ya que, a diferencia de los antibióticos, los sistemas CRISPR-Cas solo atacarían estas cepas resistentes, dejando nuestra microbiota intacta. El principal inconveniente es el mismo que se indicó en el apartado 4.1.2, la eficacia de los vectores empleados para el transporte y liberación de estos sistemas en el interior bacteriano, ya que estas cepas resistentes suelen tener múltiples mecanismos que lo dificultan.

## 4.2 Modos de aplicación de sistemas CRISPR-Cas en las células

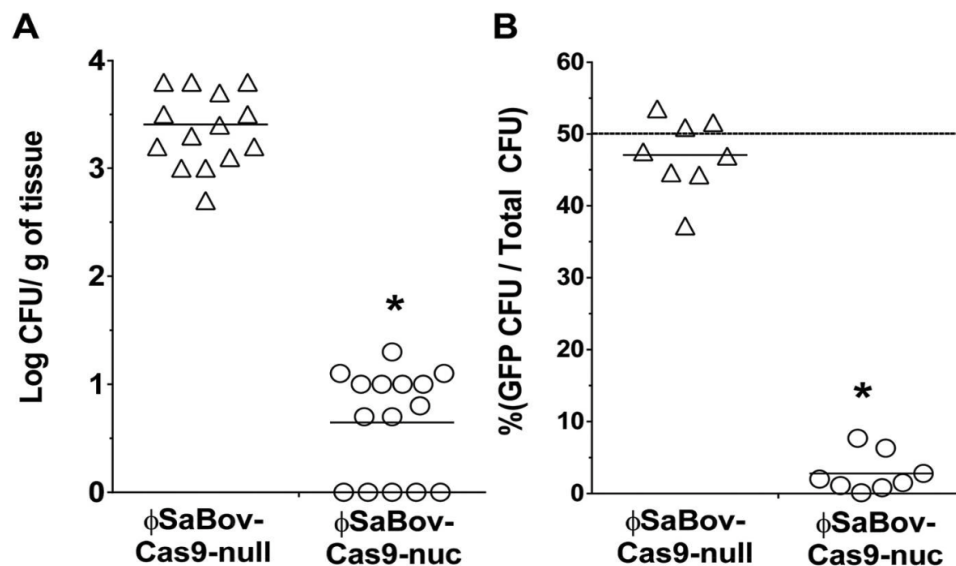
En la bibliografía consultada se ha comprobado que existen varios sistemas para transportar y liberar los complejos CRISPR-Cas en el interior de bacterias resistentes, cada uno de ellos con sus ventajas y con sus inconvenientes. A continuación, se describirán y discutirán los vehículos que están siendo utilizados con esta finalidad: bacteriófagos, plásmidos y nanopartículas.

### 4.2.1 Bacteriófagos

El uso de complejos CRISPR-Cas mediados por bacteriófagos han surgido como una de las formas más empleadas para transportar estos sistemas al interior bacteriano y mejorar su eficacia.

Park *et al.* en 2017 <sup>(40)</sup> realizaron un experimento en el cual diseñaron un complejo CRISPR-Cas9 integrado en el genoma del fago  $\phi$ SaBov dirigido contra el gen *nuc*, presente únicamente en *S. aureus*, con el fin de comprobar la eficacia de este sistema CRISPR-Cas9 mediado por bacteriófago como un agente antimicrobiano específico.

En primer lugar, integraron CRISPR-Cas9 en el genoma de  $\phi$ SaBov ( $\phi$ SaBov/Cas9-nuc) con la finalidad de eliminar el gen *nuc* de *S. aureus* (cepa CTH96). Posteriormente, se inoculó CTH96pGFP ( $1 \times 10^5$  UFC) en la piel de unos ratones. Tras 6 h aplicaron  $\phi$ SaBov/Cas9-nuc o  $\phi$ SaBov/Cas9-null (bacteriófagos sin secuencia espaciadora). Posteriormente, como se muestra en la **Figura 12**, se obtuvieron los siguientes resultados: las pieles de ratón tratadas con  $\phi$ SaBov/Cas9-nuc (0,647 UFC/g) tenían un número de bacterias significativamente menor que aquellas tratadas con  $\phi$ SaBov/Cas9-null (3,333 UFC/g). Tras esto, realizaron una mezcla de CTH96pGFP y CTH96 $\Delta$ nuc (sin gen *nuc*) para comprobar especificidad de  $\phi$ SaBov/Cas9-nuc. Tras seguir el mismo procedimiento que el comentado anteriormente, se comprobó que las pieles tratadas con  $\phi$ SaBov/Cas9-nuc tenían 2,8 UFC/g en contraposición con las 47,1 UFC/g en aquellas tratadas con  $\phi$ SaBov/Cas9-null. Esto refrenda la hipótesis de eliminación específica de las bacterias con el gen *nuc* por parte de  $\phi$ SaBov/Cas9-nuc.<sup>(40)</sup>

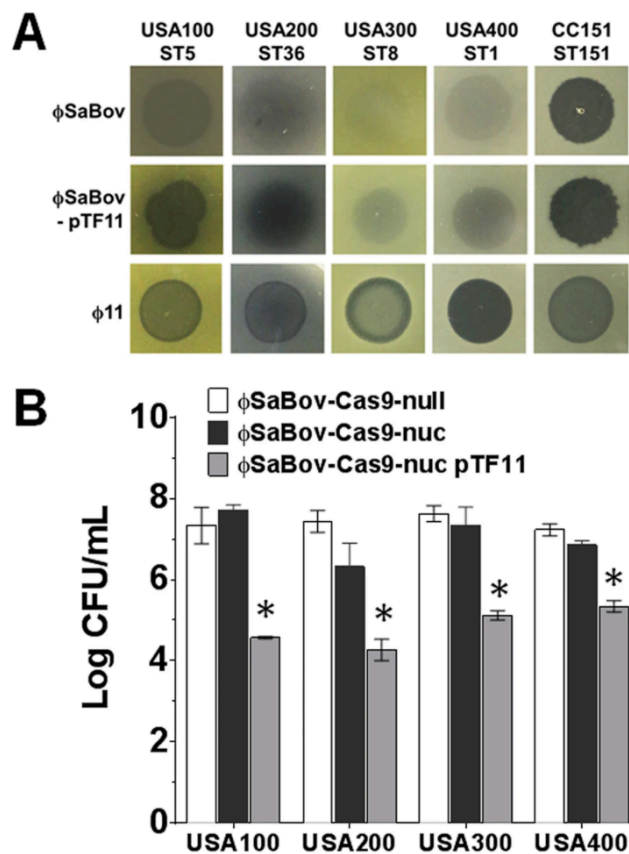


**Figura 12.** Los lomos de los ratones C57BL/6 se infectaron por vía intradérmica con una suspensión de (A) CTH96pGFP ( $1 \times 10^5$  UFC) o (B) una mezcla de CTH96pGFP y CTH96 $\Delta$ nuc (1:1, cada uno a  $5 \times 10^4$  UFC). Los puntos de datos indican el promedio de mediciones triples en ratones individuales ( $n = 9$ ).<sup>(40)</sup>

Los bacteriófagos no suelen tener un rango muy amplio de huéspedes a los que infectar. Por un lado, esto es beneficioso, ya que se puede atacar de forma específica a la bacteria RAM de

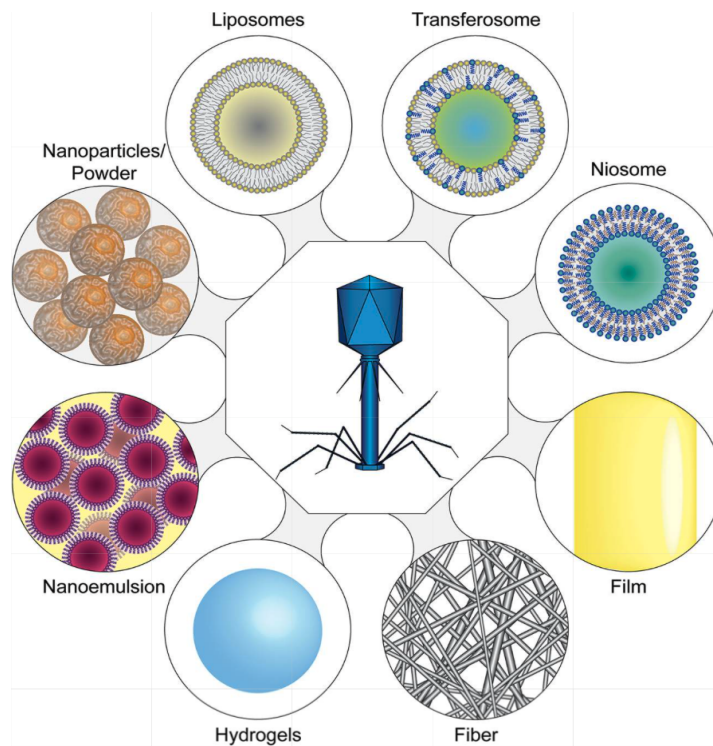
interés sin afectar las bacterias beneficiosas de nuestro cuerpo, como las presentes en la microbiota intestinal. No obstante, pequeñas mutaciones en estas cepas resistentes pueden provocar una pérdida parcial o casi total de la eficacia de estos virus a la hora de infectarlas. La especificidad de los bacteriófagos viene dada, principalmente, por unas proteínas de la cola.

En el experimento de Park *et al.*,<sup>(40)</sup> se intentó ampliar el rango de posibles huéspedes de  $\phi$ SaBov mediante la adición del gen que codifica para la proteína Tif del fago  $\phi$ 11, que tiene un rango de huéspedes bastante amplio de distintos mutantes de *S. aureus*, convirtiéndolo en  $\phi$ SaBov-pTF11. En la **Figura 13** se puede observar que  $\phi$ SaBov-pTF11 mejoró significativamente la mortalidad de CRISPR/Cas9 en los linajes ST1, ST5, ST8 y ST36 de *S. aureus* en comparación con  $\phi$ SaBov.<sup>(40)</sup>



**Figura 13.** Expansión de la especificidad del huésped de  $\phi$ SaBov complementando la proteína de la fibra de la cola. (A) Para la prueba de mancha de fagos, se inocularon 10  $\mu$ L de lisados de fagos (de  $\phi$ 11,  $\phi$ SaBov o  $\phi$ SaBov complementados con la proteína de fibra de cola de  $\phi$ 11 ( $\phi$ SaBov-pTF11) (B) El gráfico de barras muestra la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 entregado por  $\phi$ SaBov complementado con la proteína de fibra de la cola de  $\phi$ 11.<sup>(40)</sup>

Es interesante destacar que se han diseñado una gran variedad de formas de encapsular los bacteriófagos en diferentes materiales tal y como se muestra en la **Figura 14** con el fin de mejorar su protección, estabilidad, disponibilidad y adherencia.<sup>(42)</sup>



**Figura 14.** Métodos de encapsulación de fagos. (En el sentido de las agujas del reloj desde arriba) Liposomas, transferosomas, niosomas, películas, fibras, hidrogeles, nanoemulsiones, y nanopartículas.<sup>(42)</sup>

Los liposomas son unas estructuras formadas por un bicapa lipídica, por lo que tiene gran biocompatibilidad con las membranas celulares y biopelículas presentes en una gran cantidad de bacterias RAM, permitiendo una mejor penetración del bacteriófago al interior bacteriano.<sup>(43)</sup>

Una alternativa a los liposomas son los transferosomas, los cuales son unos liposomas pero que contienen detergente <sup>(44)</sup> y los niosomas que se componen de surfactantes no iónicos, y otras moléculas de carácter anfipático conjunto con el colesterol.<sup>(45)</sup>

Otra opción interesante es el uso de hidrogeles como método de encapsulación para bacteriófagos. Hidrogeles basados en PolyHIPE/Nanocelulosa han sido usados para encapsular bacteriófagos T7 y se ha demostrado que han mejorado el transporte de estos virus así como ejercer un papel protector.<sup>(46)</sup>

De forma similar, se pueden usar películas delgadas para encapsular a estos bacteriófagos. Se han encapsulado bacteriófagos T4 con una película de policaprolactona (PCL) para eliminar específicamente *E. coli*, demostrando una gran eficacia.<sup>(47)</sup>

Finalmente, se puede hacer una inmovilización superficial de los fagos por fibras de diferentes materiales y por diferentes técnicas. Las principales ventajas de las fibras en comparación con otros materiales es la liberación a medida del fago según el material seleccionado. Un ejemplo son las fibras de poliéster de urea (PEU) por electrohilado, que aumentan el rendimiento de los bacteriófagos.<sup>(48)</sup>

#### 4.2.2 Plásmidos

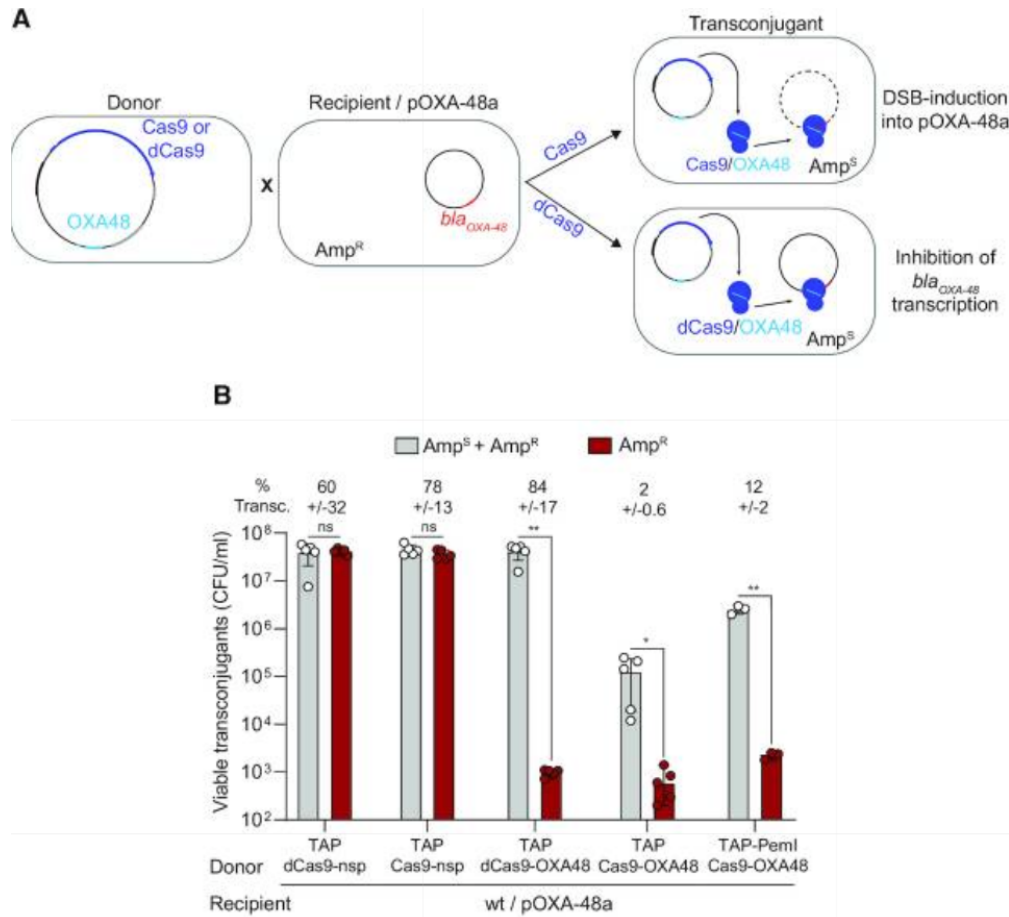
Otro de los vehículos que está siendo investigado son los plásmidos. Los plásmidos son fragmentos de ADN circular extracromosómico que son adquiridos por las bacterias mediante conjugación. Son la principal vía de adquisición de genes RAM por transferencia horizontal. Sin embargo, los plásmidos conjugativos han surgido como una de las vías más atractivas para la administración de sistemas CRISPR-Cas, por su amplio rango de huéspedes, a diferencia de los bacteriófagos. Aunque en contraposición tienen la desventaja de que la tasa de conjugación suele ser relativamente baja y, por tanto, el tratamiento tardará más en hacer efecto.

En el punto 4.1.2 ya se comentó un ejemplo de sistema CRISPR-Cas mediado por plásmido, el cual provocaba la eliminación de genes RAM y prevenía la adquisición de otros plásmidos portadores de los mismos.<sup>(35)</sup>

Reuter *et al.* en 2021 <sup>(49)</sup> realizaron un experimento donde emplearon lo que ellos llamaron plásmidos antibacterianos dirigidos (TAP, del inglés *Targeted Antibacterial Plasmids*) para transmitir, mediante conjugación, genes que codificaban para CRISPR-Cas con el objetivo de combatir cepas *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*.<sup>(49)</sup>

Se diseñaron TAPs dirigidos al gen de resistencia a carbapenémicos *blaOXA-48* presente en el plásmido IncL/M pOXA-48<sup>a</sup> de *E. coli*. Se construyó TAP-Cas9-OXA48 para inducir la rotura de la doble cadena de ADN y TAP-dCas9-OXA48 para inhibir la transcripción del gen *blaOXA-48* por CRISPR de interferencia (CRISPRi).<sup>(49)</sup> Como se observa en la **Figura 15** la transferencia de los plásmidos TAP-Cas9-OXA48 y TAP-dCas9-OXA48 en *E. coli* conllevó la reducción en los niveles de resistencia a ampicilina en 4,5 puntos, mientras que TAP-Cas9-

nsp y TAP-dCas9-nsp (contienen ARNg no específico para *blaOXA-48*) no tuvo ningún efecto.<sup>(49)</sup>

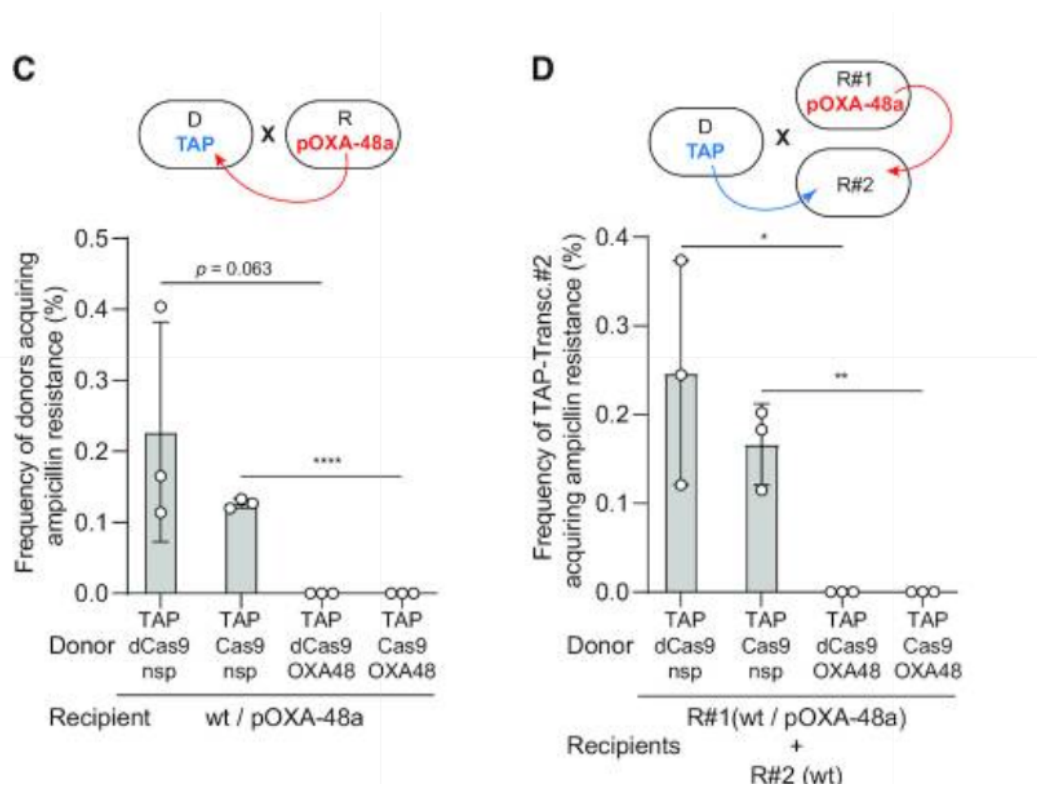


**Figura 15.** TAP vuelve a sensibilizar las células receptoras portadoras de pOXA48 e impide la diseminación de la resistencia. (A) Diagrama de la estrategia antirresistencia mediada por TAP (TAP-Cas9-OXA48 y TAP-dCas9-OXA48). (B) Histogramas que muestran una reducción de la resistencia a la ampicilina en las células transconjugantes después de la adquisición de TAPkn-Cas9-OXA48, TAPkn-dCas9-OXA48 y TAPkn-Cas9-OXA48-PemI.<sup>(49)</sup>

Tal y como se muestra en la **Figura 14** las células donantes que llevaban TAP-Cas9-OXA48 o TAP-dCas9-OXA48 transmitían a otras bacterias el gen *blaOXA-48* un 0,2% y 0,12% de los individuos en cada caso. Sin embargo, estas células receptoras no mostraban resistencia a la ampicilina. Por último, se quiso comprobar que la presencia de los TAPs en las células impedía el desarrollo de resistencia a ampicilina aún si adquirieron el plásmido pOXA-48a. Con este fin, añadieron una cepa adicional libre de plásmidos (R#2) y se comprobó aquellas células que



recibieron TAP-Cas9-nsp o TAP-dCas9-nsp desarrollaron resistencia mientras que aquellas con TAP-Cas9-OXA48 o TAP-dCas9-OXA48 no.<sup>(49)</sup>



**Figura 16.** (C) Histogramas que muestran la frecuencia en que las células donantes adquieren resistencia a la ampicilina a través de la transferencia de pOXA-48a de los receptores. (D) Los histogramas muestran la frecuencia de adquisición de resistencia a la ampicilina a través de la transferencia de pOXA-48a a los receptores con plásmidos R#2 que ha recibido los TAP.<sup>(49)</sup>

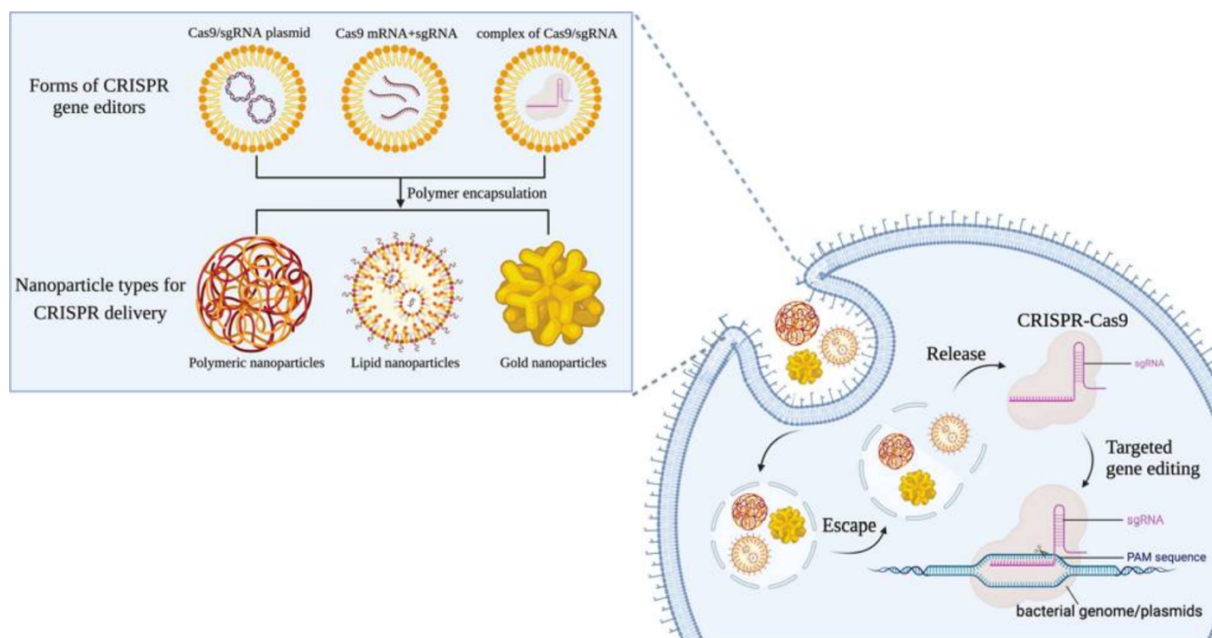
#### 4.2.3 Nanopartículas

En último lugar, se están investigando las nanopartículas como vehículo para transportar los sistemas CRISPR-Cas (**Figura 17**), ya que tienen como principales ventajas su biocompatibilidad, protección, inmunidad más pequeña y mayor seguridad que la vías por bacteriófagos.<sup>(50)</sup>

Tao *et al.* en 2021<sup>(51)</sup> diseñaron nanopartículas de oro y protamina (AuNC) para servir de vector al sistema CRISPR-Cas9 con el objetivo de la inactivación de oncogenes del virus de la hepatitis. Los resultados demostraron que AuNC mejora la entrega intracelular de CRISPR-Cas9, además, gracias a las propiedades fluorescentes de AuNC se facilitó en gran medida el seguimiento del experimento. Por último, se confirmó la efectividad del complejo CRISPR-Cas9/AuNC como tratamiento para eliminar el oncogén E7.<sup>(51)</sup>

Por otra parte, Suzuki *et al.* <sup>(52)</sup> ese mismo año realizaron un experimento donde empaquetaron el sistema CRISPR-Cas/ribonucleoproteína (RNP) en nanopartículas de lípidos (LNP) por microfluídica con el fin de inhibir el virus de la hepatitis b. Se demostró una eficiencia muy alta en la destrucción de genes y no mostró muestras significativas de citotoxicidad.<sup>(52)</sup>

Cabe destacar el enfoque utilizado por Kang *et al.* <sup>(53)</sup>, que desarrollaron un nanocomplejo portador de CRISPR-Cas9 (Cr-nanocomplejo). La proteína Cas sufrió una modificación covalente con polietilenimina ramificada (bPEI), que gracias a su propiedad catiónica promueve la inserción de polímeros. El objetivo era la destrucción del gen *mecA* en las cepas SARM. Se demostró que tenía una gran eficacia penetrando y destruyendo esta cepa resistente.<sup>(53)</sup>



**Figura 17.** Nanopartículas para la administración de CRISPR-Cas9. Se utilizan tres tipos diferentes de nanopartículas para entregar CRISPR-Cas9: nanopartículas poliméricas, lipídicas y de oro.<sup>(18)</sup>

### 4.3 Limitaciones e inconvenientes del uso de técnicas CRISPR-Cas

Como ocurre con cualquier tecnología, existen una serie de limitaciones e inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de emplear los sistemas CRISPR-Cas para combatir las bacterias RAM.

Probablemente, la principal limitación a la hora de usar los sistemas CRISPR-Cas para combatir la RAM, es el vehículo empleado para su entrega al interior bacteriano. A lo largo de este TFG se han mostrados las ventajas e inconvenientes de estos vehículos como son los

bacteriófagos,<sup>(40)</sup> los plásmidos <sup>(49)</sup> y las nanopartículas.<sup>(50)</sup> Los principales problemas están asociados con la gran especificidad de los bacteriófagos, los cuales tienen un estrecho rango de huéspedes y pueden dejar de reconocer las bacterias objetivo si estas sufren ciertas mutaciones, así como la presencia de estos virus suele desencadenar la respuesta inmunitaria bacteriana.<sup>(40)</sup> Por otra parte, los plásmidos tienen como principal problema la baja tasa de conjugación bacteriana.<sup>(49)</sup> Por último, las nanopartículas no presentan estos inconvenientes, pero aún no han sido lo suficientemente estudiadas y se necesita más investigación al respecto.<sup>(50)</sup>

Un inconveniente a destacar es la complejidad a la hora de seleccionar el ADN objetivo y diseñar el ARNg, ya que se requiere de una extensa investigación previa así como el uso de herramientas de *software* para realizar esta labor lo más precisa y eficientemente posible.<sup>(54)</sup> Ya que de lo contrario la precisión y eficacia del complejo CRISPR-Cas puede disminuir significativa o incluso totalmente.

Por último, el efecto tóxico de algunas proteínas Cas como Cas9 está bien documentado,<sup>(55)</sup> lo que puede resultar un inconveniente para el desarrollo de tratamientos basados en esta tecnología contra bacterias RAM.

## 5. Conclusiones

1. Los sistemas CRISPR-Cas han demostrado ser eficaces para la detección rápida y precisa de bacterias RAM, tanto aquellas que portan los genes de resistencia en el cromosoma, como las que los portan en plásmidos.
2. La resensibilización de bacterias está siendo posible mediante estrategias basadas en CRISPR-Cas, bien a través de la eliminación de los genes de resistencia, o evitando la adquisición de estos genes por transferencia horizontal. Además, estos sistemas permiten la eliminación directa de las bacterias RAM dejando intacta la microbiota y otras bacterias beneficiosas.
3. Los bacteriófagos, plásmidos y nanopartículas han mostrado resultados prometedores como vectores para el transporte y administración de los sistemas CRISPR-Cas al interior de bacterias RAM. Sin embargo, de todos ellos, el que tiene mayor potencial son las nanopartículas debido a su gran biocompatibilidad y reducida inmunogenicidad.
4. Algunas proteínas Cas, como la Cas9, se han asociado a efectos citotóxicos. No obstante, la elección del vehículo correcto puede mitigar en gran medida estos efectos, paralelamente al refinamiento de la técnica.
5. Es necesaria una mayor investigación de los diferentes vectores que pueden emplearse para transportar y liberar los sistemas CRISPR-Cas en el interior bacteriano. Esta es la principal limitación que tienen estos sistemas para combatir la RAM, y por tanto, es necesario llevar a cabo el perfeccionamiento, refinamiento y estandarización de los vehículos utilizados.

## Conclusions

1. CRISPR-Cas systems have demonstrated effectiveness in the rapid and precise detection of AMR bacteria, whether carrying resistance genes on the chromosome or on plasmids.
2. Resensitization of bacteria is being made possible through CRISPR-Cas based strategies, either by eliminating resistance genes or preventing the acquisition of these genes through horizontal transfer. Additionally, these systems allow for the direct elimination of ARM bacteria while preserving the microbiota and other beneficial bacteria.
3. Bacteriophages, plasmids, and nanoparticles have shown promising results as vectors for delivering and administering CRISPR-Cas systems into ARM bacteria. However, among them, nanoparticles have the highest potential due to their excellent biocompatibility and reduced immunogenicity.
4. Some Cas proteins, such as Cas9, have been associated with cytotoxic effects. However, the selection of the appropriate delivery vehicle can greatly mitigate these effects, alongside the refinement of the technique.
5. Further research is needed on the different vectors that can be used to deliver and release CRISPR-Cas systems into bacterial cells. This is the main limitation these systems face in combating antibiotic resistance, and therefore, it is necessary to refine, improve, and standardize the vehicles used.

## Bibliografía

1. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature reviews. Microbiology*, 21(5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
2. Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2) doi:10.1128/CMR.00047-19
3. Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S., & Pathania, R. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (Society for General Microbiology)*, 169(5) doi:10.1099/mic.0.001333
4. Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701-1718. doi:10.1007/s42770-021-00624-x
5. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2) doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
6. BOWEN, A. C., LILLIEBRIDGE, R. A., TONG, S. Y. C., BAIRD, R. W., WARD, P., MCDONALD, M. I., . . . CARAPETIS, J. R. (2012). Is streptococcus pyogenes resistant or susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole? *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4067-4072. doi:10.1128/JCM.02195-12
7. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
8. *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis antimicrobial resistance collaborators\**
9. *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations the review on antimicrobial resistance chaired by jim o'neill* (2016).
10. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (2017). Retrieved from <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
11. Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309-318. doi:10.1179/2047773215Y.0000000030
12. McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: A one health perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2) doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
13. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. doi:10.7759/cureus.1403
14. Hernandez, L. D., Racine, F., Xiao, L., DiNunzio, E., Hairston, N., Sheth, P. R., . . . Therien, A. G. (2015). Broad coverage of genetically diverse strains of clostridium difficile by actoxumab and bezlotoxumab predicted by in vitro neutralization and epitope modeling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1052-1060. doi:10.1128/AAC.04433-14
15. Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162-173. doi:10.4292/wjgpt.v8.i3.162
16. Rosini, R., Nicchi, S., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2020). *Vaccines against antimicrobial resistance* Frontiers Media SA. doi:10.3389/fimmu.2020.01048
17. Lima, P. G., Oliveira, J. T. A., Amaral, J. L., Freitas, C. D. T., & Souza, P. F. N. (2021). Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, 278, 119647. doi:10.1016/j.lfs.2021.119647
18. Wu, Y., Battalapalli, D., Hakeem, M. J., Selamneni, V., Zhang, P., Draz, M. S., & Ruan, Z. (2021). Engineered CRISPR-cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 401. doi:10.1186/s12951-021-01132-8
19. Gholizadeh, P., Köse, Ş, Dao, S., Ganbarov, K., Tanomand, A., Dal, T., . . . Samadi Kafil, H. (2020). *How CRISPR-cas system could be used to combat antimicrobial resistance* Informa UK Limited. doi:10.2147/idr.s247271
20. Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-cas: Biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707), 20150496. doi:10.1098/rstb.2015.0496
21. Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). *History of CRISPR-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology* American Society for Microbiology. doi:10.1128/jb.00580-17

22. Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1772), 20180087. doi:10.1098/rstb.2018.0087
23. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA—Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
24. Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). *CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning* American Association for the Advancement of Science (AAAS). doi:10.1126/science.add8643
25. Quan, J., Langelier, C., Kuchta, A., Batson, J., Teyssier, N., Lyden, A., . . . Crawford, E. D. (2019). FLASH: A next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Research*, 47(14), e83. doi:10.1093/nar/gkz418ç
26. Suea-Ngam, A., Howes, P. D., & deMello, A. J. (2021). An amplification-free ultra-sensitive electrochemical CRISPR/cas biosensor for drug-resistant bacteria detection. *Chemical Science (Cambridge)*, 12(38), 12733-12743. doi:10.1039/d1sc02197d
27. Müller, V., Rajer, F., Frykholm, K., Nyberg, L. K., Quaderi, S., Fritzsche, J., . . . Westerlund, F. (2016). *Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping* Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/srep37938
28. Sun, X., Wang, Y., Zhang, L., Liu, S., Zhang, M., Wang, J., . . . Gao, Z. (2020). *CRISPR-Cas9 triggered two-step isothermal amplification method for E. coli O157:H7 detection based on a Metal–Organic framework platform* American Chemical Society (ACS). doi:10.1021/acs.analchem.9b04162
29. Qiu, H., Gong, J., Butaye, P., Lu, G., Huang, K., Zhu, G., . . . Wang, C. (2018). *CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between gyrA mutation and quinolone resistance in escherichia coli* Oxford University Press (OUP). doi:10.1093/femsle/fny127
30. Khan, A. U., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). *Structure, genetics and worldwide spread of new delhi metallo-β-lactamase (NDM): A threat to public health* Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1186/s12866-017-1012-8
31. Kabir, S., Tahir, Z., Mukhtar, N., Sohail, M., Saqalein, M., & Rehman, A. (2020). Fluoroquinolone resistance and mutational profile of gyrA in pulmonary MDR tuberculosis patients. *BMC Pulmonary Medicine*, 20(1), 138. doi:10.1186/s12890-020-1172-4
32. Liao, W., Wang, L., Zheng, X., Zhang, Y., Chen, T., Zhou, C., . . . Zhou, T. (2022). Evolution of tet(A) variant mediating tigecycline resistance in KPC-2-producing klebsiella pneumoniae during tigecycline treatment. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.*, 28, 168-173. doi:10.1016/j.jgar.2022.01.007
33. Smith, C. A., Bhattacharya, M., Toth, M., Stewart, N. K., & Vakulenko, S. B. (2017). Aminoglycoside resistance profile and structural architecture of the aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-im. *Microbial Cell*, 4(12), 402-410. doi:10.15698/mic2017.12.602
34. Qiu, H., Gong, J., Butaye, P., Lu, G., Huang, K., Zhu, G., . . . Wang, C. (2018). *CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between gyrA mutation and quinolone resistance in escherichia coli* Oxford University Press (OUP). doi:10.1093/femsle/fny127
35. Walker-Sünderhauf, D., Klümper, U., Pursey, E., Westra, E. R., Gaze, W. H., & van Houte, S. (2023). Removal of AMR plasmids using a mobile, broad host-range CRISPR-Cas9 delivery tool. *Microbiology (Society for General Microbiology)*, 169(5) doi:10.1099/mic.0.001334
36. Tagliaferri, T. L., Guimarães, N. R., Pereira, M. D. P. M., Vilela, L. F. F., Horz, H., Dos Santos, S. G., & Mendes, T. A. D. O. (2020). *Exploring the potential of CRISPR-Cas9 under challenging conditions: Facing high-copy plasmids and counteracting beta-lactam resistance in clinical strains of enterobacteriaceae* Frontiers Media SA. doi:10.3389/fmicb.2020.00578
37. Liu, H., Li, H., Liang, Y., Du, X., Yang, C., Yang, L., . . . Song, H. (2020). *Phage-delivered sensitisation with subsequent antibiotic treatment reveals sustained effect against antimicrobial resistant bacteria* Ivyspring International Publisher. doi:10.7150/thno.42573
38. Wan, P., Cui, S., Ma, Z., Chen, L., Li, X., Zhao, R., . . . Zeng, Z. (2020). *Reversal of mcr-1-mediated colistin resistance in escherichia coli by CRISPR-Cas9 system* Informa UK Limited. doi:10.2147/idr.s244885
39. Kiga, K., Tan, X., Ibarra-Chávez, R., Watanabe, S., Aiba, Y., Sato, Y., . . . Cui, L. (2020). Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nature Communications*, 11(1), 2934. doi:10.1038/s41467-020-16731-6

40. Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). *Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against staphylococcus aureus* Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/srep44929
41. Wang, R., Shu, X., Zhao, H., Xue, Q., Liu, C., Wu, A., . . . Li, M. (2023). *Associate toxin-antitoxin with CRISPR-cas to kill multidrug-resistant pathogens* Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/s41467-023-37789-y
42. Loh, B., Gondil, V. S., Manohar, P., Khan, F. M., Yang, H., & Leptihn, S. (2021). *Encapsulation and delivery of therapeutic phages* American Society for Microbiology. doi:10.1128/aem.01979-20
43. Rukavina, Z., & Vanić, Ž. (2016). Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. *Pharmaceutics*, 8(2), 18. doi:10.3390/pharmaceutics8020018
44. Chhibber, S., Shukla, A., & Kaur, S. (2017). Transfersomal phage cocktail is an effective treatment against methicillin-resistant staphylococcus aureus-mediated skin and soft tissue infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10) doi:10.1128/AAC.02146-16
45. Aparajay, P., & Dev, A. (2022). Functionalized niosomes as a smart delivery device in cancer and fungal infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106052. doi:10.1016/j.ejps.2021.10605
46. Kopač, T., Lisac, A., Mravljak, R., Ručigaj, A., Krajnc, M., & Podgornik, A. (2021). Bacteriophage delivery systems based on composite PolyHIPE/nanocellulose hydrogel particles. *Polymers*, 13(16), 2648. doi:10.3390/polym13162648
47. Choi, I., Yoo, D. S., Chang, Y., Kim, S. Y., & Han, J. (2021). Polycaprolactone film functionalized with bacteriophage T4 promotes antibacterial activity of food packaging toward escherichia coli. *Food Chemistry*, 346, 128883. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128883
48. Díaz, A., del Valle, L., Rodrigo, N., Casas, M., Chumburidze, G., Katsarava, R., & Puiggalí, J. (2018). Antimicrobial activity of poly(ester urea) electrospun fibers loaded with bacteriophages. *Fibers*, 6(2), 33. doi:10.3390/fib6020033
49. Reuter, A., Hilpert, C., Dedieu-Berne, A., Lematre, S., Gueguen, E., Launay, G., . . . Lesterlin, C. (2021). Targeted-antibacterial-plasmids (TAPs) combining conjugation and CRISPR/cas systems achieve strain-specific antibacterial activity. *Nucleic Acids Research*, 49(6), 3584-3598. doi:10.1093/nar/gkab126
50. Riley, M., & Vermerris, W. (2017). *Recent advances in nanomaterials for gene Delivery—A review* MDPI AG. doi:10.3390/nano7050094
51. Tao, Y., Yi, K., Hu, H., Shao, D., & Li, M. (2021). Coassembly of nucleus-targeting gold nanoclusters with CRISPR/Cas9 for simultaneous bioimaging and therapeutic genome editing. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 9(1), 94-1. doi:10.1039/d0tb01925a
52. Suzuki, Y., Onuma, H., Sato, R., Sato, Y., Hashiba, A., Maeki, M., . . . Harashima, H. (2021). Lipid nanoparticles loaded with ribonucleoprotein–oligonucleotide complexes synthesized using a microfluidic device exhibit robust genome editing and hepatitis B virus inhibition. *Journal of Controlled Release*, 330, 61-71. doi:10.1016/j.jconrel.2020.12.013
53. Kang, Y. K., Kwon, K., Ryu, J. S., Lee, H. N., Park, C., & Chung, H. J. (2018). Correction to “Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance”. *Bioconjugate Chemistry*, 29(11), 3936. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00771
54. Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J., . . . Concordet, J. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1), 148. doi:10.1186/s13059-016-1012-2
55. Dow, L. E., Fisher, J., O'Rourke, K. P., Muley, A., Kasthuber, E. R., Livshits, G., . . . Lowe, S. W. (2015). *Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9* Springer Science and Business Media LLC. doi:10.1038/nbt.3155



## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis padres Rafael y Elvira, por los valores que me han inculcado, por el amor incondicional que siempre me han transmitido y por apoyarme en absolutamente todo.

A mi hermano Daniel por ser mi compañero de vida, mi mejor amigo y por apoyarme siempre en todo.

A mis abuelos; Cristóbal, Mari Carmen, Elsa y Miguel, por haberme criado, enseñado y querido de una forma tan pura.

A todos mis tíos; Magui, Alexis, Candy, Yasmina, Juan, Mari Nieves, José, Migue y David; y mis primos; Elena, Alejandro, Joanna, Lorena, Yaleni, Lucía y Judith. Por todos los momentos que hemos tenido durante todos estos años y todos los que están por venir. La familia que te toca es una lotería, y a mí me ha tocado el gordo.

A mi pareja Nayo, por enseñarme que el amor verdadero existe, alegrarte de mis logros y apoyarme en mis caídas y por una vida junto a ti.

A mis amigos, a mis verdaderos amigos, Laura, María, Kevin H y Kevin A, que siempre han estado ahí para lo bueno, para lo malo y lo peor.

A mis compañeros de piso Ancor, Javier y Kevin H por su apoyo durante estos años y por tantos buenos momentos durante nuestra convivencia.

A todos los profesores y profesoras que he tenido a lo largo de mi enseñanza obligatoria, destacando a Amalia y sobre todo Manuel Luis por ser un ejemplo a seguir de lo que es mostrar pasión por la Biología.

A todos mis compañeros y compañeras de Biología, por hacerme el grado más ameno y por todos los momentos que hemos compartido.

A todos los docentes que he tenido a lo largo del grado de Biología, especialmente a mi tutor Eduardo, sin el cual este TFG no podría haber sido posible, también quería darles las gracias a María Teresa, María del Mar, Mariano, Rosa y a los dos José Antonio. Gracias por todos los conocimientos que me han transmitido y me han ayudado a convertirme en el biólogo en el que me he convertido.

Al equipo de Entomología Médica, Sara, Irene, Carolina, Bea, Daniela y Lía por mostrarme que en un trabajo se puede ser profesional, aprender, pero también pasárselo bien.

Y por último, quiero darme las gracias a mí mismo por el esfuerzo de estos 5 últimos años y por siempre seguir adelante a pesar de las adversidades.

MUCHAS GRACIAS