



***RE - SENSIBILIZACIÓN DE Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa POR
EDICIÓN DE GENES ASOCIADOS A MULTIRRESISTENCIA ANTIBIÓTICA
IMPLEMENTANDO CRISPR CAS9.***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C. OCTUBRE 04 DE 2019**



**RE - SENSIBILIZACIÓN DE *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* POR
EDICIÓN DE GENES ASOCIADOS A MULTIRRESISTENCIA ANTIBIÓTICA
IMPLEMENTANDO CRISPR CAS9.**

García Espinosa Yudy Catalina

ASESOR:

Ruth Mérida Sánchez Mora. MSc-PhD

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C. OCTUBRE 04 DE 2019.**

<< Solo existe una guerra que se le puede permitir al ser humano: la guerra contra su extinción>>

Isaac Asimov

<<A donde quiera que vayas en el mundo, cualquier animal, planta, bicho o gota que veas, utilizará el mismo diccionario y conocerá el mismo código. Toda la vida es una>>

Matt Ridley

<<La ciencia no solo es compatible con la espiritualidad; es una profunda fuente de espiritualidad>>

Carl Sagan

<< La vida es y siempre seguirá siendo una ecuación incapaz de resolver, pero tiene ciertos factores que conocemos>>

Nikola Tesla

DEDICATORIA

*A mi querida hija Aina Gabriela quien ha hecho la vida más inspiradora para mí,
quiero darle una formación basada en principios en busca que sea una mujer
pensante, con criterio, libre y feliz.*

*A mi esposo Yesid Prieto López por ser mi compañero de vida y sobre todo por
apoyarme durante este importante proceso académico siendo un pilar importante en
mi formación personal y profesional.*

*A mi madre Martha Espinosa Guayambuco quien sigue luchando con esperanza.
Que el permiso divino nos dejé compartir muchos logros más.*

Yudy Catalina García Espinosa.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Martha Espinosa Guayambuco por su entereza y ejemplo que han sido indispensables para mi formación como persona.

A mi alma mater Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por cada una de las herramientas puestas a nuestra disposición durante la instrucción académica y en valores, incluyendo su sistema de bibliotecas y orientación por parte del personal bibliotecario en la búsqueda de información, gestores bibliográficos y estilos de referenciación y citación.

A cada uno de mis profesores en todas las áreas desde el preescolar porque sin darse cuenta me inculcaron el amor por la ciencia y la importancia de educarse y valorar los distintos tipos de aprendizaje.

A todas aquellas personas con quienes me he cruzado en este camino que es la vida en todos sus ámbitos; principalmente laboral y académico, ya que, gracias a ellas y su tiempo compartido entre charlas, risas y otras emociones me acerco al complejo concepto acerca de lo que es la existencia humana, su valor y trascendencia.

Sin más preámbulos a los jurados y otros lectores que se acercan a estas páginas y me dan la oportunidad de dar a conocer las humildes líneas de esta revisión bibliográfica.

Yudy Catalina García Espinosa.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	10
LISTA FIGURAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	Página..... 12
ABSTRACT	14
OBJETIVO GENERAL	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
INTRODUCCIÓN	17
1. ANTECEDENTES	23
2. MARCO REFERENCIAL	28
2.1. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS:	28
2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos incluida la familia Enterobacteriaceae:	30
2.2.1. Betalactamasas de Espectro Extendido o BLEES:	31
2.2.2. Betalactamasas tipo carbapenemasa:	32
2.2.3. Resistencia a Aminoglucósidos:	32
2.2.4. Resistencia a quinolonas:	33
2.2.5. Plásmidos de resistencia:	33
2.3. <i>Escherichia coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> :	34
2.3.2. Colistina	36
2.3.3 Mutación <i>gyrA</i>	36
2.3.4 Quinolonas	36
3. DISEÑO METODOLÓGICO	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Herramienta de CRISPR/Cas 9	43
4.1.1. CRISPR Cas 9 (CRISPR Cas tipo II)	46
4.1.2. Fases del mecanismo de la inmunidad de CRISPR/Cas9 Tipo II	47
4.2. Re-sensibilización de <i>E. coli</i> por edición de genes codificantes para Betalactamasas de amplio espectro BLEES	51
4.3. Re-sensibilización de <i>E. coli</i> por edición del Gen de resistencia a colistina <i>mcr-1</i> usando el sistema CRISPR/Cas9.	57
4.3.1. Bloqueo del Gen <i>mcr-1</i> por CRISPR/Cas	58
4.3.2 Eliminación del gen de resistencia a colistina <i>mrc-1</i> presente en diferentes plásmidos en <i>E. coli</i>	60
4.4. La edición de <i>E. coli</i> resistente a quinolonas implementando CRISPR / Cas9, confirma la relación causa-efecto entre la mutación (<i>gyr</i>) y la resistencia a este antibiótico, al re-sensibilizar las cepas que habían adquirido dicho mecanismo.	65

4.5. La edición previamente empleada en distintas especies de <i>Pseudomonas</i> puede replicarse para re- sensibilizar a <i>P. Aeruginosa</i> por medio de la edición de CRISPR/Cas9.	68
5. DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS.....	82

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Clasificación de las Betalactamasas en Bacterias Gram Negativas.	30
Tabla 2. Clasificación de carbapenemasas	31
Tabla 3. Datos demográficos y características microbiológicas de aislamientos positivos para el gen mcr-1	34
Tabla 4. Secuencias de los componentes dirigidos a cada gen de resistencia a antibióticos.	52
Tabla 5. ARN señal.	63
Tabla 6. Donante de ADN para la mutación del gen sintetizado por GenScript	63

LISTA FIGURAS

Página

Figura 1. Alineación de las CRISPR, en ese momento llamadas por el Doctor Mojica y su equipo SRSRs (Short Regularly Spaces Repeats)	22
Figura 2. Mecanismos de la resistencia por Betalactamasas en la familia Enterobacteriaceae	30
Figura 3. Secuencias repetidas de CRISPR	42
Figura 4. Mecanismo básico de CRISPR/Cas9	43
Figura 5a. Fases del Mecanismo de Edición CRIPSR/Cas9 Tipo II – Adaptación	45
Figura 5b. Fases del Mecanismo de Edición CRIPSR/Cas9 Tipo II – Expresión	46
Figura 5c. Fases del Mecanismo de Edición CRIPSR/Cas9 Tipo II – Interferencia	47
Figura 6. Diferentes secuencias de diseño agregadas a las nucleasas guiadas por ARN (gARN), entregadas por bacteriófagos	48
Figura 7. Re-sensibilización de <i>E. coli</i> EMG2 con bacteriófagos asociados a gARN	49
Figura 8. Plásmido de edición principal pRESAResble	51
Figura 9. Diseño y construcción de los plásmidos de evaluación, incluyendo al plásmido RESARFbla dirigido al gen bla	52
Figura 10a. Resensibilización de <i>E. coli</i> que portaba plásmidos para expresión de BLEES	54
Figura 10b. Resensibilización de <i>E. coli</i> que portaba plásmidos para expresión de BLEES	54
Figura 10c. Resensibilización de <i>E. coli</i> que portaba plásmidos para expresión de BLEES	55
Figura 10d. Resensibilización de <i>E. coli</i> que portaba plásmidos para expresión de BLEES	55
Figura 11a. Diseño de la diana del sgARN dirigida al gen mcr-1	57
Figura 11b. UFC/ml de <i>E. coli</i> transferidas con el gen mcr-1 antes y después de la Re-sensibilización	57
Figura 11c. Resultado de la re-sensibilización	57
Figura 12. Cas9-sgRNA administrado por el péptido antimicrobiano meloide bovino-27 (BMAP-27) presenta un antimicrobiano eficiente y específico efectos contra cepas que albergan secuencias diana de plásmidos	58
Figura 13. Figura No 13. Plásmido pHNSHP45 portador del gen mcr-1 y el plásmido pFSEC-01 conjugativo	59
Figura 14. vector pCas9sgRNA- gfp	59
Figura 15. Destrucción de genes mediada por CRISPR / Cas9	60
Figura 16. Mapa del plásmido resultante, pMob-Cas9 .B. pMob-ctrl	61
Figura 17. Crecimiento de las células intervenidas con plásmidos	62
Figura 18. Eliminación del plásmido GFP que contenía al gen de resistencia a colistina mcr-1	62
Figura 19. CRISPR / Cas9 induce mutación en el nucleótido 248 de <i>E. coli</i> ATCC25922	65
Figura 20. Cambios en los aminoácidos por la mutación gyrA están asociados con resistencia a quinolonas	66
Figura 21. Mapa del plásmido pCasA; mapa del plásmido pACRISPR y secuencia de sitios de clonación del plásmido pACRISPR	68
Figura 22. Esquema de la edición de <i>P. Aeruginosa</i> mediada por el sistema pCasPA/pACRISPR	69
Figura 23. El sistema de alta eficiencia pnCasPA-BEC habilito la conversión de C - T en varias especies de <i>Pseudomonas</i>	70

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1. Distribución artículos revisión bibliográfica	40
Gráfico 2. Porcentaje de documentación por temas hallados en bases de datos	40



RE - SENSIBILIZACIÓN DE Escherichia coli y Pseudomonas spp. POR EDICIÓN DE GENES ASOCIADOS A MULTIRRESISTENCIA ANTIBIÓTICA IMPLEMENTANDO CRISPR CAS9.

Resumen

La panresistencia (PDR), multirresistencia (MDR) y resistencia extrema (XDR) a antibióticos, es un problema de salud pública mundial, las alertas globales están encendidas por la expansión de mecanismos intrínsecos y extrínsecos que tienen y desarrollan los procariontes para contrarrestar los efectos de los fármacos antimicrobianos. Dentro de las habilidades extrínsecas de las bacterias está la transmisión horizontal de genes por plásmidos (THG), un mecanismo que es punto clave a controlar en la lucha contra las infecciones bacterianas.

Dos de los microorganismos prioritarios que requieren nuevos antibióticos, son *Pseudomonas aeruginosa* y las variedades de *E. coli* que han adquirido resistencia a antibióticos.

Esta revisión bibliográfica, tiene como objetivo general, evidenciar que la tecnología Cris Cas 9 puede ser una herramienta clave a emplearse para mitigar la resistencia a antibióticos relacionada con THG en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), que son un problema de salud pública a nivel intrahospitalario en Colombia; por medio de su re- sensibilización, al editar genes asociados a resistencia antibiótica con la herramienta CRISPR Cas9; la metodología consistió en una revisión bibliográfica de artículos recientes en bases de datos con validez científica, que dan cuenta que se ha logrado en este campo, describiendo sus resultados y acercándonos a sus implicaciones y alcances.

Los criterios de búsqueda fueron artículos desde el año 2010 en revistas indexadas en español o inglés que pudieran obtenerse completos para su análisis, que evaluaran la re-sensibilización de bacterias Gram negativas y cuya metodología fuera asociada a CRISPR Cas9; se demostró que las bacterias *E. coli* multirresistente y *P.aeruginosa* extremadamente resistente pueden recuperar su susceptibilidad inicial a antibióticos por varias vías de edición con CRISPR Cas 9.

Entiéndase re - sensibilización como todo proceso de edición genética que al ser empleado en una cepa bacteriana que había adquirido previamente multirresistencias a antibióticos por transmisión horizontal de plásmidos, demuestre haber devuelto a dicha bacteria sus características previas a la adquisición de esta información de resistencia frente a antibióticos, volviéndola nuevamente susceptible.

Palabras claves: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, CRISPR/Cas9, Panresistencia, Multiresistencia, Resistencia Extendida, Transferencia horizontal de genes.

ABSTRACT

Pan-resistance (PDR), multi-resistance (MDR) and extended resistance (XDR) to antibiotics is a global public health problem. Global alerts are lit by the expansion of intrinsic and extrinsic mechanisms that prokaryotes have and develop to counteract the effects of antimicrobial drugs. Among the extrinsic abilities of bacteria is the horizontal transmission of genes by plasmids (THG), a mechanism that is a key point to control in the fight against bacterial infections.

Two of the priority microorganisms that require new antibiotics are *Pseudomonas aeruginosa* and the varieties of *E. coli* that have acquired antibiotic resistance. In this literature review, the general objective is to show that Cris Cas 9 technology can be a key tool to mitigate THG-related antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), which are a public health problem at the hospital level in Colombia (2, 4); through its re-sensitization, when editing genes associated with antibiotic resistance with the

CRISPR Cas9 tool; The methodology was a documentation by means of the specific search of recent articles in databases with scientific validity, that realize that it has been achieved in this field, describing its results and approaching its implications and scope.

The search criteria were articles from 2010 in indexed journals, Spanish or English, which could be obtained for analysis, which evaluated the re-sensitization of gram negative bacteria and whose methodology was associated with CRISPR Cas9.

It was demonstrated that the extremely resistant *E.coli* bacteria and extremely resistant *P.aeruginosa* can regain their initial susceptibility to antibiotics by several ways of editing with CRISPR Cas 9.

Re-sensitization is understood as any process of genetic editing that, when used in a bacterial strain that had previously acquired multiresistance to antibiotics by horizontal transmission of plasmids, demonstrates having returned to said bacterium its characteristics prior to the acquisition of this resistance information against antibiotics, making it again susceptible.

Keywords: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, CRISPR / Cas9, Panresistencia, Multiresistencia, Extended Resistance, Horizontal gene transfer.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la tecnología CRISPR/Cas9 como una herramienta clave a emplearse para aminorar la resistencia a antibióticos relacionada con THG en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir algunos estudios que permiten considerar la tecnología CRISPR/Cas9 una herramienta útil en la edición de genomas bacterianos.
2. Demostrar los mecanismos por los cuales la tecnología CRISPR/Cas9 permite la Re-sensibilización de bacterias de interés clínico.
3. Presentar algunos hallazgos en la edición de genomas de *E. coli* y *P. Aeruginosa* que son relevantes para contrarrestar la resistencia a antibióticos producto de THG.

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 90, la comunidad científica ha estado emitiendo llamados de atención y alertas a los gobiernos, instituciones internacionales de salud, farmacéuticas, personal médico e individuos; pues se avecina una crisis médica debido a la creciente aparición de microorganismos resistentes a antibióticos y en los últimos años multirresistentes, panresistentes y expansivo rresistentes (1). Es altamente probable un escenario en el cual los antibióticos no sean capaces de eliminar o controlar dichos microorganismos, amenazando así la salud pública global.

La alerta más reciente dada por la OMS en 2018 y sustentada por el sistema de Vigilancia de Resistencia a los Microbianos GLASS por sus siglas en inglés revela multirresistencia en 500.000 muestras de personas en 22 países diferentes.

La existencia de malas praxis por parte del personal médico tratante, es un factor importante en el fenómeno de resistencia antibiótica extendida, que consiste en la formulación de antibióticos sin la comprobación que el origen de la infección es bacteriano ni el pleno conocimiento del funcionamiento del antibiótico frente a la misma. Se da la fórmula médica sin exámenes previos que confirmen el diagnóstico ameritando dicha posología, no se calcula la efectividad y concentración. En consecuencia, se conocen casos de pacientes cuyas infecciones no pudieron ser tratadas ya que el microorganismo evidenció multirresistencia a antibióticos (2). A nivel intrahospitalario es frecuente la asociación del uso de dispositivos invasivos con la diseminación de estas bacterias multirresistentes en pacientes inmunocomprometidos y posteriormente en la comunidad.

Se identifica también una conducta riesgosa en el grueso de la población que consiste en auto medicarse sustancias antibióticas ante cualquier sintomatología de malestar general sin confirmar por diagnóstico médico si su origen es o no bacteriano. Le estamos dando todas las condiciones a las bacterias para que sigan

creando una distancia abismal entre su avance contra antibióticos y nuestro ya casi impotente intento por controlar sus efectos patológicos (2).

La Dra. Dame Sally en el 2013 comento: "*Si nosotros no tomamos acciones, es como si regresáramos al ambiente del siglo XIX, donde las infecciones bacterianas nos mataban como resultado de una operación de rutina; a este paso no podremos hacer más nuestros tratamientos contra el cáncer o trasplantes de órganos*" (1).

Los antibióticos también se implementan en la cadena de producción de alimentos, al ser utilizados para el engorde y control de enfermedades en animales, y control de plagas en vegetales; lo anterior, sin una administración adecuada por parte de personal idóneo, provocando resistencia antimicrobiana, puesto que la población en general consume nutrientes provenientes de esta industria que tienen altas concentraciones de antibióticos (3). Un ejemplo claro de esto es la aparición en 2016 del Gen *mcr-1*, que codifica para resistencia antibiótica a colistina; este gen se encontró en cerdos en China y se ha ido diseminando por varios países, siendo aislado también en alimentos y personas. El origen de *mcr-1*, se ha relacionado con la inclusión del uso de antibióticos como la colistina en las prácticas de porcicultura en este país (3).

La problemática mencionada se expande a pasos agigantados en todos los ámbitos de la medicina, afectando procedimientos y avances cuyo éxito depende de la asepsia y esterilidad con que se lleven a cabo, variables que se creían ya controladas. Frente a la imperante necesidad que las compañías farmacéuticas desarrollen nuevos medicamentos; se intenta afrontar el problema tomando otros caminos, por ejemplo realizando planteamientos, protocolos y políticas efectivas a ejecutar en casos complicados como la resistencia a la meticilina de *Staphylococcus Aureus* MRSA, las resistencias de *Escherichia coli* (*E. Coli*) y *Klebsiella spp.*, entre otras de origen intrahospitalario y que se encuentran documentadas desde hace unos años en todas las regiones geográficas incluyendo países como Colombia(4,5.6).

En Colombia se encuentra que hay diversidad de superbacterias resistentes a antibióticos, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas; y que en respuesta a esta dinámica de mal pronóstico, existen los programas de vigilancia de

infecciones intrahospitalarias como estrategia de contingencia, los cuales se encargan de contrarrestar la aparición de infecciones asociadas al uso de dispositivos, la resistencia bacteriana, elevada carga de infecciones y el uso inapropiado de antibióticos en los hospitales; todas estas, variables importantes para la problemática que se intenta abarcar(4,5).

Desafortunadamente estos programas de vigilancia solo incluyen a 10 instituciones de alta complejidad en el país, dejando desamparadas las políticas de las otras instituciones que son afectadas en la actualidad y que inevitablemente se verán enfrentadas a este complejo flagelo más adelante (4).

No obstante, cambiar comportamientos y marcar rutas de emergencia no es suficiente. La ciencia desde diferentes disciplinas y enfoques investiga alternativas a los fármacos antibióticos para contrarrestar los efectos negativos de este fenómeno creciente de multirresistencia. En este contexto aparece una herramienta que se presentó al mundo inicialmente como unas tijeras genómicas y posteriormente con el entendimiento y adaptación de otros elementos, como un sistema de edición genética de alta precisión. Es sin duda alguna uno de los hallazgos más importantes en ciencia y medicina del siglo XXI y se le dio por nombre CRISPR Cas 9 (7).

La naturaleza de la tecnología CRISPR, es procariota y archea, está presente en los microorganismos a modo de respuesta inmune adaptativa y es en consecuencia un descubrimiento complejo en su origen, pero, en contraste de tal practicidad, que es aplicable en laboratorios de distintas disciplinas para abordar diversas dinámicas, modelos y problemáticas (8).

Es tal la versatilidad de CRISPR Cas9 que después de su entendimiento como herramienta de edición genética ha hecho que se desborde la investigación en muchas áreas del conocimiento, dando como resultado varios hallazgos que apuntan a que las herramientas de edición genómica propias de esta respuesta inmunológica procariota son altamente específicas y que pueden modificarse para volverlas bastante eficientes y de amplio espectro; en otras palabras, tiene potencial para editar varios genes a la vez (7). Este señalamiento es importante si se tiene en cuenta que la problemática de resistencia múltiple a antibióticos en muchos

microorganismos está dada por cambios en su genoma que les permiten evadir el efecto de los fármacos destinados a controlar su población y que con CRISPR/Cas9 dichos cambios podrían contrarrestarse.

Es claro que la resistencia antimicrobiana de los bacilos Gram negativos multirresistentes está determinada no sólo por mutaciones cromosómicas sino también por la adquisición de genes transferibles entre diferentes especies.

El mecanismo de resistencia más importante de las bacterias Gram negativas es la producción de betalactamasas. Clínicamente se considera que las de mayor impacto son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), aunque también hay genes de resistencia transferidos por plásmidos tales como el *mcr-1* de resistencia a colistina y el *gyr* de resistencia a quinolonas (3,9,10).

Dado este contexto de resistencias bacterianas en bacilos Gram negativos, es importante evaluar soluciones alternativas a la síntesis de antibióticos nuevos, teniendo en cuenta que muchas de ellas se encuentran en los listados de emergencia por resistencia crítica a antibióticos de la OMS, al ser microorganismos cada vez más complicados de tratar y que causan serios problemas médicos (2). Algunos hallazgos sugieren la eficiencia de CRISPR Cas como una pieza importante para re sensibilizar las bacterias Gram negativas *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por medio de la edición de genes de resistencia antibiótica para resolver parcialmente la problemática global de las resistencias bacterianas (3,9,10,11).

El objetivo general de esta revisión es evidenciar la hipótesis que afirma que la tecnología Cris Cas 9 puede ser una herramienta clave a emplearse para mitigar la resistencia a antibióticos relacionada con THG en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), que son un problema de salud pública a nivel intrahospitalario en Colombia (2, 4); por medio de la búsqueda específica de artículos recientes en bases de datos con validez científica, que den cuenta que se ha logrado en este campo, describiendo sus resultados y acercándonos a sus implicaciones y alcances.

Se documenta y discute si puede el sistema CRISPR Cas9 prevenir la resistencia bacteriana a antibióticos en Gram negativos, su proliferación y si al menos en teoría

puede llegar a ayudar a mitigar el panorama siniestro para la salud pública en Colombia debido a la insuficiencia de las medidas para prevenir y controlar la aparición de súper bacterias Gram Negativas multirresistentes producto de transmisión de información genética horizontal a través de plásmidos.

Cabe señalar que Los investigadores cercanos a su descubrimiento y desarrollo la señalan como un elemento que podría revolucionar a la sociedad global incluso más que la invención del teléfono móvil inteligente, debido a que su versatilidad permite que haya un incremento de conocimientos que pueden llevarse a la experimentación, en campos que se veían tan distantes como el trasplante de órganos, diseño y modificación de genomas, mejoramiento de especies y otros que en general están relacionados con la ingeniería genética.

Dicha practicidad ha hecho que se desborde la investigación con estos sistemas CRISPR Cas9, dando como resultado varios hallazgos que apuntan a que las herramientas de edición genómica propias de esta respuesta inmunológica procariota son altamente específicas y que pueden modificarse para volverlas además ampliamente eficientes.

El planteamiento anterior es importante si se tiene en cuenta que la problemática de resistencia múltiple a antibióticos en muchos microorganismos está dada por cambios en su genoma que les permiten evadir el efecto de los fármacos destinados a controlar su población.

Ahora bien, si unimos los dos argumentos ya mencionados, está claro que con esa capacidad de edición genómica que procuran los sistemas derivados de Crispr y en especial el CRISPR Cas9, se provoca la inevitable discusión en la cual el hecho de poder editar genomas sin importar el dominio del ser vivo a modificar; por medio de alguno de los mecanismos que puede tomar esta tecnología en su actuación sobre un loci Diana, es posible hacerle frente a la multirresistencia bacteriana, bien sea a través de algún tipo de vacunación a las bacterias, a los organismos afectados por ellas, e incluso alguna modificación en los procariontes que inhiba los cambios que los hacen resistentes; debido a la amplia presentación de mecanismos moleculares encontrados por los investigadores en estos últimos años, no se descarta que el

desarrollo de esta tecnología tenga como posibilidad derivada adaptarse para erradicar enfermedades no solo bacterianas sino virales de importancia pública como citomegalovirus y VIH.

1. ANTECEDENTES

Cuando se descubrieron en *E. coli* las repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente espaciadas que hoy conocemos como secuencias (CRISPR), corría el año 1987(12), pero fue entre seis y ocho años después (1993-1995), que volvió a haber evidencia de este sistema en *Mycobacterium tuberculosis*, gracias a la investigación del holandés Ruud Jansen quien las había llamado repetidos directos interrumpidos (DR) en ese entonces; respuesta que también se encontró durante el mismo período en la arquea *Haloferox mediterranei* (13). En ese momento Mojica mostro la transcripción de moléculas de ARN que contenían espaciadores (13).

Fue en el 2000 cuando Mojica et al. notaron la presencia de estas secuencias en otras bacterias y arqueas, que se dedujo que estas no se encontraban al azar en estos genomas, sino que debían cumplir presumiblemente alguna función biológico-evolutiva en las células procariontas analizadas (14) (Figura 1).

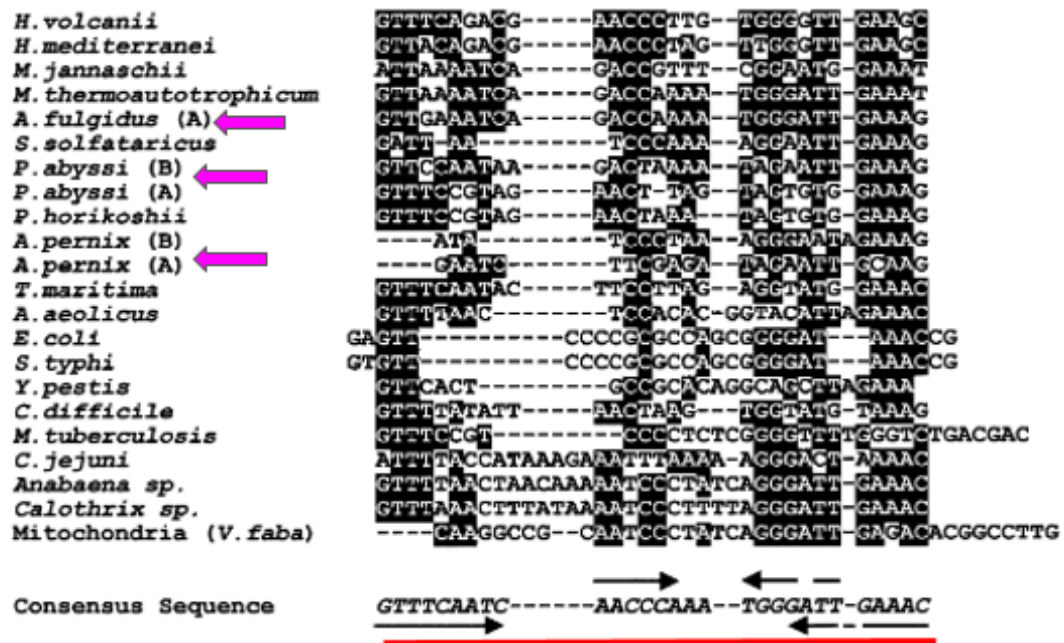


Figura 1. Alineación de las CRISPR, en ese momento llamadas por el Doctor Mojica y su equipo SRSRs (Short Regularly Spaces Repeats). Tomada de (14). Las posiciones señaladas con las flechas color fucsia, son aquellas ocupadas por la base más frecuente, en las secuencias ocupadas. Las flechas subrayadas en rojo indican el carácter palindrómico de las repeticiones encontradas por Mojica y su equipo de trabajo.

En el mismo año, Mojica menciona un grupo de secuencias repetidas periódicamente a las que denominó short Regularly Spaced repeats (SRSR) (14), que en español significa repeticiones cortas regularmente espaciadas; en 2002, al conocerse un poco más del sistema CRISPR/Cas, se deja como nombre definitivo CRISPR(15).

En 2005 se publicaron varias secuencias espaciadas derivadas de ADN exógeno proveniente de plásmidos y bacteriófagos y que guardaban similitud con las ya reportadas en los genomas anteriormente descritos en 1987 en *E. Coli* y en 2000 en arqueas halófilas por el Doctor Mojica y colaboradores (15).

Asimismo, fue hasta el 2005, cuando se hicieron rastreos y mapas genéticos de los microorganismos, que se comprendió que estas secuencias hacían parte de un sistema inmunológico de tipo adaptativo en los procariontes que los defendía especialmente de invasores con contenido genético foráneo como plásmidos y virus, y que dejaba huella en su genoma bacteriano, también en este año, el grupo de Alexander Bolotin, habla claramente del papel de las endonucleasas Cas9 asociado a estas secuencias y de los dominios PAM, al estudiar al *Streptococcus thermophilus* y que son tan importantes para el reconocimiento de las secuencias objetivo (15).

“Posteriormente, en 2006, el grupo de Koonin, en su estudio por análisis computacionales de clusters o agrupaciones de proteínas ortólogas, propusieron un esquema hipotético para la cascada de señalización de CRISPR como sistema de defensa basado en inserciones homólogas del DNA del fago en una matriz espaciadora natural, lo que permitió abandonar la idea de las proteínas cas como sistema de reparación de DNA (Makarova et al., 2006)”(15).

Estas huellas o rastros halladas previamente en *Streptococcus thermophilus*, correspondían con los genomas del invasor y aparecieron en las bacterias estudiadas en el orden cronológico en que se habían enfrentado a ellos, en 2007 Barrangou dedujo la relación entre estos palíndromos moleculares y la inmunidad adaptativa procarionte, cuando entendió que estas secuencias muestran cronológicamente la aparición de virus y plásmidos en la vida de una cepa bacteriana (14,17).

Fue la investigación de Philippe Horvath en 2007, la prueba reina que demostró indiscutiblemente que CRISPR era un mecanismo de defensa adaptativo en los procariontes; al estudiar con su grupo la respuesta fisiológica del *Streptococcus thermophilus* frente a la invasión por fagos; el hallazgo principal fue que la endonucleasa Cas9 es el único elemento relevante para interferir y desactivar la acción de los fagos intrusos evaluados (16).

En el 2008 se presencié cómo CRISPR Cas interfería en la proliferación de fagos en cepas de *E.Coli* y *Staphylococcus Epidermidis*, teniendo como diana secuencias específicas del ADN, e identificando fragmentos de ARN cortos a modo de ARNs CRISPR maduros (crARNs), que además se desempeñaban en un complejo cuyo otro componente era la Caspasa 9 (Cas 9) (15).

Dados estos antecedentes y en especial el de 2008, se entendió el amplio potencial de CRISPR Cas principalmente como herramienta genómica y se le vio también como una tecnología antimicrobiana a desarrollar.

En 2008 además, hacen aparición otros elementos básicos del sistema CRISPR, sin los cuales habría sido imposible armar la herramienta genética que tenemos ahora, ya que son los que orientan el camino a seguir de las caspasas hacia el segmento de ADN objetivo; estos son los ARNs en los que se transcriben las secuencias que se originaron del fago en la célula procarionta afectada, en este caso *Escherichia coli* (crARNs) (17). En ese mismo año Marraffini y Sontheimer, creyeron confirmar que la respuesta inmune procarionta CRISPR/Cas actuaba sobre el ADN y no sobre el ARN como se pensaba en un principio.

En el 2009 Hale et al., nos indicaron, que al existir aproximadamente 45 familias distintas de CRISPR, hay sistemas CRISPR que actúan en el ADN y otros que surten efecto sobre el ARN (15). Moineau en el 2010 encontró que CRISPR/Cas9 rompía el ADN en puntos específicos, tres nucleótidos más arriba de la secuencia PAM y que Cas9 es la única herramienta necesaria para el corte de esta molécula (17).

“En marzo de 2011 Emmanuelle Charpentier et al. realizaron la secuenciación de los RNA pequeños de Streptococcus pyogenes, que contenía el sistema CRISPR-Cas9, descubriendo que, además del crRNA, existía un segundo RNA pequeño, al cual denominaron trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA; y mostraron que este trans-activadorARN (tracrARN) forma una dupla con el crRNA y que es realmente este elemento el que guía a Cas9 hacia su diana (Deltcheva et al., 2011). En julio del mismo año Virginijus Siksnys et al., de la Universidad de Vilna, Lituania, clonaron enteramente el locus CRISPR-Cas de Streptococcus thermophilus, que posee un sistema tipo II, y lo expresaron en Escherichia coli, que no tiene un sistema de tipo II, de modo que se demostró que este sistema era capaz de proporcionar resistencia a plásmidos, lo que sugirió que CRISPR-Cas es un sistema que está formado por unidades autónomas” (18).

En 2012 se evaluaron los dos dominios que presenta CRISPR/Cas9; y se concluyó que el dominio HNH hace que haya corte en el sitio complementario, mientras que el dominio RuvC lo hace en la cadena no complementaria, y que los crARNs pueden cortar hasta 20 nucleótidos, además que estos cortes deben programarse con la caspasa (Cas) (8, 15).

Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, encontraron en un experimento in vitro que la Caspasa 9 de estos sistemas CRISPR, es capaz de cortar un sitio específico que se la ha indicado previamente señalándolo con fragmentos cortos de ARN guía, que vienen a ser los (tracrARN) que ellas mismas ya habían descrito. Este pequeño descubrimiento se convirtió en la prueba que posibilitó pensar en la creación de unas tijeras genómicas capaces de cortar la información genética a voluntad; al dilucidar la oportunidad de cortar una secuencia genómica específica, y puede considerarse el primer paso para la edición genómica con CRISPR/Cas9 (18).

A partir de este hallazgo se ha recorrido un sinfín de probabilidades a nivel de la biología molecular y la ingeniería genética, que se ha comparado con un fenómeno que podría cambiar la sociedad mundial igual o más que el smartphone o la internet (19).

Esta inmunidad adaptativa de procariontes y arqueas requiere tres puestas en marcha para ser efectivo: inicialmente el ácido nucleico foráneo es adaptado por segmentos en el locus CRISPR, luego el locus CRISPR con las nuevas inserciones diseña una plantilla de ARN para complementar la información genómica externa que ha sido adaptada, finalmente el genoma extraño se invalida por una proteína Cas guiada por ARN (20).

En el 2013, Feng Zhang y su conjunto de investigadores que venían trabajando con el sistema TALEN de edición genética, fueron capaces de ensamblar CRISPR/Cas9 para reescribir la información de ácidos nucleicos de células eucariotas; esto se hizo a partir de dos ortólogos de Cas9, correspondientes a los *S. thermophilus* y *S. pyogenes*, haciendo sus pruebas en células humanas y de ratón; la universidad de Harvard replicó el hallazgo en el mismo año (15).

En 2014 Harrison y colaboradores, implementaron los sistemas inmunitarios adaptativos de los procariontes para programar y diseñar las roturas de la doble cadena de ADN “Double Strand DNA breaks” (DSB), que permiten controlar con alta precisión los genomas. La relevancia de este elemento, es el hecho que a partir de (CRISPR) solo se requiere una dirección dada por un ARN de síntesis sencilla y una nucleasa bacteriana como herramientas de edición genómica (20).

En 2015 dos estudios mostraron porque CRISPR es un sistema que se está empleando como alternativa en ensayos de ciencias básicas y aplicadas principalmente en el campo de la medicina como es el caso del silenciamiento de genes, incidiendo positivamente frente a la enfermedad de Huntington (21); y como alternativa a las tecnologías de edición nucleasas con dedos de cinc del inglés zinc-finger nucleases (ZFP) más conocidas como enzimas de restricción y nucleasas tipo activadores del inglés transcription activator-like effector (TALEN), para inducir cambios transcripcionales en los genes, llegando incluso a regular varios de ellos al mismo tiempo (22).

Recientemente en 2018, se dilucidó en la comunidad científica que la proteína Cas9 se puede rediseñar en múltiples variantes como: SpCas9 cuyo peso molecular es de 16 kDa y su secuencia NLS-SpCas9-NLS, (eSpCas9) a modo de plásmido y SpCas9 (SpCas9-HF de alta fidelidad); todas ellas de altísima eficiencia y

especificidad en el sentido que reducen los efectos de edición fuera del objetivo a modificar en el genoma. Por consiguiente, la Cas9 y sus variantes pueden permitir cambios genómicos uni o multialélicos, demostrando que CRISPR Cas 9 es un sistema de edición genómica de amplio espectro con alta eficiencia y especificidad y por lo tanto de excelente precisión (23).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS:

“La resistencia bacteriana a antibióticos es el fenómeno adaptativo en el cual un microorganismo por selección natural o por factores adquiridos, deja de ser afectado por una sustancia que lo inhibía o ante la cual presentaba susceptibilidad” (24). Su consecuencia principal es que las infecciones y enfermedades causadas por microorganismos se vuelven frecuentes, persistentes y crónicas sin que sean efectivos los tratamientos a los que inicialmente se tenía lugar para combatirlos (8).

Son muchos los mecanismos que provocan en los procariontes resistencia a los antibióticos, entre ellos tenemos los intrínsecos o resistencias naturales (enzimas hidrolíticas, modificación de sitio activo, disminución de la permeabilidad de la pared, bombas de flujo entre otros) y los extrínsecos, que en general, se relacionan con la THG, es decir traspaso de información genética entre microorganismos sin que se requiera replicación de individuos, presentándose transmisión de resistencia a antibióticos por medio de transposones y plásmidos que no requieren de identidad de especie para difundir los métodos de defensa adquiridos a otros microorganismos y que son consecuencia mayoritariamente de la presión selectiva por exposición irracional a antibióticos. Las bacterias de importancia clínica que se han convertido en Panresistentes, se han transformado principalmente por adquisición de resistencias a antibióticos a través de THG (25,26).

Las mutaciones se dieron en ellas como consecuencia de la defensa a antibióticos en una dinámica multivariable. Los mecanismos de resistencia producidos por esta vía no se asocian solamente a que las bacterias sean capaces de transmitir

mutaciones genéticas espontáneas a nivel intra e interespecie, (las mutaciones intraespecie pueden ser a nivel de población de la misma generación o de las descendientes), sino a hechos como que la humanidad cursa por un estancamiento en el desarrollo de nuevos antibióticos ya que en gran medida la industria farmacéutica, tiene su atención puesta en enfermedades como lo son cáncer, hipertensión, diabetes, etc., que debido a su creciente tasa de incidencia resultan más rentables y lucrativas, restando recursos a la creación de fármacos antibióticos, cada vez más requeridos frente a la capacidad que tienen las bacterias de renovar su genoma de acuerdo a los retos del entorno a los que requieren adaptarse. Según reportes de la FDA Y EMA “Entre los años 2000 y 2012, solamente se desarrollaron y aprobaron 4 moléculas de tipo antibiótico por la Food and Drug Administration (FDA) y 3 moléculas por la European Medicine Agency (EMA)”(27).

Las pocas sustancias que se desarrollan con este fin para poder tener actividad antimicrobiana de amplio espectro son complejas y desafortunadamente de alta toxicidad (28). Es el caso de las polimixinas que por sus efectos secundarios negativos se utilizan como última opción de tratamiento y ya empiezan a ser inefectivas en el tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por bacterias. La resistencia puede darse por mecanismos intrínsecos, es decir por la naturaleza de los procariontes que presentan factores de virulencia y protección derivados de sus genomas que codifican singularidades de la pared celular, membrana citoplasmática, flagelos, pili, fimbrias, esporas y otros organelos o moléculas, que les confieren adaptabilidad y posibilidad de crecer en colonias formando biofilm que está altamente asociado a la aparición de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, hay resistencia intrínseca porque el microorganismo no tiene el blanco sobre el cual el antibiótico ejecuta la acción o porque a el antibiótico le es imposible acceder a el sitio objetivo (4,5).

También es probable la aparición de resistencia por mecanismos adquiridos cuando hay mutación genética espontánea en el microorganismo generalmente por selección de bacterias mutantes resistentes, que reescribieron su cromosoma pre-existente. En consecuencia tenemos características que van a heredarse verticalmente, es decir a la siguiente generación de la bacteria en la que ocurrió el cambio, una mutación propia de una especie (29).

Los mecanismos de resistencia adquiridos pueden ser mutaciones por procesos de recombinación que son base de la variabilidad genética, sucede cuando por homología entre el ADN receptor y emisor hay transferencia de un gen al genoma destinatario siempre unidireccionalmente (29).

Se considera un mecanismo adquirido cuando el procarionte recibe información extra cromosómica debido a la herencia horizontal de plásmidos y transposones. Se debe a la adherencia de nuevos genes, bien sea, por transducción cuando el ADN plasmídico que fue incorporado a un fago se transfiere a la bacteria, por transposición cuando es de plásmido a plásmido o de plásmido a cromosoma o por conjugación que son los plásmidos de resistencia más frecuentes y, que de hecho son las más peligrosas y al extenderse a gran velocidad a lo largo y ancho del planeta ya que este tipo de herencia de genes es horizontal y no está limitada por las características puras de la especie (29).

2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos incluida la familia Enterobacteriaceae:

En el caso de las bacterias Gram negativas que son las que nos atañen, tenemos en primer lugar la producción de penicilasas relacionadas con plásmidos tipo A (TEM-1, TEM-2 y SHV-1), las cuales provocan resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, aunque las bacterias que las tienen siguen siendo sensibles a cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (30).

Como consecuencia de las enzimas anteriores aparece la resistencia a Beta lactámicos, la cual está mediada por enzimas inactivantes de estos antibióticos y que conocemos como Beta lactamasas, evolucionaron a partir de los plásmidos (TEM-1, TEM-2 y SHV-1) y de la secuencia CTX-M de origen cromosómico (30).

Las Beta lactamasas actúan por diferentes vías: alteran la permeabilidad de la membrana reduciendo o perdiendo las porinas, aumentan las bombas de expulsión

de sustancias e incluso hacen modificación de dianas mutando las proteínas objetivo de las penicilinas (Figura 2).

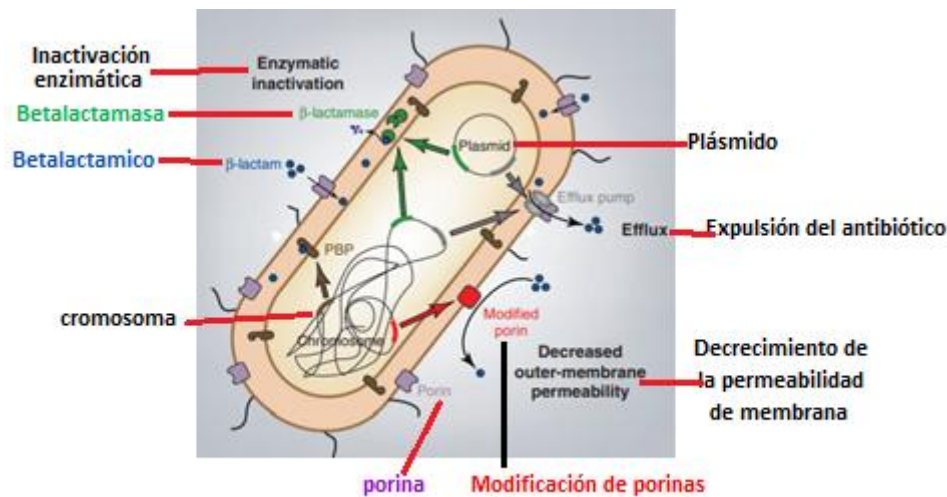


Figura 2. Mecanismos de la resistencia por Betalactamasas en la familia Enterobacteriaceae-Tomadas de (30) Modificado por Catalina García.

La taxonomía de las Beta lactamasas puede ser funcional Bush-Jacoby-Medeiros o molecular en las clases A,B,C y D Ambler (31) (Tabla 1).

AMBLER	GRUPO BUSH-JACOBY (2009)	SUSTRTO	INHIBIDO POR		REPRESENTANTE
			Ac. Clav.	EDTA	
A	2a	Penicilinas	Si	No	PC-1
	2b	Penicilinas y cefalosporinas de primera generación	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-
	2br	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
	2ber	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c	Carbencilinas	Si	No	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbencilina y cefepime	Si	No	RTG-4
	2e	Cefalosporinas de espectro extendido (no actúa e sobre monobactámicos)	Si	No	CepA
	2f	Carbapenemes	Variable	No	KPC, IMI, SME
B	3a	Carbapenemes	No	Si	IMP, VIM, GIM, SPM, SIM
	3b	Carbapenemes	No	Si	CAU, GOB, FEZ
C	1	Cefalosporinas y cefamicinas	No	No	AmpC, CMY-2, FOX, MIR, ACT,
D	2d	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
	2de	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenemes	Variable	No	OXA-23, OXA-24, OXA-48

Tabla 1. Clasificación de las Betalactamasas en Bacterias Gram Negativas: Tomada de (31).

2.2.1. Betalactamasas de Espectro Extendido o BLEES:

Son enzimas que hidrolizan monobactames y cefalosporinas de amplio espectro pero no inactivan cefamicinas ni carbapenemas, otra característica importante es que suelen estar asociadas a plásmidos y derivarse de enzimas cuya acción hidrolítica es menor (25).

2.2.2. Betalactamasas tipo carbapenemasa:

Son Beta lactamasas versátiles que hidrolizan carbapenemas y casi toda molécula Betalactamica, esto incluye las cefamicinas. Se clasifican en dos grupos de acuerdo al mecanismo hidrolítico de su sitio activo: las oxacilinasas o carbapenemasas clase A y D, las cuales contienen serina en su estructura. Las metalobetalactamasas o clase B, que requieren cinc (Zn) para llevar a cabo su función enzimática (Tabla 2).

Metalobetalactamasas MBL-clase B	Enzimas tipo serina Clase A	Oxacilinasas - Enzimas tipo serina Clase D
VIM, NDM , IMP, SPM,, GIM, SIM, AIM, KHM, DIM FIM	KPC , GES, Sme, IMI/NMC	OXA-23 , OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143, OXA 48

Tabla 2. Clasificación de carbapenemasas. En rojo aparecen aquellas resistencias de mayor relevancia en salud pública en Colombia Tomado de (25). Modificado por Catalina García.

2.2.3. Resistencia a Aminoglucósidos:

A excepción de *Serratia marcescens* y *Providencia Stuartii*, cuyos genes les confieren resistencia a gentamicina, tobramicina y neomicina, se considera que en general las bacterias Gram negativas son sensibles naturalmente a los aminoglucósidos, su genoma de no ser alterado logra que no haya inhibición del crecimiento de estas procariontas en presencia de este tipo de antibióticos. Como resistencia adquirida pueden presentar inactivación de tipo enzimático (enzimas AAC, APH; ANT) y metiltransferasas (enzimas ArmA, Rmt, Npm) (31).

2.2.4. Resistencia a quinolonas:

Puede darse en las bacterias gram negativas por presencia de bombas de expulsión, por mutaciones que afectan las porinas, mutaciones que afectan el polisacárido y principalmente por mutaciones de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV; se encuentra en estudio su relación con plásmidos, especialmente cuando la resistencia de la bacteria es frente a una fluoroquinolona (10).

2.2.5. Plásmidos de resistencia:

Son secuencias de ADN que están ubicadas fuera del cromosoma y que no requieren de las funciones de la célula para poderse replicar. Son capaces de conferir resistencia a antibióticos; llegan a las bacterias bien sea por transformación; cuando el ADN de una bacteria muerta es captado e integrado en el ADN de una bacteria receptora, o por transducción; cuando el ADN donado llega al ADN de la bacteria receptora a través de un fago mensajero, o por conjugación cuando la bacteria donante le entrega el ADN a la bacteria receptora por medio de pilis (32).

La aparición exacerbada de plásmidos de resistencia se debe a la prescripción indiscriminada de antibióticos, utilización de antibióticos de amplio espectro en pacientes inmunosuprimidos, implementación de dosis y duración mal determinada y desconocimiento general de la población acerca del fenómeno de resistencia bacteriana (32).

Son una variable determinante en la lucha contra la resistencia a antibióticos porque se encuentran bastante extendidos, pueden provocar en las bacterias portadoras

resistencia a más de un antibiótico, aumentan la virulencia y tasa de crecimiento bacteriana, dispersan la resistencia simultáneamente a bacterias de especies distintas y causan todos los tipos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas se han mencionado hasta este punto (30).

2.3. *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*:

Las dos especies bacterianas tienen una gran versatilidad para resistir intrínsecamente a los antibióticos; además son amplios receptores y creadores de resistencia a antibióticos transmisibles de manera horizontal, suelen presentar otros tipos de mecanismos de resistencia a antibióticos tanto naturales como adquiridos (24).

E. coli está clasificada taxonómicamente como *Dominio: Bacteria, Reino: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Gamma proteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: Escherichia, Especie: E. coli* (33).

P. Aeruginosa por su parte pertenece al *Dominio: Bacteria, Reino: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Gamma proteobacteria, Orden: Pseudomonales, Familia: Pseudomonadaceae, Género Pseudomonas, Especie P. Aeruginosa* (34).

Estos dos bacilos Gram negativos son de importancia clínica por las infecciones que pueden ocasionar especialmente en personas inmunosuprimidas o aquellas que pueden o no estar asociadas a estadías extensas o temporales recurrentes en hospitales, especialmente en unidades de cuidados intensivos (UCI), también por su contacto frecuente con equipos y dispositivos médicos invasivos o no invasivos (35).

Ambas bacterias tienen cepas multirresistentes por todo el planeta y como se organizan en biofilm son todavía más difíciles de enfrentar en el ámbito clínico, este amplio espectro de resistencia tiene su causa en varias particularidades de *P. aeruginosa* y *E. coli*, una de ellas es que tienen un genoma bastante grande para tratarse de bacterias, *P. Aeruginosa* tiene entre 5 y 7 millones de pares de bases (pb) o 5000 y 7000 Kilobases (Kb) dependiendo de la cepa y *E. coli* 4,2 millones de pares de bases (pb) o 4200 Kilobases (Kb) (36).

2.3.1 GEN mcr-1:

El mobile colistine resistance (mcr-1), resistencia móvil a colistina en español, es un gen hallado en China en el 2016 en 260 muestras de *E. coli* provenientes de cerdos y muestras clínicas de pacientes hospitalizados (3). El gen mcr-1 se transmite por vía plasmídica en las enterobacterias, otorgando resistencia a las polimixinas, más específicamente al antibiótico de última línea contra bacterias multirresistentes colistina (polimixinas B y E). "Químicamente es un anillo peptídico policatiónico que contiene entre 8 y 10 aminoácidos" (37), esta fosfoetanolamina modifica el blanco de la colistina que es el lípido A, impidiendo que el antibiótico tenga afinidad por este elemento de la pared celular de los Gram negativos (3).

En estos últimos tres años después de su identificación se sabe que el gen mcr-1 se encuentra distribuido geográficamente en aproximadamente 16 países, especialmente del sudeste asiático y Europa. Colombia no está exento de su propagación, en el 2016 se encontraron tres aislamientos de *Salmonella entérica* positiva para el gen mcr-1 en alimentos procedentes de Bogotá (37) y en el 2018 el Instituto Nacional de Salud (INS) publicó una alerta en la que se identificó el gen de resistencia a colistina mcr-1 en aislamientos de *Salmonella entérica serovar Typhimurium* y *E. coli*, ambas en aislamientos humanos (Tabla 3).

Microorganismo	<i>S. Typhimurium</i>			<i>E. coli</i> *
Código INS	GMR-S-1257	GMR-S-1454	GMR-S-356.16	GMR-RA-229.16
Departamento	Bogotá	Antioquia	Boyacá	Santander
Edad (años)	1	2	5	35
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino
Muestra	Materia fecal	Orina	Materia fecal	Secreción vaginal
Año de aislamiento	2015	2015	2016	2016
CIM (µg/mL) de colistina**	>4	>4	>4	16
Resistencia adicional (Resistente o intermedio)	AMP	TET, CHL, NAL, AMP, CIP	TET, CHL, NAL, AMP	AMK

* Aislamiento de consulta externa remitido al programa IAAS por la alerta de enero de 2016, para confirmación de resistencia a colistina.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

** CIM de colistina determinada por Microscan en *Salmonella Typhimurium* y por E-test en *E. coli*.

TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina, AMK: Amikacina.

Tabla 3. Datos demográficos y características microbiológicas de aislamientos positivos para el gen mcr-1 en Colombia (38).

2.3.2. Colistina

Es un polipéptido cíclico catiónico, descubierto en Japón en 1949, había sido abandonado en 1970 por su alta toxicidad, pero se le tuvo que volver a implementar como tratamiento de última línea contra bacterias multirresistentes como *P. Aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*. Solamente se agrupan en las colistinas la polimixina B (*Bacillus polymyxa*) y la polimixina E (*Bacillus colistinus*) (28).

Esta molécula está unida a una cadena de ácido graso (6 metil-ácido octanico y su mecanismo de acción consiste en competir directamente con el Ca^{+2} y Mg^{+2} que al ser estabilizadores de la membrana de las bacterias Gram negativas, se distorsionan en su función disrumpiendo la permeabilidad de membrana (28).

La colistina tiene buena actividad microbiana en: ***P. Aeruginosa*** (CMI<4 mg/dL), *Acinetobacter spp.* (<2), *Klebsiella pneumoniae* (<1) y *Enterobacter spp.* (<1); actividad media en *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter spp.* y ***E. coli spp.*** y muy poca actividad en *Providencia*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Brucella*, *Aeromonas*, *Morganella*, *Edwardsiella*, Gram positivos y cocos Gram negativos anaerobios. Su uso puede ser tópico, oral o palenteral, puede causar nefrotoxicidad en un 6-14% de quienes la usan, aunque es más frecuente que aparezcan parestesias, somnolencia, ceguera parcial y otros síntomas de neurotoxicidad (28).

2.3.3 Mutación gyrA

Son mutaciones que se dan en la ADN girasa y la topoisomerasa (*gyrA*) de *E. coli*, se determina por un cambio en los aminoácidos en las posiciones 83 y 87. Estos aminoácidos se encuentran cerca de los sitios activos de la ADN girasa junto con un residuo de tirosina que interactúa con la cadena de ADN rota durante la reacción de topoisomerasa. Las mutaciones en este sitio activo pueden alterar la unión de las quinolonas, reduciendo así la susceptibilidad del organismo al fármaco (39)

2.3.4 Quinolonas

Son sustancias antibióticas que aparecieron sintéticamente en los años 70, siendo su primer representante el ácido nalidíxico y que actúan en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos (40). Las quinolonas tienen como diana a las cuatro topoisomerasas bacterianas, las cuales son enzimas fundamentales para la síntesis del ADN en el desenrollamiento y enrollamiento cromosómico (40).

Las primeras quinolonas eran inútiles frente a infecciones sistémicas porque tenían baja penetración tisular, su espectro antimicrobiano era reducido, provocaban alta toxicidad en los pacientes llegando incluso a causar efectos negativos en el sistema nervioso central SNC y hacían exacerbar la rápida aparición de resistencia bacteriana a antibióticos; de tal manera que a las nuevas quinolonas les adiciono un átomo de flúor en su estructura molecular haciéndolas más efectivas (40). Dentro de las quinolonas de primera generación encontramos el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico, ambos con actividad exclusivamente en enterobacterias, baja distribución sistémica y por lo tanto su uso se limita al tratamiento de algunas infecciones urinarias (40).

En la segunda generación está el norfloxacin, el cual amplio el espectro en Gram negativos incluyendo actividad sobre *P. Aeruginosa*, su acción en Gram positivos se considera moderada, no presenta efectos en las bacterias anaerobias y tampoco se emplea en infección sistémica porque no tiene óptima distribución tisular (40).

En la tercera generación aparecen el ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino que mantienen la actividad de las quinolonas de la segunda generación, pero al tener mejor absorción oral, son más eficaces frente a *P. aeruginosa*, bacterias atípicas y bacterias Gram positivas, estos fármacos si tienen validez frente a infecciones sistémicas (40). De la cuarta generación se sintetizó el moxifloxacino, al cual le mejoraron la actividad en Gram positivos y anaerobios, pero perdiendo actividad en *P. aeruginosa* y *E. coli* (40).

Dentro de las quinolonas más empleadas actualmente, hay modificaciones importantes para evitar los problemas de las primeras sustancias de esta naturaleza; se les adiciona un átomo de flúor en la posición seis del primer anillo aromático para mejorar la penetración tisular y adherencia a las topoisomerasas; se

incluye el flúor en este anillo en la posición siete del anillo pirrolidónico derivado si lo se quiere es mejorar la actividad en bacterias Gram negativas, se ubica un grupo piperacínico en la posición siete (norfloxacino y ciprofloxacino) o metil piperacínico (ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino) para mejorar la acción en bacterias Gram negativas y para ser más letal en bacterias anaerobias se coloca un grupo metoxi en la posición ocho (moxifloxacino) (40).

Las bacterias que presentan resistencia adquirida a las quinolonas utilizan como mecanismo principal para ello la alteración del blanco de las mismas. Mientras los Gram positivos mutan el gen que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV (Gen parC), los Gram negativos presentan mutación del gen que codifica la subunidad de la ADN girasa, también conocida como topoisomerasa II (Gen gyrA) (10).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó un análisis bibliográfico sobre la herramienta CRISPR/Cas9 y su implementación en la lucha contra la resistencia a antibióticos presentada en *E. coli* y *P. Aeruginosa*. Para ello se hizo uso de las plataformas de las bases de datos de la Universidad Nacional de Colombia a través de su sistema nacional de bibliotecas (sinab), las bases de datos de la biblioteca de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y gestores bibliográficos auxiliares como Mendeley y zotero principalmente.

Los parámetros de búsqueda definidos fueron: artículos acerca del tema en mención publicados en revistas indexadas de alta validez científica, cuya aparición se haya dado en los últimos diez años (2009-2019), en inglés o castellano y que pudieran obtenerse completos para su lectura, comprensión y análisis.

Se consultaron también artículos de las diferentes entidades de salud para confirmar conceptos de manera actualizada y obtener información epidemiológica relevante, es el caso de datos muy puntuales tomados de la organización mundial de la salud (OMS) e Instituto Nacional de Salud (INS) entre otros.

Se seleccionaron finalmente los artículos más recientes en los cuales se hizo frente a la resistencia a antibióticos de *E. coli* y *P. Aeruginosa* con el uso de la edición genómica de CRISPR/Cas9 y que fueron importantes al dar a conocer hallazgos que demuestran que por medio de esta tecnología se pueden re-sensibilizar a estas dos especies bacterianas para reducir su amplio espectro de resistencia antibiótica.

CRITERIOS DE BÚSQUEDA:

1. EXACTITUD: La información del artículo debía contar con rigor científico.
2. OBJETIVIDAD: Evitar sesgo por creencias personales de los autores.
3. COBERTURA: Los ensayos a documentar debían tener alto impacto científico y alto impacto en salud público en potencia.

4. VIGENCIA: Información reciente para una discusión reciente en cuanto a la tecnología CRISPR Cas9 y el problema de salud pública planteado.
5. RELEVANCIA: Es de interés público.
6. CORRELACIÓN: Responden las experimentaciones a la intervención teórica de los genes de resistencia del territorio nacional.

4. RESULTADOS

La distribución bibliográfica para esta revisión se observa en los gráficos 1 y 2, que muestran los números totales de artículos consultados y sus respectivos porcentajes, evidenciando que la temática más frecuente es aquella relacionada con ingeniería genética (74,41%), la menos frecuente la que investiga las mutaciones asociadas a resistencia (5,3%) y la relevante para este documento que fue la escogida como investigación principal conformada por artículos sobre resistencia a colistina, resistencia a betalactamasas y resistencia por mutaciones (80,71%), lo cual señala la pertinencia del estudio y su precisión de búsqueda.

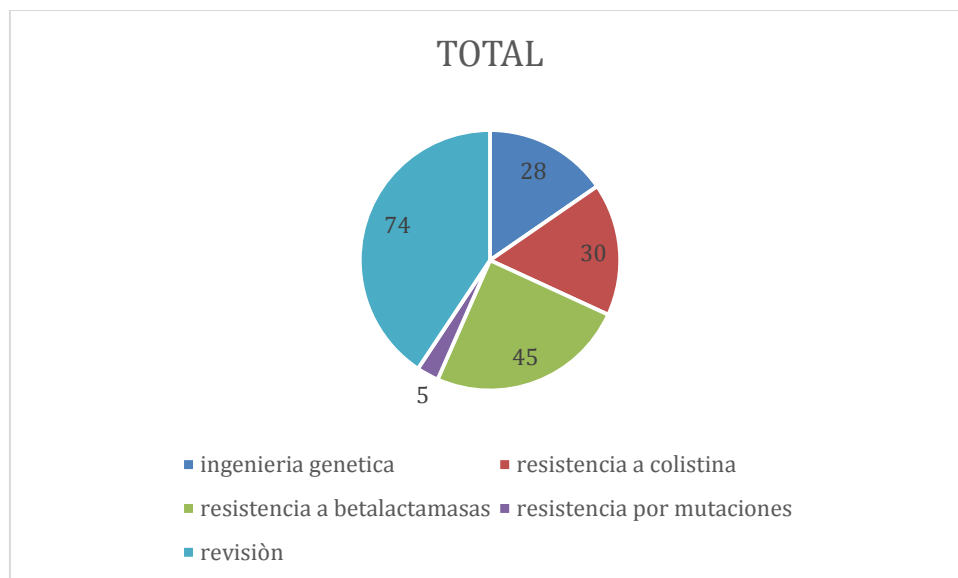


Gráfico 1. Distribución de artículos revisión bibliográfica.

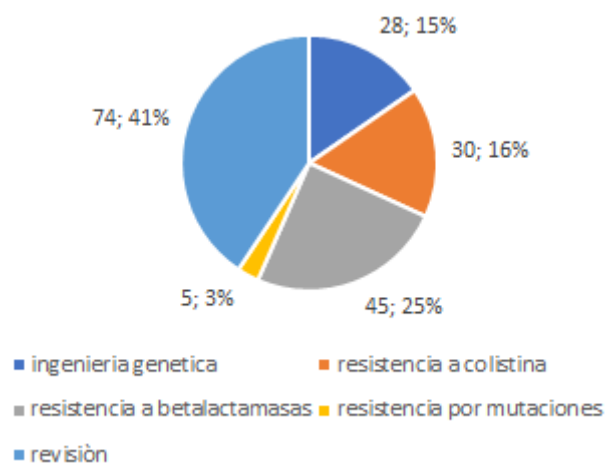


Gráfico 2. Porcentaje de documentación por temas hallados en bases de datos.

Los siguientes resultados buscan resaltar la versatilidad de la técnica de CRISPR/Cas9 para la edición genes y señalar algunos descubrimientos relevantes que han permitido utilizarla exitosamente en la re-sensibilización de cepas como *E. coli* y *P. aeruginosa*.

El concepto de re-sensibilización hace referencia a todo proceso de edición genética que al ser empleado en una cepa bacteriana que había adquirido previamente multiresistencia a antibióticos por transmisión horizontal de plásmidos, demuestre haber devuelto a dicha bacteria sus características previas a la adquisición de esta información de resistencia frente a antibióticos, volviéndola nuevamente susceptible (9).

4.1. Herramienta de CRISPR/Cas 9

La herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9 se ha convertido gradualmente en una tecnología de última generación en biología molecular, genética y otras disciplinas. Su relevancia biológica radica en que al ser un mecanismo de respuesta inmune adaptativa que utilizan los procariontes (bacterias y arqueas de los cuales se ha detectado la presencia de este sistema en sus genomas, entre un 40 % y 90% respectivamente) para defenderse del ataque de plásmidos e infecciones virales, esta técnica puede usarse para programar genéticamente otros microorganismos (7, 8, 16, 41).

Cuando se realiza la adaptación de esta herramienta, este sistema es capaz de cortar una secuencia genética específica e incluso re-escribirla si está acompañada del complejo ARN señal, la secuencia PAM indicada y la caspasa exacta para ese fin, siendo al día de hoy el método de edición genética de mayor precisión y eficiencia (41).

En la actualidad se entiende que el sistema CRISPR/Cas9 tiene por componente principal secuencias; que como la traducción de sus siglas en inglés nos lo dice, son fragmentos repetidos a lo largo del genoma de bacterias y archeas, presentados como palíndromos que pueden leerse linealmente y que se presentan periódicamente en la información genética. El genoma de los procariontes es circular

y está compuesto por una única molécula circular de ADN, la cual es bicatenaria, con sus correspondientes secuencias nucleotídicas (ACGT), que a su vez son complementarias y están unidas por enlaces. Este cromosoma puede equipararse a una oración que se lee sin pausas ni espacios (42).

Las CRISPR son solo un elemento del sistema, pues, dentro de ellas se encuentra otro elemento, los espaciadores o secuencias únicas de ADN repetidos, cuya función tanto en la respuesta biológica de defensa bacteriana como en la tecnología derivada, es identificar las secuencias dianas específicas para luego dirigir las nucleasas que cortan el ADN. También son pieza clave de este sistema las zonas aledañas a las CRISPR que codifican para proteínas Cas, es decir, los genes Cas; y por último las proteínas caspasas quienes ejecutan toda la actividad genético-molecular de estos sistemas (43) (Figura 3).

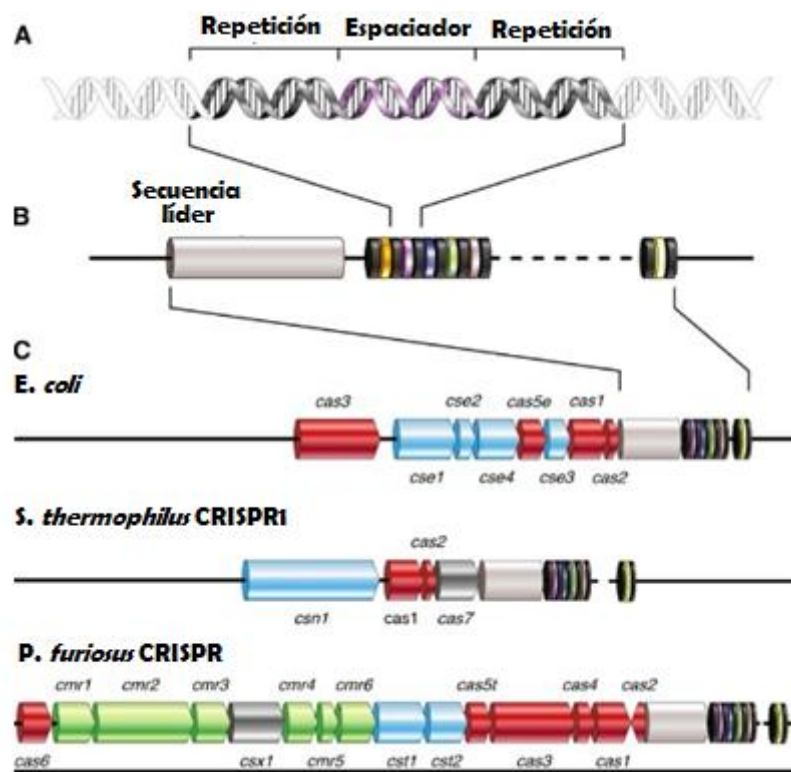


Figura 3. Secuencias repetidas de CRISPR. Tomada de (43). A. Secuencias repetidas de 32 pb aproximadamente, se intercalan con espaciadores del mismo tamaño. B. Secuencia líder, las unidades espaciadoras repetidas varían mucho en número. C. Los genes (*cas*) asociados a CRISPR rodean el locus CRISPR. Los fragmentos rojos representan a los GENES CORE Cas, azules a los GENES ESPECÍFICOS, verdes al MÓDULO RAMP y los grises a los GENES NO CLASIFICADOS. Modificada por Catalina García.

CRISPR / Cas9 funciona en los procariontes como un sistema inmunitario adquirido contra plásmidos y fagos donde el ARN CRISPR (ARNcr) junto con el ARNcr transactivante (tracrARN) programa la unión al ADN y la actividad nucleasa de Cas9. (7).

“La invención del ARN guía único (sgARN) mediante la fusión de crRNA y tracrRNA fue un avance importante en este campo porque simplificó la tarea de programar Cas9 para crear roturas en sitios de ADN específicos *in vitro*” (7); fue la adaptación del ARN guía sgARN el que permitió que esta tecnología se acoplara a la edición genética celular (7).

El papel de sgRNA es reconocer la secuencia diana en el genoma objetivo, por medio del protoespaciador emparejando las bases por complementariedad. Enseguida Cas9 rompe la estructura bicatenaria a 3 pares de bases de la secuencia del Motivo Adyacente Protospacer (PAM), que normalmente proviene de *Streptococcus pyogenes* y corresponde a NGG en el caso de Cas9, siendo el PAM más utilizado; otros ejemplos de PAM en otras especies bacterianas incluyen: NNNNGATT en *Neisseria meningitidis* o NNAGAA en *Streptococcus thermophilus* (Fig. 4).

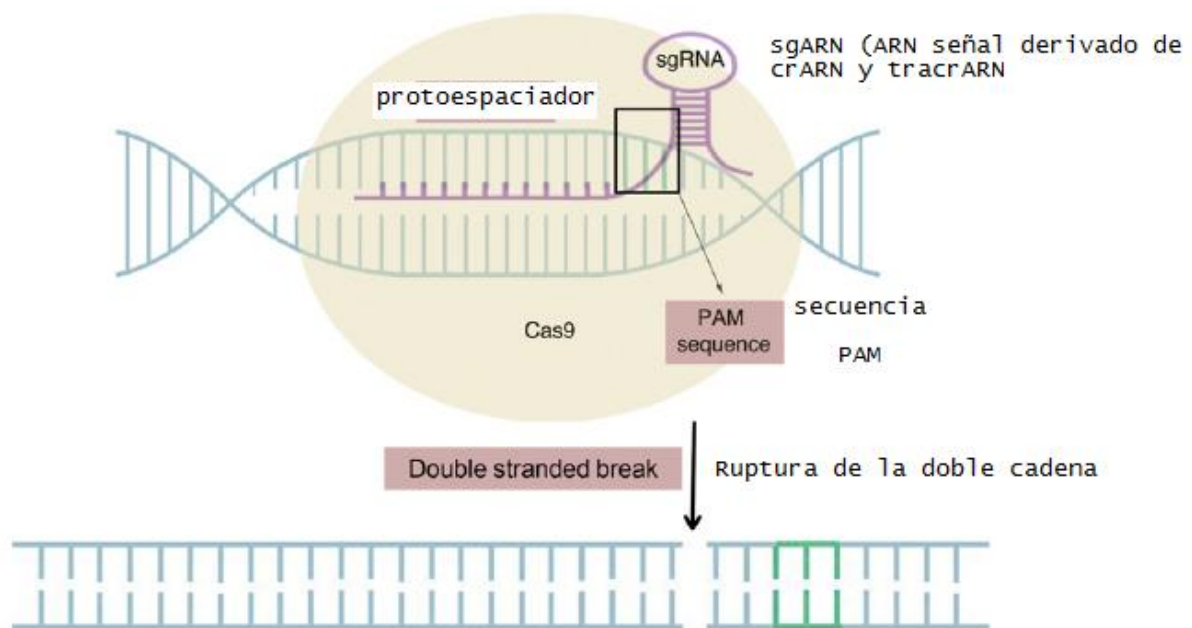


Figura 4. Mecanismo básico de CRISPR/Cas9. (7). Modificada por Catalina García.

4.1.1. CRISPR Cas 9 (CRISPR Cas tipo II)

Hasta la fecha se encuentran discriminados y clasificados seis tipos de sistemas inmunitarios adaptativos bacterianos CRISPR Cas (CRISPR - Cas I-VI); según sus mecanismos moleculares para el reconocimiento de ácidos nucleicos y el ensamble específico que cada uno de los sistemas ejecuta (7). En esta revisión solo se abarca el potencial de CRISPR Cas 9 (CRISPR Cas tipo II) como herramienta de control de resistencia antimicrobiana en Gram negativos.

A lo largo de las investigaciones con CRISPR Cas, el tipo de sistema más utilizado ha sido CRISPR/Cas9, siendo su objetivo principal la regulación genética, y así demostrando su eficiente intervención al editar genomas en procariontes y eucariontes (15).

Ya explicadas las características de CRISPR/Cas como respuesta inmune, se describe a CRISPR Cas 9 como herramienta de edición genética; la cual consiste en CRISPR, espaciadores, sgARNs o ARN guía, secuencia PAM y Caspasas (Cas), estas últimas se asocian como proteínas específicas de secuencias de ADN externo (7). Las secuencias PAM son secuencias de ADN de 2-6 pares de bases, que se presentan inmediatamente después de la secuencia de ADN dirigida por la nucleasa Cas9, en el sistema inmune adaptativo bacteriano CRISPR.

Se emplea frecuentemente a CRISPR Cas9 (CRISPR Cas tipo II) por su sencillez, pues al tener menos elementos que otros tipos de CRISPR bacterianos, permite que haya precisión y que los modelos experimentales planteados con este sistema sean más fáciles de monitorear y controlar, lo que garantiza resultados claros y reproducibles, llegando incluso a ser una tecnología de fácil extensión y bajo costo en el mundo, es decir es una tecnología al alcance de todos (7).

4.1.2. Fases del mecanismo de la inmunidad de CRISPR/Cas9 Tipo II

El mecanismo de la inmunidad mediada por CRISPR-Cas consta de tres etapas diferentes:

4.1.2.1. Adaptación:

Las proteínas Cas promueven la inserción de una secuencia de nucleótidos cortada desde el genoma invadido como un nuevo espaciador en la matriz CRISPR dentro del hospedero bacteriano, esto como respuesta a la exposición de un ADN externo. La fase también es descrita por varios autores como arreglo CRISPR (Figura 5a).

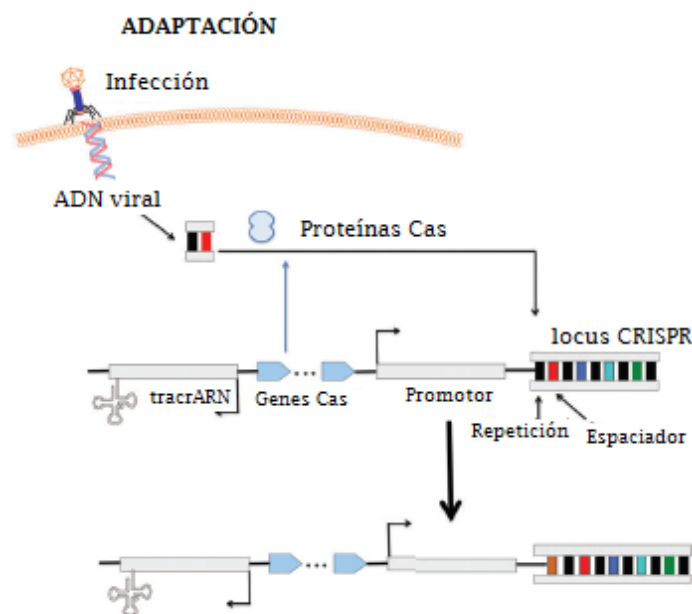


Figura 5a. Fases del Mecanismo de Edición CRISPR/Cas9 Tipo II. Adaptación Tomada de (8). Un invasor plasmídico o viral ingresa su genoma provocando una memoria de secuencia de dicho genoma en la célula, así la célula adquiere una secuencia corta del elemento extraño. Modificado por Catalina García.

Expresión: el arreglo repetido periódicamente o espaciador se transcribe como un ARN largo precursor de CRISPR (Pre / CRISPR), el cual es procesado por trans activación crARN (tracrARN) para el caso del sistema tipo II, pues en otros sistemas CRISPR este paso lo realizan las Cas nucleasas (Figura 5b).

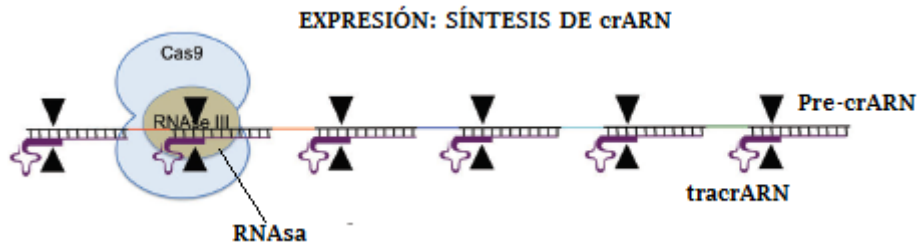


Figura 5b. Fases del Mecanismo de Edición CRISPR/Cas9 Tipo II. Expresión Tomada de (8). El espaciador se transcribe y un crARN inmaduro, se convierte en un crARN listo para ejecutar la función de guía de corte. Modificado por Catalina García.

Interferencia: los crARNs pequeños asociados a las proteínas Cas forman un complejo ribonucleico. Los crARNs son usados como guías que direccionan los complejos crARN - Cas a los sitios dianas presentes en el genoma invadido, los cuales a su vez son complementarios a los crARN secuencia espaciadores (Figura 5c).

“Las secuencias de crARNs que determinan el direccionamiento de ADN por CRISPR resultan de la adquisición de nucleótidos extraños en la matriz CRISPR durante exposiciones previas de la bacteria a un fago o plásmido. Este proceso constituye un sistema inmune adaptativo bacteriano, ya que permite el registro preciso de encuentros pasados con elementos invasores del ADN” (8).

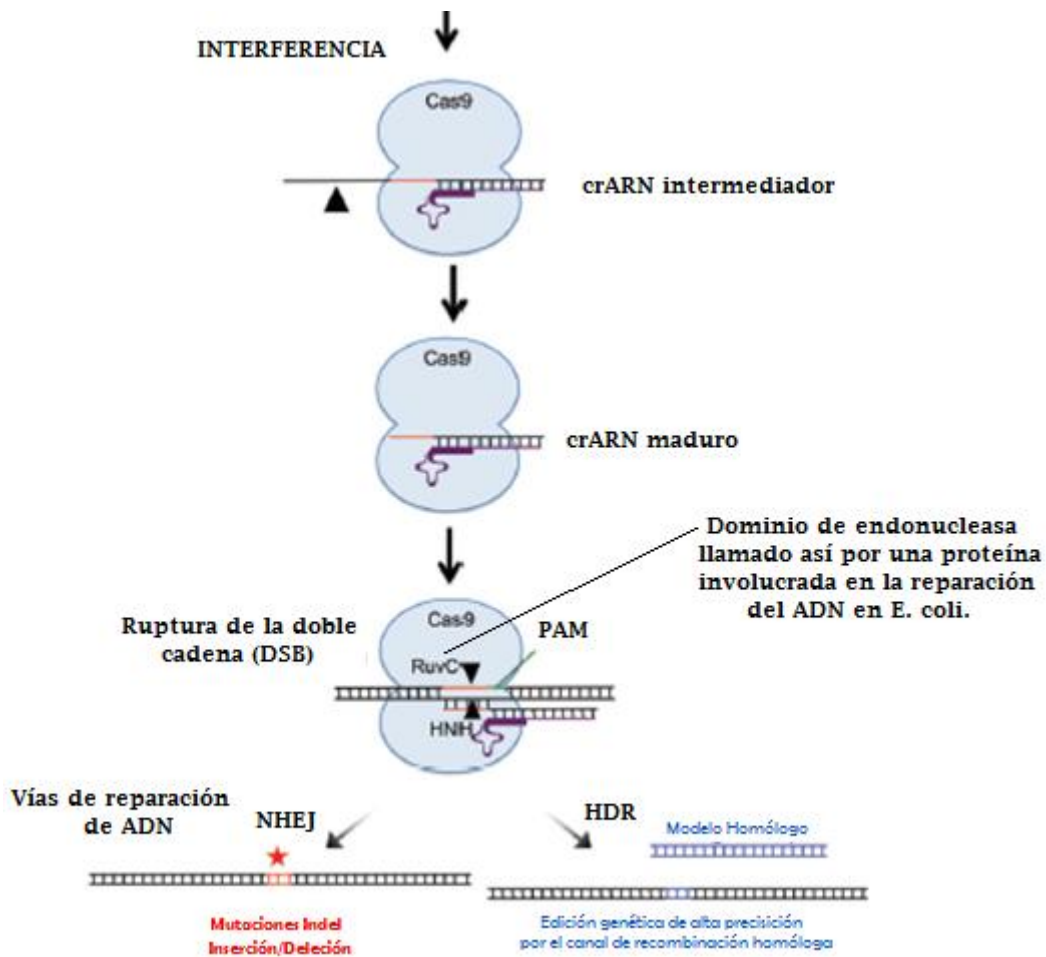


Figura 5c. Fases del Mecanismo de Edición CRISPR/Cas9 Tipo II. Interferencia Tomada de (8). El espaciador se transcribe y un crARN inmaduro, se convierte en un crARN listo para ejecutar la función de guía de corte. El crARN maduro, está listo para dirigir a la endonucleasa a su segmento de ADN específico; al final de la figura se observan los dos caminos de reparación que puede tomar la célula, mutaciones indel o por homología. Modificado por Catalina García.

Explicadas estas fases de inmunidad, se entiende el funcionamiento de la Interferencia genómica de CRISPR/Cas9 al emplearse como herramienta de edición, CRISPR/Cas 9 permite la represión transcripcional de cualquier gen de interés, ya sea inhibiendo la elongación de la transcripción o la iniciación de la transcripción, y así como naturalmente activa los genomas bacterianos, se puede emplear para mejorar la expresión genética mediante la fusión de complejos con dominios transcripcionales activadores que reclutan la ARN- polimerasa y la guían a la región promotora del gen destinatario (8).

Son varias las formas en las que CRISPR/Cas9 puede implementarse en la lucha contra los antibióticos. En el 2014 con esta herramienta se estableció un efecto citotóxico en procariontas al hacer un corte cromosómico, que tenía por objetivo

evaluar que le sucedía a la enzima de resistencia New Delhi- Metalo- Betalactamasa (NDM-1) presente en *E. coli* ti (44). Para el estudio se utilizaron nucleasas guiadas por ARN (gARNs), que fueron llevadas por plásmidos de conjugación de origen bacteriano o viral, y buscaban la diana específica para NDM-1 presente en *E. coli* enterohemorrágica, el cual es un fragmento de ADN codificante para resistencia bacteriana a carbapenemasas (9).

Las construcciones de gARN entregadas por partículas bacteriófagas (Φ RGN) presentaron efectos antimicrobianos eficientes y específicos contra cepas que contenían secuencias diana presentes en plásmidos o cromosomas de la célula hospedero, también se determinó que las construcciones gARN administradas por bacteriófagos pueden afectar de manera diferencial la fisiología de la célula hospedero de una manera dependiente de la secuencia (Figura 6).

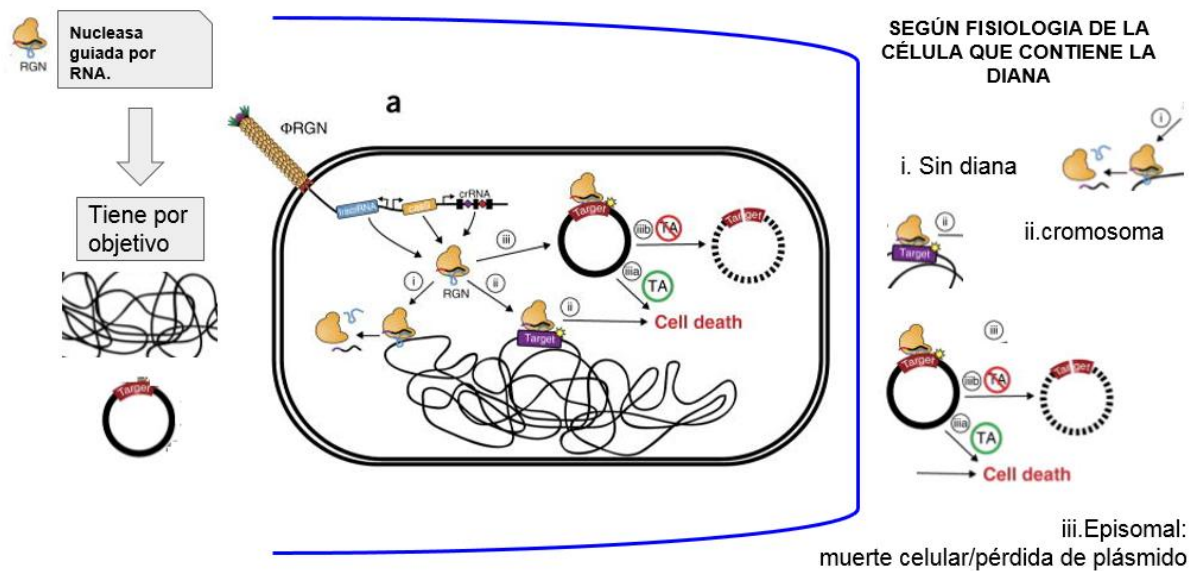


Figura 6. Diferentes secuencias de diseño agregadas a las nucleasas guiadas por ARN (gARN), entregadas por bacteriófagos. Tomada de (44). Se pueden observar los tres caminos que toma el sistema CRISPR/Cas9, dependiendo de la fisiología que tiene la célula. i. Si no tiene la diana indicada el sistema CRISPR/Cas9 no puede actuar; ii. Si está la diana ubicada en el cromosoma, la gARN tiene efecto citotóxico y iii. Dependiendo de si la célula tiene activo el sistema toxina-antitoxina (TA), puede perder el plásmido o presentarse muerte celular. Modificada por Catalina García.

Frente a la ausencia de secuencia objetivo, el gARN no ejerce ningún efecto; Si la secuencia está en el cromosoma bacteriano la actividad del gARN es citotóxica; Si es episomal el gARN conduce a muerte celular o pérdida de plásmido, dependiendo

de la presencia o ausencia de sistemas de toxina-antitoxina (TA), respectivamente (44).

Con el uso de las nucleasas se realizó un ensayo de re-sensibilización a cepas de *E. coli* EMG2, con presencia de plásmido tipo New Delhi (pNDM-1) que puede codificar el gen blaNDM-1; se escogieron otros genes de resistencia para el experimento (Φ AGNndm-1, Φ AGNshv-18, o Φ AGNndm-1 / shv-18) y a cada uno se le agregó su endonucleasa asociada a ARN gARN (44). Se pudo observar la eficiencia de los distintos vectores unidos a gARN y su efecto en el crecimiento bacteriano (Figura 7).

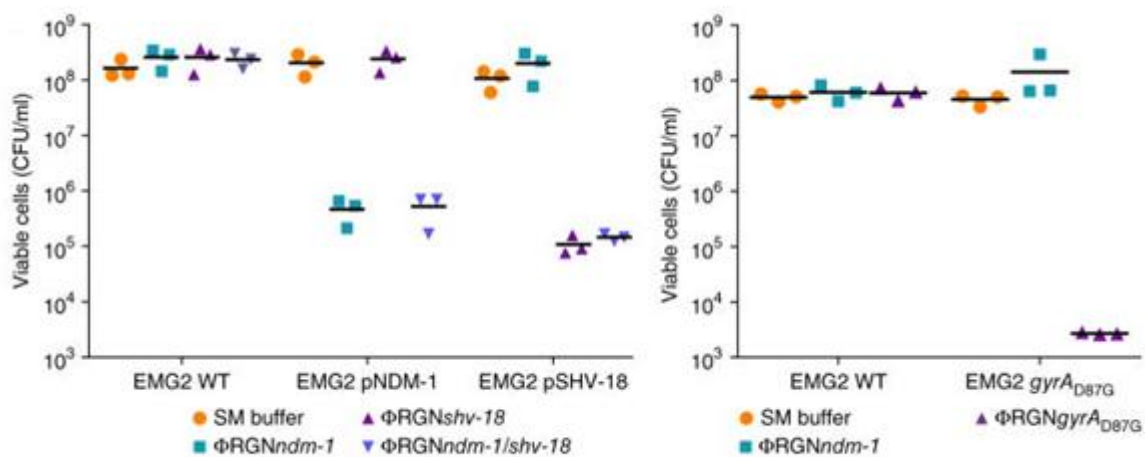


Figura 7. Re-sensibilización de *E. coli* EMG2 con bacteriófagos asociados a gARN. Tomada de (44).

Se demuestra que al acoplar una gARN en partículas bacteriófagos o en su defecto plasmídicas móviles, se pueden implementar diseños letales y de alta especificidad contra la resistencia a antibióticos u otras secuencias de ADN no deseadas, inhibiendo su expresión completamente (Figura 7) (44).

4.2. Re-sensibilización de *E. coli* por edición de genes codificantes para Betalactamasas de amplio espectro BLEES.

En el 2016 Jun- Seob K y colaboradores, basados en evidencia de otros estudios que utilizaban CRISPR/Cas9 como editor para disminuir la resistencia a antibióticos asociada a plásmidos, demostraron que es posible re sensibilizar algunas bacterias Gram negativas, es decir volverlas a su estado inicial de susceptibilidad antibiótica,

al intervenir con esta herramienta las Betalactamasas de espectro extendido (BLESS) que son adquiridas por *E. coli* a través de plásmidos de resistencia (9).

Se utilizó como control la cepa ATCC de *E. coli* K12 BW25113, esta permite el control adecuado de variables en la experimentación y posee una resistencia a antibióticos conocida. La bacteria donante de resistencias fue la *Klebsiella pneumoniae* K01-bac-08-03094, obtenida de un aislamiento clínico en el centro médico Samsung en Corea del Sur y del cual se sabía de su multiresistencia por todas las pruebas microbiológicas que ya le habían reportado en ese hospital. Se evaluaron los antibióticos de Ampicilina, Cloranfenicol, Tetraciclina y Ceftazidime, tanto la resistencia inicial como la sensibilización posterior que fue nuevamente adquirida por *E. coli*, gracias a la edición de sus plásmidos de resistencia por medio de CRISPR/Cas9 (9).

Era importante decidir cuál sería la diana a la cual se dirigía CRISPR y la estructura del plásmido para la edición, para ello, se identificaron y escogieron las secuencias más representativas de Betalactamasas y del gen *bla* que es el codificante principal para betalactamasas. Se tuvieron en cuenta las primeras resistencias que fueron reportadas en los años 1980 (genes TEM-1, TEM2 y SHV-1), y el grupo más reciente de betalactamasas de espectro extendido BLEES, tomando de este último los tipos más representativos (SHV, TEM, CTX-M, OXA, PER) y otras derivadas de estos genes iniciales (9).

Dada la variabilidad de secuencias codificantes para BLEES, se diseñó un plásmido capaz de re-sensibilizar varios de los genes causantes de la multiresistencia en bacterias Gram negativas; es así como parte trascendental de esta lucha contra antibióticos a través de CRISPR/Cas9, se implementó la edición del plásmido RESARF_{bla} (pRESARF_{bla}), cuyo modelo o plantilla fue el plásmido Cas9 (pCAS9) número 42876, utilizando la metodología de clonación del protocolo Bsal (Figura 8).

La 8 muestra el esquema de ReSAFR y el mapa plasmídico de pRESAFRESBL, cuando una célula se transforma con todos los componentes ReSAFR (proteína Cas9, tracrARN, y crARNs para genes BLEES); estos se combinan y escinden el gen BLEES objetivo.

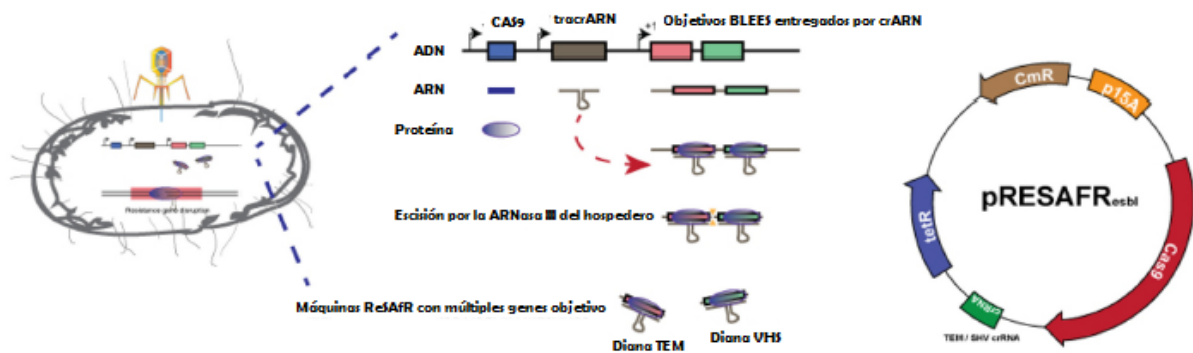


Figura 8. Plásmido de edición principal pRESAResble. Tomada de (9). Modificado por Catalina García.

La re-sensibilización se le realizó a una cepa de *E. coli* que de manera manipulada presentó resistencia a ampicilina y ceftazidime por conjugación con la *Klebsiella pneumoniae* previamente aislada en el hospital. Las *E. coli* conjugadas fueron cultivadas en medio LB y luego en agar MacConkey, solamente aquellas que mostraron resistencia a ampicilina y ceftazidime fueron seleccionadas para el ensayo (Figura 9) (9).

Al emplearse el plásmido diseñado para edición de genes BLEES (pRESAFRESBL) como mensajero de entrega de los componentes ReSAFR, específicos, asociado a la herramienta CRISPR/Cas9, se demuestra que los bacteriófagos se comportan como un sistema óptimo de entrega de aquellos componentes que necesitemos hacerle llegar a una célula (9); en este caso el mensajero es el diseño ReSAFR; en él, los crRNA dirigidos a los genes hallados en plásmidos de tipo TEM y SHV se transcribieron como una secuencia de ARN única y larga, que posteriormente formó el complejo tracrRNA/proteína Cas9 propio de CRISPR/Cas9, logrando que el ARNc fuera cortado espontáneamente por la ARNasa hospedero en cada arreglo CRISPR, donde cada módulo funciona de forma independiente (9).

El ensayo fue capaz de re-sensibilizar por medio de las secuencias de ARNcr, tanto a las BLEES derivadas de TEM, como a las BLEES derivadas de SHV (9).

La evaluación del sistema plasmídico RESARF, se llevó a cabo con dos plásmidos más, el vector pBADCAS9 como control negativo que solo expresaba la proteína Cas9, y el psgARNbla que es el transcriptor por la presencia del ARN señal (Figura 9).

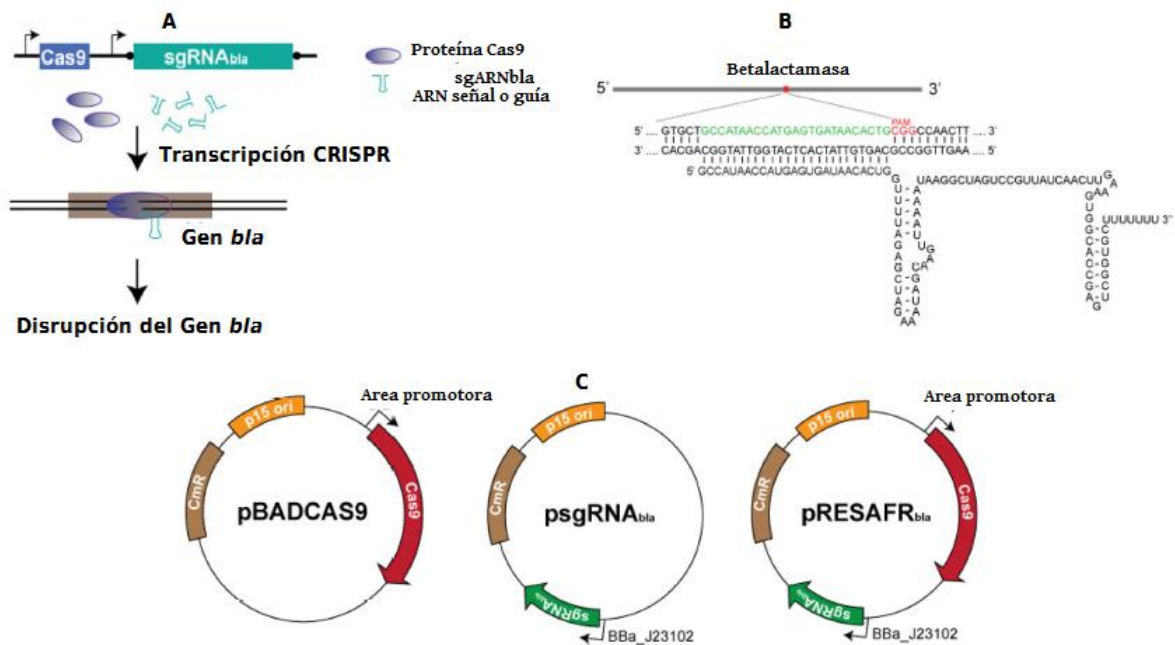


Figura 9. Diseño y construcción de los plásmidos de evaluación, incluyendo al plásmido RESARF_{bla} dirigido al gen *bla*. Tomado de (9). (A, B) El sgRNA es una forma combinada de crRNA y tracrRNA; no hubo región homóloga dentro del genoma de *E. coli*. (C) Plásmidos construidos para la expresión de la proteína Cas9 como control negativo (pBADCAS9), sgRNA o transcriptor para *bla* (psgRNA_{bla}), y ambos o plásmido definitivo (pRESAfr_{bla}). Modificado por Catalina García.

Al tratar de determinar la conducta de CRISPR/Cas9 como re-sensibilizador de bacterias, se utilizaron otros plásmidos como: pUC19, pET21b y pBR322, que sirvieron de vectores para que la cepa *E.coli* ATCC determinada adquiriera del aislamiento del aislamiento clínico de *Klebsiella* la resistencia a antibióticos escogida para la re sensibilización (9).

Gracias a la implementación de la herramienta genética CRISPR/Cas9, se tienen datos relevantes en la lucha contra la resistencia a antibióticos, tales como que además de diseñar el vector correcto, en este caso el plásmido ReSAFR, es de vital importancia que durante la intervención de bacterias multirresistentes con la tecnología CRISPR/Cas9, se haga la orientación correcta del plásmido o vector; es decir, de nada sirve un diseño adecuado, sino se tienen identificadas las secuencias específicas claves que codifican a los genes de resistencia de importancia clínica relacionados con las betalactamasas de amplio espectro (9). Las secuencias importantes para la re sensibilización de la *E. coli* multirresistente se resume a continuación (Tabla 4).

COMPONENTES	SECUENCIA (5' – 3')
BBa_J23102	TTGACAGCTCAGTCCTAGGTAAGTGTGCTAGC
crARN _{TEM}	ATACGGGAGGGCTTACCATCTGG
crARN _{SHV}	GTCTGAGCGCCCGTTCGCAACGG
sgARN _{bla}	GCCATAACCATGAGTGATAAACTGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

Tabla 4. Secuencias de los componentes dirigidos a cada gen de resistencia a antibióticos. Tomada de (9). Modificada por Catalina García.

Entonces tenemos que para que una herramienta de tan alta especificidad, eficiencia y posibilidad de multi-edición genética como CRISPR/Cas9 cumpla su función, se requiere de un excelente diseño vectorial y alta precisión en la determinación de las secuencias objetivo; de tal manera que al implementarse el sistema CRISPR/Cas9 junto con el esquema de ReSAFR y el mapa plasmídico de pRESAFRESBL, las células de *E. coli* se re transforman y re sensibilizan al cumplirse estos dos parámetros. El diseño logrado por estos investigadores logra no solamente limitar sino anular por completo la expresión de los genes BLEES (9).

La tecnología CRISPR/Cas9 con ayuda del plásmido pRESAFRESBL, re-sensibilizo a las *E. coli* que adquirieron plásmidos con genes BLEES (9). En la figura 10-A se aprecia la fracción celular resistente a antibióticos, medida en UFC . También se ve el comportamiento de la fracción celular resistente a antibióticos, la cual se obtuvo comparando las UFC después del tratamiento antibiótico, con respecto a las UFC antes del tratamiento de re-sensibilización.

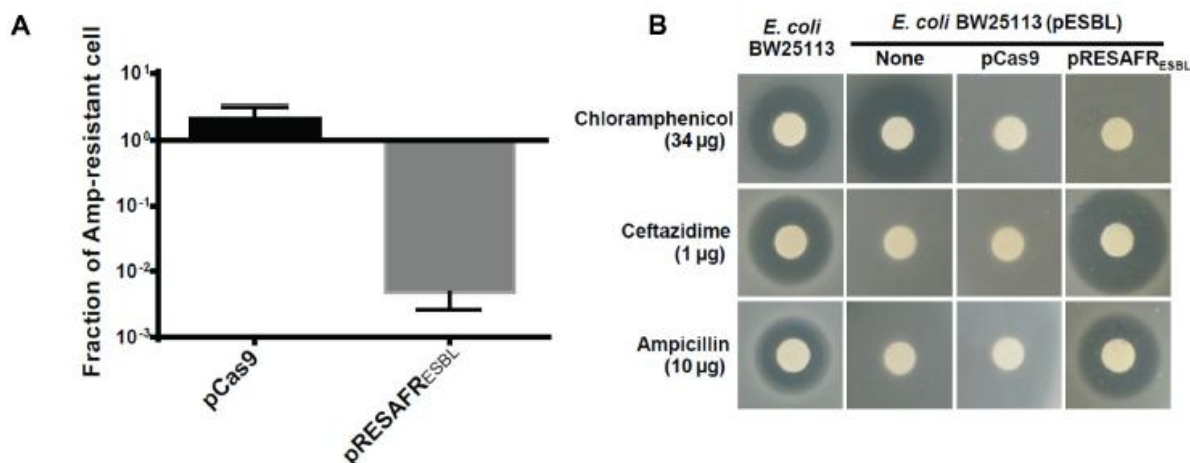


Figura 10A, 10B. Re-sensibilización de *E. coli* que portaba plásmidos para expresión de BLEES. Tomada de (9).

Aquellas células resistentes a los antibióticos mostraron un valor de más de 1, porque crecieron incluso en presencia de antibióticos, las células transformadas con el plásmido pCas9, crecieron en presencia de ampicilina (Amp), mientras que de las células re-sensibilizadas con el plásmido pRESAFRESBL solo sobrevivieron el 0.3% mostrando una tasa de re sensibilización de casi el 100%. Se observa en el ensayo de difusión en disco, como la resistencia a los antibióticos de la cepa ESBL. *E. coli* BW25113 (Figura 10-B), se volvió resistente a Cef y Amp al adquirir el plásmido pESBL de *Klebsiella pneumoniae* por conjugación (9).

Esta cepa de *E. coli* que adquirió resistencia horizontal a antiobióticos tipo BLEES solo pudo hacerse sensible de nuevo a Amp y Cef al ser intervenida con el plásmido pRESAFRESBL, pero no recupero su sensibilidad inicial al ser tratada con el plásmido pCas9 (9).

En cuanto al diámetro de la zona de inhibición (Figura 10-C), tenemos que *E. coli* BW25113 con presencia de BLEES fue resistente a los tres antibióticos evaluados; sin embargo, cuando se le trato con el plásmido pRESAFRESBL, mostro los halos de inhibición o sensibilidad más grandes del ensayo, en otras palabras aumento su susceptibilidad natural a los antibióticos evaluados (9). La actividad del plásmido pESBL, responsable de la presencia de BLEES se eliminó de la célula durante la re-sensibilización con el plásmido pRESAFRESBL (Figura 10D).

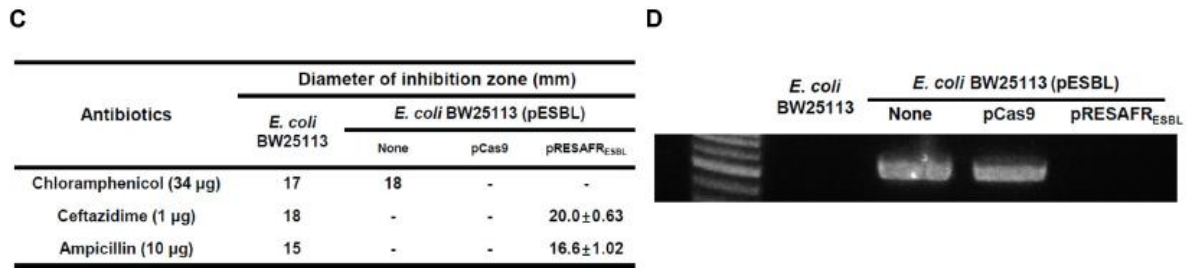


Figura 10C y 10D. Re-sensibilización de *E. coli* que portaba plásmidos para expresión de BLEES (9).

Cabe señalar que otro de los aportes más relevantes en este tipo de hallazgos, es la salvedad que se hizo al afirmar que, si bien CRISPR Cas9 es un método de edición genética, eficiente y de alta precisión, son tantas las mutaciones de resistencia transmitidas horizontalmente, que prácticamente sería inacabable la tarea de tomar una por una para contrarrestar las resistencias bacterianas a antibióticos cuyo origen es debido a THG (9).

Una vez más CRISPR/Cas9 hizo cambios multialélicos que permiten la re-sensibilización de bacterias Gram negativas, para que puedan ser tratadas con los antibióticos que antaño fueron eficaces y que habían perdido su efecto en estos microorganismos (9).

4.3. Re-sensibilización de *E. coli* por edición del Gen de resistencia a colistina *mcr-1* usando el sistema CRISPR/Cas9.

El gen de resistencia a colistina *mcr-1* fue identificado en *E. coli* proveniente de cerdos en China y se le considera uno de los responsables de la aparición de superbacterias Gram negativas, por su alto potencial de multirresistencia a antibióticos (3).

La importancia clínica de *mcr-1* se debe a su alta diseminación por transmisión horizontal de genes THG, pues, aunque en un principio se creía que era un mecanismo de resistencia que solo pasaba entre las poblaciones bacterianas de los animales propios de esta industria agropecuaria, pronto el uso extendido de colistina en los criaderos de cerdos en China dio como resultado que se extendiera este gen y que para sorpresa de muchos se presentara en aislamientos humanos (3).

Este gen se encontró inicialmente en el plásmido pHNSHP45, pero también se le ha identificado en los plásmidos IncX4-, IncI2-, IncHI2-, IncP-, IncFII- y varios plásmidos tipo IncY-(3). Por su fácil diseminación, se han realizado estudios en donde se realiza el bloqueo o apagado del gen *mcr1*.

4.3.1. Bloqueo del Gen *mcr-1* por CRISPR/Cas

Es posible ingeniar un sistema basado en CRISPR/Cas9 en el cual el complejo CRISPR/Cas con el ARN guía corta el ADN y luego una secuencia (PAM) ayuda a inhabilitar el gen *mcr-1* presente en *E. coli* (3). Este tipo de re-sensibilización se puede ejecutar aislando las bacterias resistentes de una muestra clínica.

Un ejemplo de esto es, que al identificar la cepa bacteriana *E. coli* NJ-15-3 molecular y bioquímicamente después de su crecimiento en el medio LB a 37° C, se le realizó el perfil de su fenotipo de resistencia a colistina, el cual se detectó por concentración mínima inhibitoria (CMI), según las recomendaciones del M100-S25 (Documento del Instituto de estándares clínicos de Laboratorio) (3); la resistencia de esta cepa se debía a la presencia del plásmido NJ-15-3, que fue extraído por el método de lisis alcalina, una vez realizado este paso, se detectó por PCR el gen *mcr-1* de resistencia a colistina (3).

Como respuesta, se diseñó un plásmido (pCas::*mcr*) para lograr el apagado del gen *mcr-1*, el cual fue transferido en 10^{10} unidades formadoras de colonia (CFU) que contenían el gen *mcr-1* para evaluar su actividad con ayuda del proceso de electroporación (3).

Se comprobó el apagado exitoso del gen *mcr-1* por medio de la revisión de la supervivencia de las células para la selección del transconjugado; esto puede hacerse en varias condiciones para comprobar y evaluar los ensayos con diferentes antibióticos de interés; por ejemplo en medio LB solo, en medio LB y cloranfenicol (Cm); y en medio LB con colistina (Cl) (3).

Una vez realizada esta selección de bacterias que sobrevivieron a los antibióticos, se cultivaron las células de *E. coli* que contenían el plásmido NJ-15-3 en dos condiciones: 1. *E. coli* NJ-15-3 coincubadas con PBS, pH 7.2 y 2. *E. coli* NJ-15-3

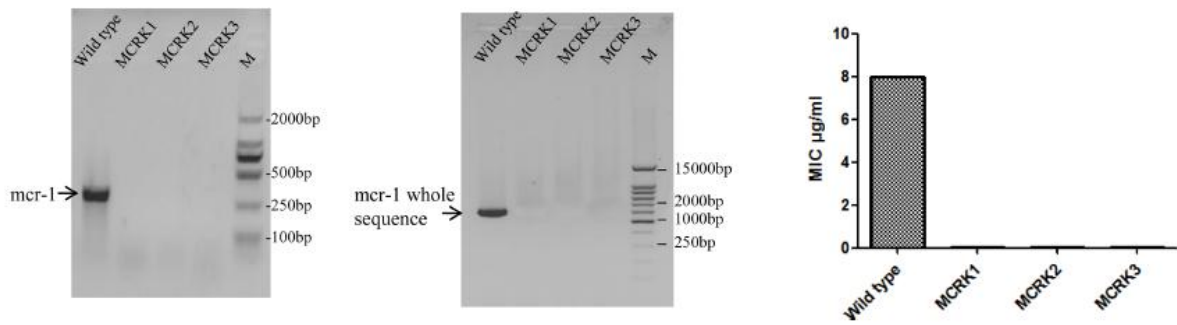


Figura 12. Cas9-sgRNA administrado por el péptido antimicrobiano meloide bovino-27 (BMAP-27) presenta un antimicrobiano eficiente y específico efectos contra cepas que albergan secuencias diana de plásmidos. Tomado de (3).

Se evidencio que el Gen *mcr-1* puede ser bloqueado utilizando el sistema CRISPR/Cas9, que este efecto de bloqueo del gen se vio potenciado por la entrega del plásmido por parte del péptido 27 (BMAP-27) y más relevante aún, que el efecto de apagado del experimento en el gen *mcr-1* de *E. coli* mostró ser efectivo ya que las *E. coli* en las cuales hubo dicho apagado de gen recuperaron su sensibilidad inicial a la colistina (3).

4.3.2 Eliminación del gen de resistencia a colistina *mcr-1* presente en diferentes plásmidos en *E. coli*.

Dentro de los usos de la tecnología de CRISPR / Cas9 también se ha reportado la eliminación un gen de resistencia, para esto se construye un plásmido conjugativo diseñado de manera independiente del hospedero; gracias a la intervención del plásmido creado y utilizando CRISPR / Cas9, se eliminó uno de los plásmidos contenedores del gen *mcr-1* (Figura 13).

Se tomó la cepa *E. coli* MG1655 que es naturalmente sensible a la colistina y se le sometió a un proceso de conjugación con la cepa *E. coli* DH5; es decir que *E. coli* MG1555, actuó como receptor para el diseño y diseminación de los plásmidos de conjugación, en tanto que *E. coli* DH5 tuvo el rol de donador de la resistencia a colistina asociada al gen *mcr-1* a investigar. En este caso los que se usaron fueron el plásmido de conjugación pFSEC-01 y el plásmido pHNSHP45, que fue seleccionado por contener la secuencia del gen *mcr-1*. (Figura 13).

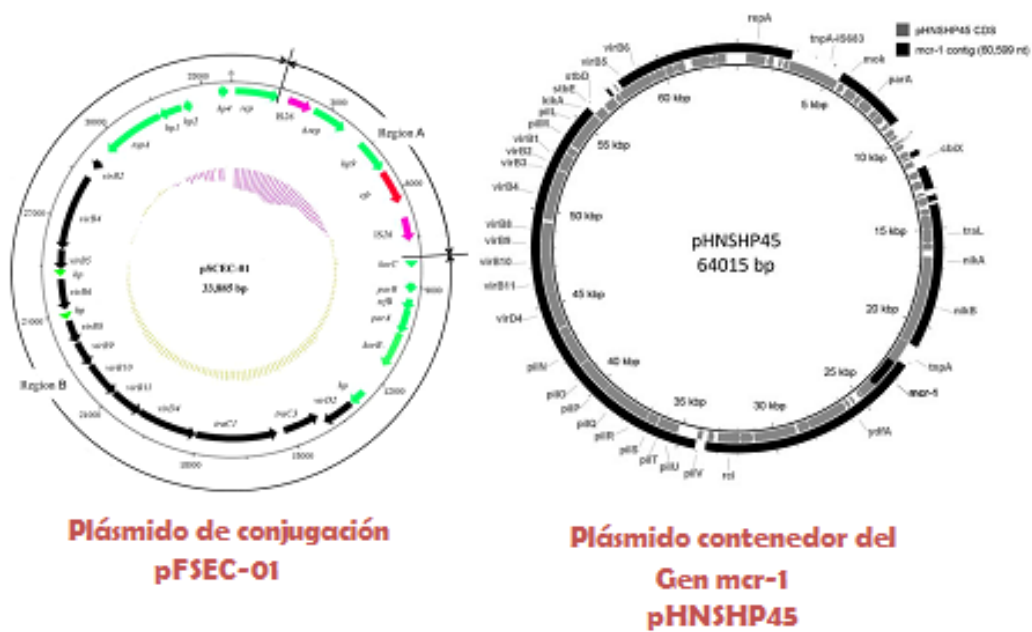


Figura No 13. Plásmido pHNSHP45 portador del gen mcr-1 y el plásmido pFSEC-01 conjugativo.

Las *E. coli* se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 10 g de triptona / L) o en placas de agar LB (LB suplementado con 15 g de agar / L) a 37 ° C; cuando fue necesario, se usaron los antibióticos apropiados a las siguientes concentraciones finales para la selección o mantenimiento de plásmidos: 100 µg / ml de ampicilina, 12.5 µg / ml de cloranfenicol (Cm), 20 µg / ml de florfenicol o 4 µg / ml de colistina B (44).

Una vez seleccionados los plásmidos, para evaluar la efectividad de la herramienta CRISPR/Cas9 en la re-sensibilización de *E. coli*, se requirió crear el vector pCas9sgRNA- gfp (Figura 14).

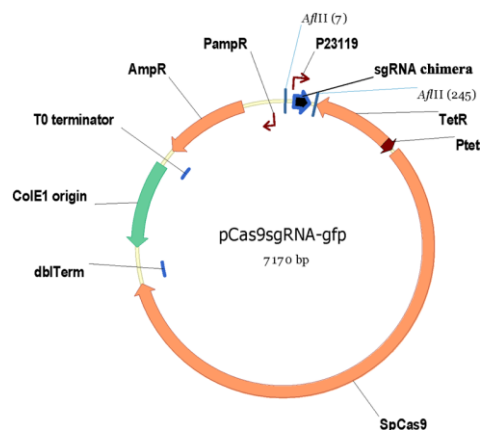


Figura No 14. vector pCas9sgRNA- gfp.

Por medio de esta edición por conjugación de plásmidos, se deduce que la destrucción de un gen objetivo, se logra cuando la proteína Cas9 forma el complejo con los sgARNs; pues es en este punto del proceso, que se une el complejo a la región de codificación específica del gen *gfp* y la Cas9 o endonucleasa destruye el gen diana (Figura 15).

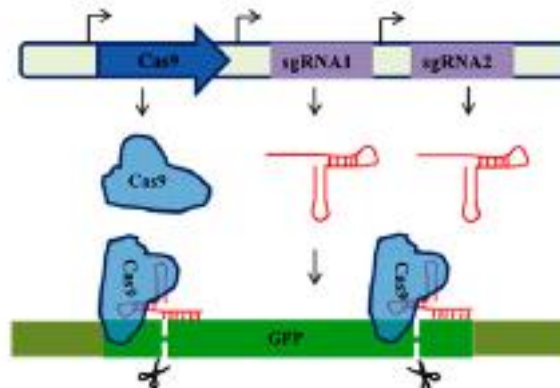


Figura 15. Destrucción de genes mediada por CRISPR / Cas9. Tomado de (46)

Para construir el plásmido conjugativo pMob-Cas9, la secuencia entre dos regiones IS26 del plásmido pFSEC-01 se sustituyó con el casete codificador CRISPR / Cas9 por recombinación mediada en dos pasos. Primero, se construyó un casete de ADN de donante lineal, que transporta la parte aguas arriba de la secuencia objetivo, el casete de expresión Cas9, el casete sgRNA, el casete de resistencia a ampicilina (*bla*) y la parte aguas abajo de la secuencia objetivo. El vector resultante se denominó pKD46lacZCm. pFSEC-01 se transformó en *E. coli* Células DH5 α que albergan pKD46lacZCm.

En la Figura 16 se muestra un mapa del plásmido resultante, pMob-Cas9 .B. pMob-ctrl, que no tiene el casete sgRNA, se construyó de la misma manera que pMob-Cas9 y se usó como un plásmido de control.

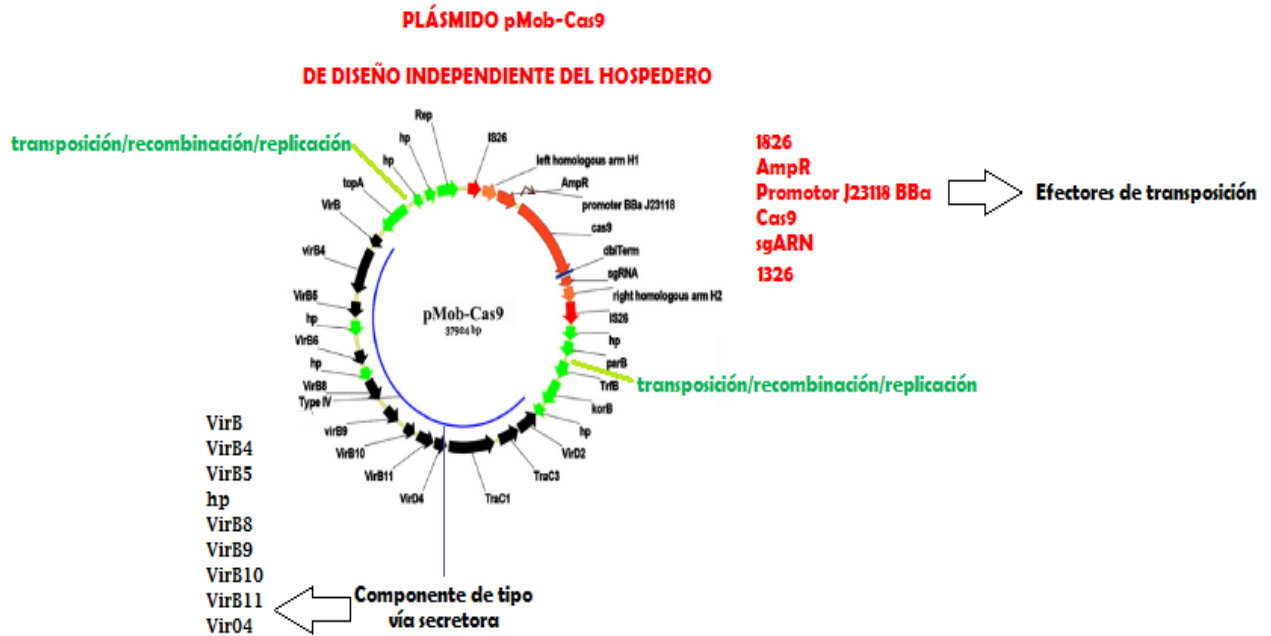


Figura No. 16. Mapa del plásmido resultante, pMob-Cas9B. Tomado de (44). Modificado por Catalina García

Como control se realizó la intervención con el plásmido conjugativo resultante pMob-Cas9, en las cepas de *E. coli* que tenían la resistencia pGFPmut2 (gen reportero de proteína, representado en verde fluorescente), con el sistema pCas9, y otra intervención para editar con el sistema conjugativo pCas9sgARN-gfp (44).

“Se observó el crecimiento de estas las condiciones evaluadas por microscopía de fluorescencia, evidenciándose como las cepas de E. coli editadas con el control pCas9, siguieron siendo resistentes con una población sobreviviente por encima de 10^5 , mientras que las cepas en las que se implementó el conjugativo pCas9sgARN-gfp, redujeron significativamente su población a un poco más de 10^2 ” (44). Los resultados demuestran que se lograron re-sensibilizar las bacterias editadas por el método de plásmidos conjugativos ejecutados con CRISPR/Cas9 (Figura 17).

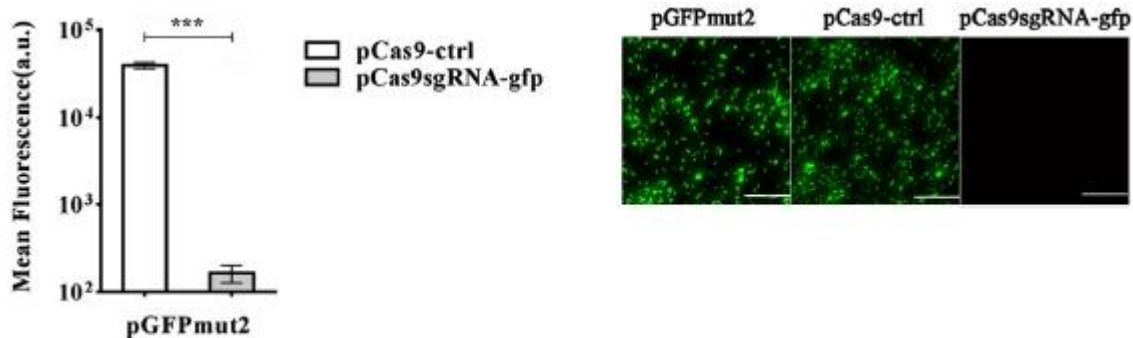


Figura 17. Crecimiento de las células intervenidas con plásmidos. Tomado de (44).

La re-sensibilización se verificó con PCR, lo cual confirmó la eliminación del plásmido GFP que contenía al gen *mcr-1* (46). (Figura 18).



Figura 18. Eliminación del plásmido GFP que contenía al gen de resistencia a colistina *mcr-1*. Tomado de (46).

Se concluye que la efectividad de la re-sensibilización en *E. coli* por implementación de CRISPR/Cas9, mejora al incluir en la ejecución un plásmido conjugativo, ya que este tipo de edición en THG, no solo puede usarse como una nueva herramienta para eliminar los plásmidos de resistencia y sensibilizar a las bacterias receptoras a los antibióticos, sino que también puede hacer que la célula receptora adquiera inmunidad contra un gen de resistencia; pues las cepas editadas se volvieron inmunes a la adquisición del gen *mcr-1* (44). Esta estrategia proporciona un método pertinente para contrarrestar la propagación cada vez más grave de resistencia a colistina *mcr-1* entre los patógenos bacterianos (44). Sin embargo es importante tener en cuenta que el sistema de ingeniería CRISPR / Cas en las células limita la conjugación y la transformación al atacar el ADN (44).

4.4. La edición de *E. coli* resistente a quinolonas implementando CRISPR / Cas9, confirma la relación causa-efecto entre la mutación (*gyr*) y la resistencia a este antibiótico, al re-sensibilizar las cepas que habían adquirido dicho mecanismo.

Debido al uso extendido de antibióticos de amplio espectro como las quinolonas, la resistencia bacteriana en Gram negativos va en aumento, los estudios realizados al respecto de estas mutaciones y reportados por varios autores, se han limitado a señalar la relación entre las mutaciones *gyrA* y la resistencia bacteriana a las quinolonas sin describir ni menos detallar la funcionalidad de dicha interacción; por ello se empleó CRISPR / Cas9 para investigar el papel causal de la mutación *gyrA* en la resistencia a las quinolonas (10).

En 818 aislamientos de *E. coli* almacenados en el Laboratorio de Microbiología del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Yangzhou, y que provenían de pulmón e hígado de pollo (n=644); pulmón, bazo e hígado de cerdo (n=113) y leche de vaca (n=61), recolectados entre los años 2004 a 2012 en la provincia de Jiangsu (10), se determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cada muestra de *E. coli* mediante un panel contra quinolonas, usando el método de difusión de disco en agar según la norma CLSI 2015 (45), siendo *E. coli* ATCC 25922 la cepa seleccionada para recibir la mutación, por su susceptibilidad a las quinolonas(10).

Se empleó el kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) para extracción ultra pura del ADN correspondiente al gen *gyrA* contenido en las muestras de *E. coli* por PCR en tiempo real(10). Se indujo la mutación en el nucleótido 248 C por T y del nucleótido 259 G por T, editando así el gen *gyrA* de *E. coli* por medio de CRISP/Cas9, para esto se usaron los plásmidos (pCas9, pCRISPR y pKD46), todos facilitados por el profesor Yangzhou de la Universidad de China, y se utilizaron los ARN señal sgARN1 y sgARN2 (Tablas 5 y 6), cuyo diseño está disponible en www.crispr.mit.edu.co (46).

Tabla 5. ARN señal. Tomado de (10). Modificado por Catalina García.

sgARN	Secuencia (5'-3')	Función
F1	CATAAACCGCCGATCACCA	Inducir la mutación del nucleótido 259, y la mutación en los nucleótidos 248 y 259 de <i>gyrA</i> en <i>E. coli</i> ATCC 25922
sgARN2		Induce mutación en el nucleótido 248 de <i>gyrA</i> en <i>E. coli</i> ATCC 25922.
R1	TGGTGACTCGGCGGTTTATG CCATCCCATGGTGACTCGG	
F2	CCGAGTCACCATGGGGATGG	
R2		

Tabla 6. Donante de ADN para la mutación del gen sintetizado por GenScript en Nanjing, China. Tomado de (10). Modificado por Catalina García

DONANTE DE ADN	SECUENCIA 5'-3'	LONGITUD	FUNCIÓN
HA248	AATCGGTAAATACCATCCCATGGTGAC TTGGCGGTTTATGACATCGTCCGTATGG	59 pb	Mutación en el nucleótido 248
	ACCATCCCATGGTGACTCGGCGGTTTA TTACACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCA		Mutación en el nucleótido 259
HA259	GACGTAATCGGTAAATACCATCCCATGG TGACTTGGCGGTTATAACACGATCGTCCG TATGGCGCATTCTCGCT	59 pb	Mutación dual en nucleótido 248 y 259
HA248&259		80 pb	

Antes de establecer la edición, se analizaron 818 aislados clínicos de *E. coli* para detectar mutaciones de *gyrA* y su resistencia a las quinolonas (10). En general, el 77.1% de los aislamientos de *E. coli* (631/818) fueron resistentes al ácido nalidíxico, mayor que la ciprofloxacina (51.1%) y la enrofloxacina 49.8% (407/818). Este valor con coeficiente ($p < 10^{-4}$). La consecuente edición del gen *gyrA* fue verificada por secuenciación y análisis de curvas de fusión (10).

Posteriormente el sistema CRISPR / Cas9 se utilizó para generar mutaciones *gyrA* en *E. coli* ATCC 25922 susceptible a quinolona y una cepa de *E. coli* clínica resistente a quinolona, re-sensibilizando las mutaciones inducidas inicialmente en la cepa ATCC por la vía homóloga (10).

“En la figura 19 se muestra la nucleasa Cas9 (verde), la secuencia diana de ADN genómico (negro), esta es editada por un ARN guía (ARNg) que consiste en una secuencia de guía de 20 nt (azul) y un andamiaje (rojo). Cas9 media una ruptura de ADN de doble cadena (DSB) alrededor de 3 pb aguas arriba del PAM (cajas rojas). La ruptura es reparada por un pequeño donante de oligonucleótidos de ADN monocatenario (ADNss) con brazos de homología y una región de recombinación. Esto indujo una mutación de nucleótidos en la posición *gyrA* 248 de C a T (rojo y negrita) en *E. coli* ATCC25922” (10).

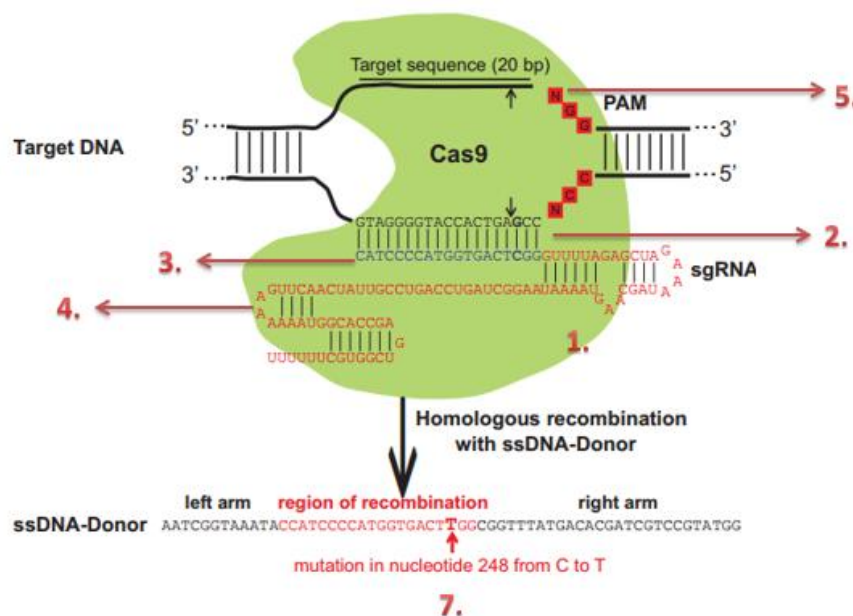


Figura 19. CRISPR / Cas9 induce mutación en el nucleótido 248 de *E. coli* ATCC25922. Tomado de (10) 1.Cas9 (nucleasa); 2. ADN genómico; 3. Secuencia de guía sgARN; 4. Andamio sgARN; 5. Ruptura de ADN de doble cadena (DSB); 6. Donante de oligonucleótidos de ADN monocatenario (ADNss); 7. Mutación en la posición *gyrA* 248 de Citosina (C) a Timina (T) (14). Modificado por Catalina García.

En el tipo silvestre de *E. coli*, los aminoácidos 83 y 87 son Ser (serina) y Asp (ácido aspártico), respectivamente, las mutaciones resultado del gen *gyrA* a modo de cambios en aminoácidos (en letra roja). El panel A indica los porcentajes de aislados de *E. coli* en este estudio sin o con cambios en los aminoácidos. En la gráfica de la

derecha se demuestra la resistencia a la ciprofloxacina, enrofloxacina y ácido nalidíxico asociados con cambios en el aminoácido (Figura 20).

Las mutaciones *gyrA* se identificaron en las posiciones de nucleótidos 248, 255, 259, 260, 261, 273 y 300, y las mutaciones en las posiciones 248 y 259 que dieron como resultado cambios de aminoácidos en las posiciones 83 y 87 se asociaron con la resistencia a la quinolona (10).

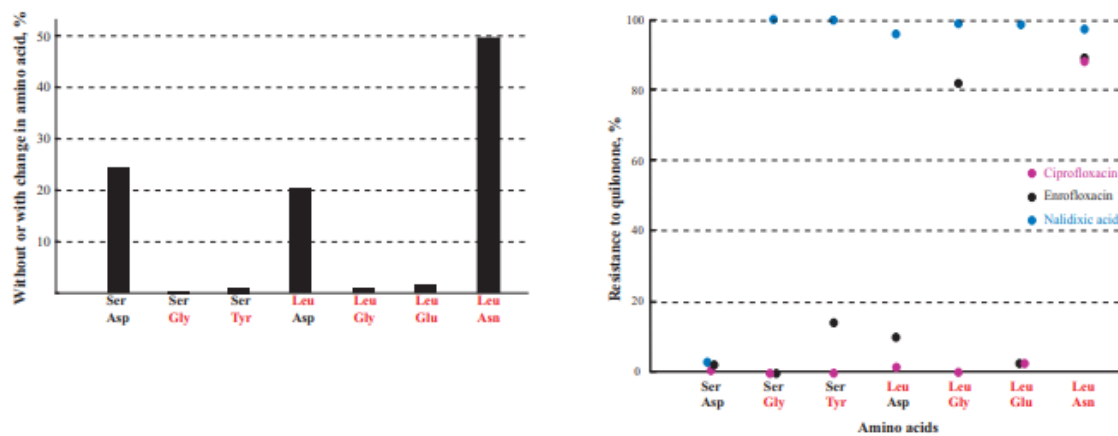


Figura 20. Cambios en los aminoácidos por la mutación *gyrA* están asociados con resistencia a quinolonas. Tomado de (10).

Se concluyó que los aminoácidos de doble sitio aumentan la resistencia a las quinolonas. Las mutaciones de *gyrA* que causan cambios en los aminoácidos 83 y 87 revirtieron las características de resistencia a quinolonas en ATCC y cepas clínicas, verificando el papel causal de la mutación *gyrA* en la resistencia a quinolonas de *E. coli*, re-sensibilizando las cepas que habían adquirido resistencia a quinolonas (10).

4.5. La edición previamente empleada en distintas especies de *Pseudomonas* puede replicarse para re- sensibilizar a *P. Aeruginosa* por medio de la edición de CRISPR/Cas9.

El género *Pseudomonas* es un grupo amplio de bacilos Gram negativos que tiene muchas especies importantes, pero, la especie protagonista en la clínica cotidiana es *Pseudomonas aeruginosa* con carbapenemasas, que está incluida dentro de los microorganismos clasificados por la OMS como especie de prioridad crítica o grado 1 debido a su resistencia expandida (XDR) (15).

Si se empieza a estandarizar como estrategia de contingencia a resistencia a antibióticos la re-sensibilización de bacterias por medio de CRISPR/Cas9, los microorganismos que provocan estas problemáticas deberían ser los primeros en ser intervenidos para su restablecimiento de susceptibilidad a antibióticos.

CRISPR/Cas9 permite desarrollar métodos de manipulación genética eficiente y de alta precisión en bacilos Gram negativos que no fermentan la lactosa y que tienen también una importancia clínica significativa por su grado de resistencia como en el caso de la *Pseudomonas* con resistencia por THG (11).

La viabilidad de editar otros bacilos resistentes a antibióticos por THG diferentes a *E. coli* y de trascendencia clínica como *Pseudomonas* para su re-sensibilización, puede darse empleando alguna metodología asociada a el sistema CRISPR /Cas9 para la edición del genoma en estas bacterias (11).

Una vez conocida la edición genómica que se venía realizando en distintas especies de *Pseudomonas* para fines industriales, y notar en esas investigaciones la especificidad, eficiencia y versatilidad de CRISPR/Cas9 para reescribir los genomas bacterianos de este género tan grande, se quisieron replicar estos hallazgos diseñando una metodología que permitiera hacer una conversión altamente eficiente de intercambio de bases nitrogenadas $C \rightarrow T$ (o $G \rightarrow A$) en especies de *Pseudomonas spp.*, para minimizar posibles errores de efecto borrón en el momento en que una bacteria como de *P. aeruginosa* se dispusiera a reparar el corte hecho por Cas9 durante la edición genética (11).

Es decir que el objetivo de la intervención en el genoma de una bacteria puede ser no solo re-sensibilizarla, sino también estudiar como la bacteria rehabilita las secuencias intervenidas dejando el mínimo rastro (11). Se construyó el sistema plasmídico pCasPAGm, basados en el sistema CRISPR/Cas9; el sistema plasmídico contenía entre sus elementos a la proteína Cas9 (spCas9) de *Streptococcus pyogenes* y los fragmentos de expresión de sgARN necesarios para la intervención (11).

Además se utilizaron los fagos λ -Red y RecET para hacer un paso de recombinación de fagos, los cuales se eligieron por su alta capacidad de recombinación homóloga y porque previamente se les ha implementado solos o a la

par con CRISPR en la manipulación genética de varios organismos introduciendo, a este diseño se le conoce como sistema de recombinación λ -Red en el organismo (11).

Bla representa el marcador de resistencia a carbenicilina en *E. Coli* y *P. aeruginosa*; mSF, significa el origen amplio de rango del hospedero; ColE1, una replicación original de los sitios Bsal de *E. coli*; y sacB, simboliza el marcador contador seleccionable para reparación del plásmido después de la edición.

Para la re-sensibilización se hizo un mapa que permitiera direccionar el plásmido de diseño a ejecutar con CRISPR/Cas9 (11) (Figuras 21 A,B,C).

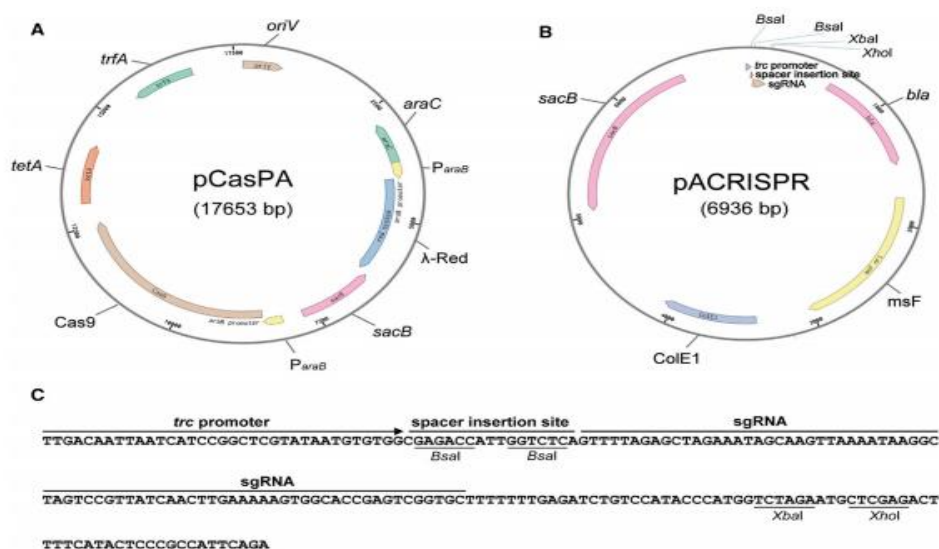


Figura 21. Mapa del plásmido pCasA; mapa del plásmido pACRISPR y secuencia de sitios de clonación del plásmido pACRISPR. Tomado de (11). (Figura 21 A,B,C).

Se observó que el sistema CRISPR / Cas9 genera una ruptura de doble cadena en el ADN del genoma objetivo. Las proteínas de recombinación λ -Red (Exo, Gam y Bet) expresadas por el plásmido pCasPA mediaron la reparación de rotura del ADN bicatenario por la vía molecular de recombinación homóloga, dando como resultado un genoma con modificaciones precisas, hechas a medida, los sitios rojos representan la actividad de escisión de la proteína Cas9 (Figura 22).

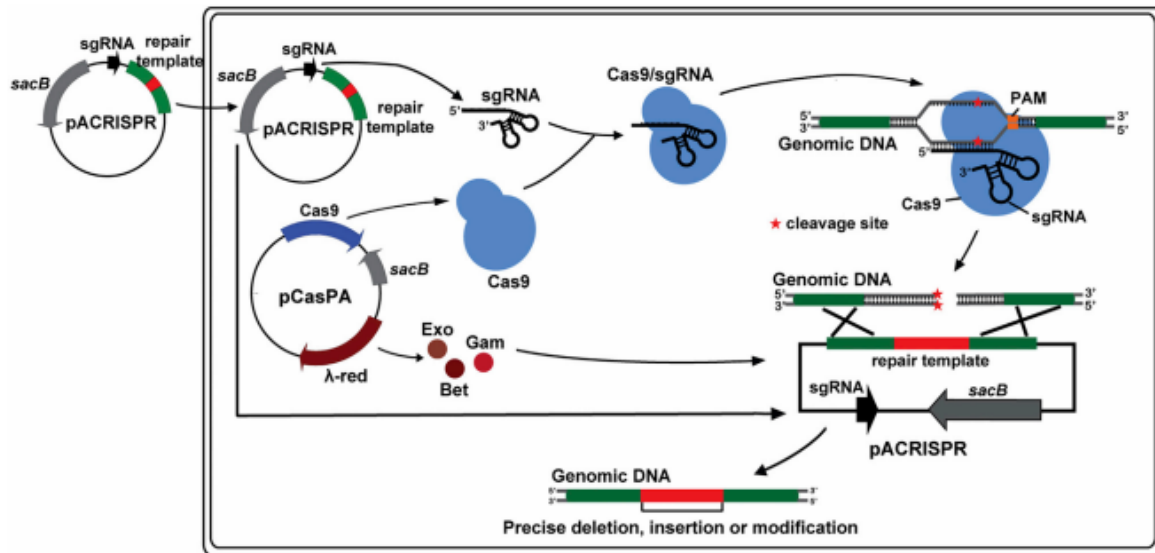


Figura 22. Esquema de la edición de *P. Aeruginosa* mediada por el sistema pCasPA/pACRISPR. Tomado de (11).

El diseño actual de editores de bases nitrogenadas, da un paso más en la intervención de genomas procariontas, los editores iniciales al estar basados en el hallazgo de CRISPR como respuesta inmune adaptativa bacteriana, se componían de una proteína Cas9 defectuosa (Cas9D10A o Cas9D10AH840A) y una deaminasa fusionada con la proteína Cas9; guiada por el complejo Cas9 / sgRNA, la deaminasa se dirige a cualquier locus genómico para realizar la edición de bases en el ADN monocatenario (ssDNA) generado tras la unión de Cas9 / sgRNA, es decir no hay la precisión necesaria y esto puede causar incertidumbre de los resultados colaterales a la intervención genética (11).

En contraste con un editor de bases nitrogenadas y al catalizar la conversión de los codones CAA, CAG, CGA o TGG a TAA, TAG o TGA, este permite inactivar al gen diana generando un codón de parada prematuro (11).

La edición de varias especies del género *Pseudomonas* nos muestra no solo la versatilidad y amplitud de efecto de la re sensibilización con la tecnología CRISPR/Cas9, sino que modificar ciertos elementos o añadirle algunos como el sistema pCasPA-BEC (este plásmido, la citidina desaminasa (APOBEC1 de rata) se fusionó al extremo N de la nucleasa Cas9 (SpCas9D10A) a través de un conector XTEN (Komor et al., 2016)) en este caso, se permitió la conversión de C / T de manera altamente eficiente en una variedad de especies de *Pseudomonas*, siendo

más precisa la edición sin dejar huella relevante que pudiera dañar la funcionalidad del genoma intervenido (11).

CRISPR/Cas9 fue eficiente en varias ediciones de *Pseudomonas*; “*Pseudomonas putida* KT2440 tipo *cadR* Q92 (A) y tipo *ompR* Q129 (B) se mutaron con éxito para hacer parado de codones con eficiencias de 13/14 y 12/12, respectivamente. *Pseudomonas fluorescens* cambio *GcM5-1A* por Q374 (C) y *aspC* Q164, de tal forma que la mutación permitió detener los codones con eficiencias de 13/13 y 11/13, respectivamente. *Pseudomonas syringae* mutó *DC3000 gacA* Q113 (E) y *hrpL* Q29 (F) para detener los codones con eficiencias de 11/12 y 11/12, respectivamente” (11).

A continuación, se muestran otras intervenciones de especies diferentes del género *Pseudomonas* spp. que fueron referentes de la edición de *Pseudomonas aeruginosa* al hacerse también con el plásmido pnCasPA-BEC y el sistema de pares de bases nitrogenadas; se incluyen especies como *P. putida*, *P. fluorescens*, y *P. syringae*. Como observación general se tiene que las especies mutaron con éxito, lo que demuestra la gran capacidad del sistema pnCasPA-BEC unido a la herramienta CRISPR/Cas9 para la edición de bases en una variedad de especies de *Pseudomonas*. (Figura 23).

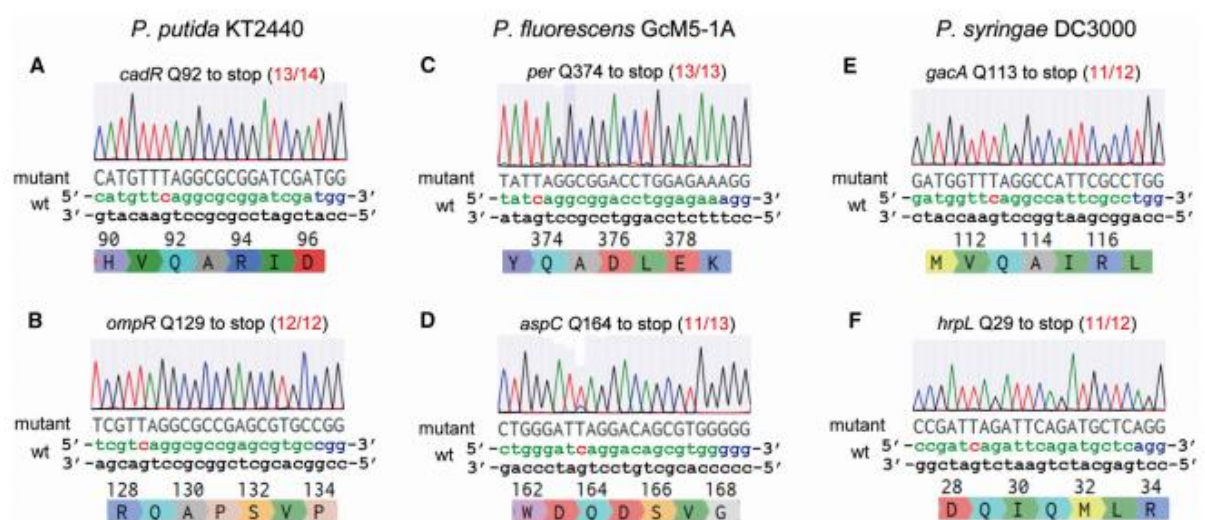


Figura 23. El sistema de alta eficiencia pnCasPA-BEC habilitó la conversión de C - T en varias especies de *Pseudomonas*. Tomado de (11).

Es necesario enfatizar en que al hacer cambios en la metodología de aplicación de CRISPR/Cas9, se mejora tanto la precisión, que es posible fabricar experimentalmente un mutante de delección limpia en *P. Aeruginosa*, gracias a dos pasos básicos; pues *“inicialmente se reemplazó un gen diana por un marcador antibiótico mediante recombinación homóloga y en segundo lugar, se eliminó el marcador con la recombinasa FLP, pero se incluyó el complejo citidina deaminasa para no dejar lo que ellos denominaron una secuencia de cicatriz que si se observó en los estudios de edición de Pseudomonas spp. que se habían hecho antes”* (11).

Es factible diseñar modelos de intervención CRISPR/Cas9 que permitan ediciones cuyo objetivo sea intercambiar las bases nitrogenadas, para el estudio citado citosina por timina C/T o guanina por adenina G/A, cuando se consideren altamente eficientes al menos en la edición genómica de un género o especie determinado ya que estos cambios de bases nitrogenadas pueden reflejar alguna mutación relacionada con resistencia a antibióticos en especies como *P. aeruginosa* (11).

5. DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos es una problemática de salud pública que no conoce de fronteras u otro tipo de restricciones. Una de las facetas más complejas de este flagelo, es la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos por medio de plásmidos; la cual está siendo más frecuente a nivel global debido principalmente a la presión selectiva por exposición a múltiples fármacos; pues la THG es responsable en gran parte del desarrollo de patógenos resistentes a los antibióticos y causa serios problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas (47).

“Es ampliamente aceptado en la comunidad científica que la aparición de plásmidos de resistencia que se transmiten rápidamente sin importar la especie bacteriana, es el mecanismo más común de transmisión genética horizontal (TGH) tanto en ambientes naturales como al interior del tracto gastrointestinal” (47). Al ser estos genes un factor crítico en la diseminación de la resistencia a los antibióticos en los patógenos bacterianos, los investigadores le están apuntando a explotar la edición genética para controlar su aparición, expresión y transmisión (48).

CRISPR/Cas9 ha demostrado ser la herramienta más eficiente, precisa e idónea para dicho fin y, gracias a su versatilidad, es fácilmente adaptable a diseños puntuales según los objetivos de edición, ya que CRISPR/Cas9 permite que se le ensamblen otros elementos para mejorar su rendimiento de re sensibilización (48); bien sea adaptando plásmidos conjugativos para eliminar los plásmidos de resistencia a los medicamentos en las bacterias, péptidos antimicrobianos, endonucleasas guiadas por ARN gARN entre otros, o intervenir células eucariotas (3, 9, 10, 11, 12, 20, 23).

Solo por dar un ejemplo, se demostró que implementando un sistema de dos plásmidos (pCasPA / pACRISPR), para edición genética en *E. coli* y otras bacterias (Jiang et al., 2013 , Jiang et al., 2015), “el plásmido pCasPA fue capaz de expresar la nucleasa Cas9 y las proteínas del sistema λ -Rojo, Exo, Gam y Bet” (11). Tanto de la nucleasa Cas9 como del sistema λ -Rojo fue dirigida por el promotor inducible L-arabinosa ParaB; además en este sistema bi plasmídico, se empleó un marcador

seleccionable (*sacB*) que era letal en presencia de sacarosa, el cual funciono como reparador del plásmido después de la edición (11). En consecuencia CRISPR/Cas9 puede ser adaptada con otros elementos propios de la biología molecular para mejorar sus intervenciones en los genomas procariontas.

CRISPR/Cas9 nos está dando la posibilidad de ganar el juego de la resistencia bacteriana al implementar la re sensibilización con plásmidos de edición similares a los que las bacterias adquieren haciéndose resistentes, ha sido tal su efectividad que al hacer experimentación para re sensibilizar bacterias Gram negativas, el resultado ha sido la inmunización; se vacunaron las cepas contra los plásmidos de resistencia no solamente re-sensibilizándolas, sino logrando que no adquieran ciertos genes de resistencia a antibióticos (3, 10, 11, 12).

CRISPR/Cas9 demuestra ser una herramienta clave en el control de la aparición y diseminación de genes de resistencia; por ejemplo se evidencio como se puede apagar e incluso inmunizar a *E. coli* frente a un gen de resistencia tan reciente y fácilmente diseminable como lo es el gen *mcr-1* de resistencia a la colistina, que al estar almacenado en varios plásmidos hallados en todo el planeta y aislado de muestras animales y humanas, representa una amenaza considerable para el tratamiento de infecciones clínicas (3).

El *mcr-1* apareció en el 2016 en China y ese mismo año ya se tenía conocimiento en el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) de la presencia de este gen en el país; que fue encontrado en las bacterias *S. Typhimurium* y *E. coli*, recuperadas de cuatro aislamientos humanos, que venían de Bogotá, Antioquia, Boyacá y Santander (38). Nótese la capacidad que tiene un gen de resistencia para diseminarse a gran velocidad por extensiones geográficas, gracias a la eficiencia de los plásmidos portadores-transmisores y dado el movimiento geográfico de personas por los distintos continentes y el intercambio de productos y materias primas en el mercado global.

“El INS por medio de su grupo de microbiología realiza desde 1997 la prueba de idoneidad en microbiología clínica, que es un programa de evaluación de calidad de la identificación de resistencia a antibióticos en los distintos laboratorios del país” (49). Por su parte grupos de investigación de entidades públicas y privadas, hacen

un papel de difusión del conocimiento en función de dar a conocer diversos temas de infectología incluyendo las resistencias bacterianas, por ejemplo la Asociación Colombiana de Infectología ACIN a través de sus conferencias y video conferencias realiza extensión a estudiantes de carreras de la salud y profesionales en estas ciencias (25).

Gracias a este tipo de consensos académicos, los profesionales del país llevan nuevos conocimientos y herramientas para identificar el problema y contrarrestarlo en el laboratorio clínico.

Si bien es importante que haya detección y programas de seguimiento de resistencias emergentes, ya que la pertinencia de este tipo de protocolos permite hacer una aproximación integral a la vigilancia epidemiológica en salud pública frente al control de infecciones intrahospitalarias (25), son medidas insuficientes para enfrentar la rápida aparición de bacterias que no son susceptibles a ningún tratamiento.

Es interesante plantear al menos en teoría que se puede investigar cómo desarrollar algún tipo de programa de vacunación con la tecnología CRISPR/Cas9, que pueda emplearse cada vez que se descubra una resistencia a antibióticos por THG, re-sensibilizando las cepas problema aisladas y desapareciendo una nueva resistencia en cuanto es detectada gracias a los programas de prevención de los distintos países.

La prevención de la distribución de mcr-1 y la restauración de la sensibilidad bacteriana a las polimixinas y re-sensibilización a otros antibióticos por medio de métodos de edición genética incluyendo CRISPR/Cas9 tiene un potencial en salud pública altamente importante (3, 10, 44).

Evidentemente antes de llegar a ejecutar esta tecnología CRISPR/Cas9 a tal magnitud se tienen que resolver los inconvenientes que limitan la técnica a ensayos exitosos aislados que se han venido ejecutando hasta ahora en investigación. En la literatura científica se señala que el dilema con la aplicación de CRISPR/Cas9 para fines de re-sensibilización, radica en que los genes de resistencia pueden

encontrarse en varios plásmidos diferentes, además en que los genes de resistencia asociados a BLEE, *mcr-1*, *gyr* entre otros, se presentan en un gran espectro genómico; el reto está en que teóricamente habría que diseñar un sistema re-sensibilizador por cada resistencia transmitida horizontalmente que va apareciendo para solucionar el problema, lo cual haría la tarea no solo tediosa sino humanamente imposible (9).

En algunas investigaciones se tiene como hipótesis que se pueden buscar secuencias diana tipo factor común para editar varios de los genes de resistencia a antibióticos al mismo tiempo, es el caso de la re-sensibilización que se hizo en *E. coli* para que no expresara BLEES (9).

La re-sensibilización de *E. coli* con presencia de BLEES, demuestra que CRISPR/Cas9 puede ser un método valioso en la lucha contra las bacterias multirresistentes, cuya aparición es debida a plásmidos de transmisión horizontal, ya que pese a existir aproximadamente 200 versiones genómicas para genes de expresión de betalactamasas y cerca de 1000 versiones genómicas para genes de expresión de betalactamasas de espectro extendido, el ejercicio de edición no fue solamente efectivo, sino de alta precisión y devolvió a *E. coli* multirresistente la sensibilidad a todos los antibióticos evaluados (9).

En este estudio es altamente representativo también el hecho que a pesar de la diversidad de genes de resistencia, es posible diseñar un plásmido a la medida que ataca exitosamente muchos de los sitios claves de este amplio espectro de resistencia en una sola edición (19).

Lo anterior es revelador, ya que las bacterias que producen BLEE son resistentes a muchos antibióticos derivados de las familias de la penicilina y cefalosporina, y a menudo a otros tipos de antibióticos, *E. coli* junto con *Klebsiella spp.* son dos géneros principales de bacterias productoras y transmisoras de BLEE y esta información es pertinente si tenemos en cuenta que al rededor del 57% de los pacientes que se infectaron vía torrente sanguíneo con enterobacterias productoras de BLEE son más propensos a morir que aquellos con torrente sanguíneo infecciones causadas por una cepa no productora de BLEE (26,36).

Si se lograra mitigar la expresión de BLEE mejoraría la calidad del tratamiento de pacientes a nivel intrahospitalario.

La OMS recoge información sobre los perfiles de resistencia bacteriana a antibióticos, y emite comunicados que alertan y clasifican a los microorganismos según la amplitud de su resistencia, así tenemos términos como “*multirresistencia (MDR) multidrug resistance en inglés, resistencia extendida (XDR) del inglés extensively drug resistance y panresistencia (PRD) o pandrug resistance*” (47), que conceptualizan este problema creciente.

En el 2017 la OMS publicó la lista de bacterias que requieren urgentemente para su tratamiento nuevos antibióticos, y las clasificó en tres grupos de importancia que son: prioridad tres o media, prioridad dos o elevada y el más preocupante denominado de prioridad 1 o crítica, en la cual están clasificadas *Pseudomonas aeruginosa* y las *E. coli* productoras de carbapenemasas dentro de las enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos (15).

Sin embargo los perfiles de resistencia pueden variar de una región a otra y un gen de resistencia que es relevante en una zona geográfica, puede no ser tan frecuente en otra. Colombia se acogió al consenso latinoamericano de la Red latinoamericana de resistencia a los antimicrobianos donde se evaluaron los microorganismos multirresistentes y se hizo una clasificación pertinente que recoge el contexto de la región. En él, *Pseudomonas aeruginosa* también pertenece a los microorganismos XRD, es decir es resistente a más de doce fármacos antibióticos (15, 47).

Dado el panorama nacional en cuanto a resistencias bacterianas por THG, es claro que el sistema CRISPR / Cas9 ofrece nuevas oportunidades para erradicar las cepas BLEES y las cepas mcr-1 de circulación frecuente en Colombia, ya que se demostró que CRISPR/Cas9 unido a una nucleasa de ADN guiada por ARN puede editar específicamente genes bacterianos, lo que lleva a la re sensibilización de las células resistentes a antibióticos (44).

Se deben buscar secuencias tipo factor común para que la edición genética de re-sensibilización tenga un valor clínico relevante, los investigadores sugieren que estas secuencias pueden ser aquellas que se han conservado sin mutaciones (9); así, puede extenderse el efecto de la edición como sucedió en presencia del plásmido pRESAFRESBL, el cual sin ser el objetivo principal de la investigación, también eliminó la resistencia contra Cef, debido a que había una secuencia común en los genes BLEES y el gen de resistencia a Cef; si se realiza de esta manera se amplía la acción frente a varios plásmidos (9).

Otra forma que encontraron los autores para ser más efectivos en la re-sensibilización de bacterias Gram negativas multirresistentes, fue diseñar sistemas de recombinación CRISPR / Cas9 y I-Red (pCasPA / pACRISPR), que mostraron que se puede hacer una manipulación genética rápida, precisa e ininterrumpida, fue el caso de la re-sensibilización de *P. Aeruginosa* (46).

Se intentó primero con un solo plásmido, pero el plásmido resultante no pudo mejorar la eficiencia de edición, así que para mejorar la edición se entendió que las proteínas de recombinación necesitan ser pre-expresadas en las células bacterianas objetivo, antes de la edición de su genoma por medio de CRISPR / Cas9 (46); en otras palabras también hay que mejorar la expresión proteica en los experimentos de intervención con CRISPR/Cas9 para que su eficiencia sea mayor.

El sistema Cas9 y el sistema I-Red o de proteínas de recombinación pueden estar presentes en un solo plásmido, y debe ser un paso importante para la eficiencia de la re-sensibilización que las proteínas recombinantes aparezcan a tiempo en cuanto se presenta la ruptura de ADN bicatenaria generada por el sistema CRISPR / Cas9, de manera que la célula intervenida genéticamente pueda reparar sus ácidos nucleicos con la menor huella posible en el por cambios en sus bases nitrogenadas (46).

CRISPR / Cas9 mejorara como contingencia de control de genes de multirresistencia a antibióticos no solamente si se garantiza cada vez más su especificidad y precisión, sino convirtiéndose en una política de salud pública global encaminada a contrarrestar el problema creciente de resistencia bacteriana a

antibióticos, que sea llevada a cada país adhiriéndose a las estrategias de sus instituciones de salud en el área de epidemiología.

Lo anterior solo será posible si CRISPR/Cas9 sale de la investigación a la intervención en salud pública, y eso ocurrirá si la herramienta llega a ser capaz de realizar múltiples revisiones y confirmaciones antes de cortar las secuencias blanco; pues al hacerse de esta manera se amplía la acción frente a varios plásmidos; también si la proteína Cas9 ejerce un autocontrol al unirse a una región de ADN, permitiendo otra verificación antes de implementar el complejo de proteínas, alineando con precisión los sitios activos que cortan el ADN de doble cadena (46).

CRISPR/Cas9 tiene un gran potencial como mecanismo de edición genética de alta eficiencia en especies de prioridad 1 por su resistencia extendida a antibióticos como *Pseudomonas aeruginosa* y *E. Coli* multirresistente y permitirá abarcar un sin número de investigaciones incluyendo la dirigida a reducir el alcance de la resistencia bacteriana a antibióticos de varias bacterias más.

Cabe destacar la relevancia de los virus bacteriófagos que bien pueden emplearse como vectores de entrega para este diseño de edición genética o como antibióticos que pueden hacerle daño a las bacterias incluso si son multirresistentes.

CRISPR presenta dilemas bioéticos inevitables y necesarios, desde los más sencillos tales como su implicación en la mejora de la productividad agrícola saliendo incluso del laboratorio a la producción en campo y reemplazando paulatinamente el papel de la ingeniería genética en una disciplina como la agronomía tan ligada a nuestro desarrollo como civilización, hasta otros más polémicos como su uso para generar seres humanos mejorados que generasen algún tipo de elitismo biológico.

CRISPR es ante todo un boom de nueva biotecnología que fácilmente puede llegar a los laboratorios del mundo; y que nos da una enorme responsabilidad con la sociedad y que de ser bien aprovechada y estar en buenas manos es capaz de generar cambios positivos para la salud pública de toda la población humana.

En este sin fin de posibilidades que parece traer la tecnología Crispr Cas, este sistema puede estarse presentando en una de sus tantas facetas como una de las oportunidades para enfrentar este problema de salud pública.

CONCLUSIONES

1. CRISPR Cas 9 puede re-sensibilizar bacterias Gram negativas como *E.coli* y *P.aeruginosa*, por medio de la edición genética de procariontes a través de plásmidos diseñados que tienen la secuencia específica para un gen de resistencia.
2. Hay varios caminos de re-sensibilización implementando CRISPR Cas9, eliminación de un gen de resistencia a antibióticos, inserción de un plásmido compuesto que edita varios genes de resistencia a la vez, por electroporación e implementación de péptidos antimicrobianos o causando una mutación cromosómica como en el caso de la re-sensibilización en las quinolonas.
3. Es importante hacer la discusión y llegar a un consenso sobre el adecuado uso de CRISPR Cas9 en la lucha contra la resistencia a antibióticos, y verificar su implementación como re-sensibilizador y antimicrobiano.
4. La prevención de la distribución de genes de transmisión horizontal como *mcr-1* por medio de CRISPR Cas9 tiene un potencial en salud pública altamente importante.
5. A pesar de la diversidad de genes de resistencia y su alta distribución, es posible diseñar métodos de re-sensibilización compuestos que extingan la expresión de varias resistencias en un mismo ensayo.

REFERENCIAS

- 1 Fergus Walsh. Antibiotic resistance as 'serious as terrorism'. The Western Morning News 2013 Mar 11:16. Disponible en:
<https://www.bbc.com/news/health-21>
- 2 Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo De antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011 alera D Barrero L Villalobos A Rivera S Ovalle M. Biomédica 2013. Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud. Vol. 34 (2014): Suplemento 1, Resistencia bacteriana ISSN: 0120-4157. Disponible en: Disponible en:
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1698>
- 3 Sun L, He T, Zhang L. et al. Generation of newly discovered resistance gene mcr-1 knockout in E. coli using the CRISPR/Cas9 system. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017 vol: 27 (7) pp: 1276-1280. Disponible en:
<https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=29f38258-094b-4713-1e63-030887be1fab&documentId=5ec249cf-64e0-3e1d-86b7-124893491bb3>
- 4 González L Cortés J. Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en enterobacterias en aislamientos intrahospitalarios en Colombia. Biomédica 34 (2), 180-197, 2014. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84330907005>
- 5 Espinosa C Cortés J Castillo J Leal A. Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. Biomédica 31 (1), 27-34, 2011. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322444005>
- 6 Moncayo Medina A. Antibiotic resistance and the lack of interest by the pharmaceutical industry. ScienceDirect Volume 18, Issue 2, April-June 2014, Pages 35-36. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.02.003>
- 7 Ceasar S, Rjan V, Prykhozhiy S, Berman J. Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Publisher:Elsevier B.V vol:1863 (9) pp: 2333-2344.2016. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916301781?via%3Dihub>
- 8 De La Fuente Nuñez C. ; Lu T. CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of secuencia-specific antimicrobials, and future prospects. Integrative Biology (United Kingdom) 2017 vol. 9 (2) pp: 109 - 122. Disponible en:
Doi:10.1039/c6ib00140h
- 9 Kim J, Cho D, Park M. et al. Crispr/Cas9- mediated resensitization of antibiotic-resistant E. coli harboring extended-spectrum B-lactamases. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015 vol: 26 (2) pp: 394-401. Disponible en:
<https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=4638e4c6-88df-549f-2bbb-6d292c7e2dbb&documentId=d241b8d4-b4f5-3ef2-bfa8-cda38989a154>
- 10 Qiu H. Gong, Butaye P, Lu G. et al. CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between gyrA mutation and quinolone resistance in E. coli. FEMS Microbiology Letters Publisher Oxford University Press. 2018 vol: 365 (13). Disponible en:
<https://academic.oup.com/femsle/advance-article-abstract/doi/10.1093/femsle/fny127/4995911>

11 Weizhong Chen, Ya Zhang et al. CRISPR/Cas9- based Genome Editing in *Pseudomonas aeruginosa* and Cytidine Deaminase- Mediated Base Editing in *Pseudomonas* Species. *iScience* 6, 222-231, August 31, 2018. Disponible en:

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

12 Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. Disponible en:
<https://www.mendeley.com/catalogue/nucleotide-sequence-iap-gene-responsible-alkaline-phosphatase-isoenzyme-conversion-escherichia-coli/>

13 Tomado de internet:

http://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/9322/mod_resource/content/1/CRISPR%20CAS9.pdf

14 Mojica F, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 2000.

15 Tomado de internet:

<http://fundacion-antama.org/historia-del-desarrollo-de-la-tecnologia-crispr-cas/>

16 Rodolphe Barrangou, Christophe Fremaux, Hélène Deveau et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 23 Mar. 2007: Vol. 315, Issue 5819, pp. 1709-1712. Disponible en:
<https://science.sciencemag.org/content/315/5819/1709>

17 Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1390–1400. doi:10.1128/JB.01412-07. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2238228/>

18 Doudna, J.A., y Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR/Cas9. *Science*. American Association for the Advancement of Science. 2014. Disponible en:
<https://doi.org/10.1126/science.1258096>

19 Huang Z, Tomitaka A, Raymond A, Nair M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. *Gene Ther* 2017 07;24(7):377-384. Disponible en:
<https://nature.com/articles/gt201735>

20 Bier E, Harrison M, O'connor- Giles K, Wildonger J. Advances in engineering the fly genome with the CRISPR-Cas system. *GENETICS* January 1, 2018 vol. 208 no. 1 1-18. Disponible en:
<https://doi.org/10.1534/genetics.117.1113>

21 Kolli N Lu M Maiti P Rossignol J Dunbar G *International Journal of Molecular Sciences* 2017 vol: 18
(4). Disponible en:
<https://doi.org/10.3390/ijms18040754>

22 Jusiak B Cleto S Perez-Piñera P Lu T *Trends in Biotechnology* Publisher: Elsevier Ltd 2016 vol: 34 (7) pp: 535-547. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.014>

23 Idoko-Akoh Alewo, Taylor Lorna, <...>, McGrew Michael J. High fidelity

CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group (2018) 8:15126. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC61811960/>

24 Tomado de internet:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>

25 Esparza Germán. Conferencia: Bacilos Gram Negativos Panresistentes. Aspectos Diagnósticos, Terapéuticos y Epidemiológicos. Asociación Colombiana de Infectología (ACIN). 2016 Disponible en:

<https://youtu.be/MEf0U9k6pxc>

26 Hernández-Gómez C Blanco V Mota G Correa A Maya J De la Cadena E Perenguez M Rojas L Hernández A Vallejo M Villegas M. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*. Vol. 34 (2014): Suplemento 1, Resistencia bacteriana ISSN: 0120-4157. Disponible en:

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>

27 Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, 25–64. doi:10.4137/PMC.S14459

28 Argyris Michalopoulos, Matthew E. Falagas. colistin and polymyxin B in critical care. *Crit. Care* Clin 24 (2008).

29 Tomado de internet:

<https://es.slideshare.net/mobile/josemiguelunerg/resistencia-bacteriana-79164438>

30 Nordmann, Patrice & Dortet, Laurent & Poirel, Laurent. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm!. *Trends in molecular medicine*. 18. 263-72. 10.1016/j.molmed.2012.03.003. Disponible en:

[file:///C:/Users/usuario/Downloads/Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae Here i.pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/Carbapenem%20resistance%20in%20Enterobacteriaceae%20Here%20i.pdf)

31 Calvo Jorge; Cantón Rafael et al. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISBN-978-84-615-1530-1. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia38.pdf>

32 Tomado de internet:

<http://www.youtube.com/watch?v=zdz38cgHmJs>

33 Tomado de internet:

<https://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/escherichia-coli-i.pdf>

34 Tomado de internet:

https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

35 Pérez Faraldo Bárbara, González Isla Fernando. Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores: agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención sanitaria. *ccm [Internet]*. 2017 Dic [citado 2019 Oct 02]; 21(4): 1197-1200. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156043812017000400021&lng=es.

36 De Almeida Alejandra. Análisis de cepas recombinantes de *Escherichia coli* productoras de poli(3-hidroxibutirato): efecto de la acumulación del polímero de la proteína PhaP sobre el metabolismo y la expresión génica. Tesis doctoral en Química Biológica. Universidad de Buenos Aires. 2010. Disponible en:

https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4656_DeAlmeida.pdf

37 Ugarte Silva Ruth; Olivo López José; Corso Alejandra et al. Resistencia a colistín mediado por el gen mcr-1 identificado en cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*: primeros reportes en el Perú. *An. Fac. med.* Julio de 2018. 79 (3): 213-217. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832018000300004

38 Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium y *Escherichia coli* de origen humano en Colombia. Grupo de Microbiología Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia Dirección de Redes en Salud Pública Instituto Nacional de Salud. 2018. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Alerta%20Colombia%20mcr1%20Salmonella%20y%20E%20%20coli.pdf>

39 Sánchez Palencia Liz, Acosta Cáceres José. Mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* de *Neisseria gonorrhoeae* presente en muestras clínicas de hombres que tienen sexo con hombres. *Rev. peru. biol.* [Internet]. 2017 Sep [citado 2019 Oct 02]; 24(3): 283-292. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172799332017000300008&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13905>.

40 Tomado de internet:

https://es.slideshare.net/elvis_d7/quinolonas-45973885

41 Montoliu Lluís. Video de la conferencia “Editando genomas: Todo lo que ya podemos hacer con CRISPR y mucho más”, durante la XIV edición de encuentros con la ciencia celebrada el Centro de Biotecnología (CSIC) en España el 19 de Mayo de 2017. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=WsweSPH3EW0>

42 Mojica Francisco. Video de la conferencia “Sistemas CRISPR - Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano”, durante la XIII edición de encuentros con la ciencia celebrada en Málaga España el 11 de enero de 2016. FECYT, de la SEBBM y Ámbito cultural de el Corte Inglés. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=GOK6FkfmHdQ>

43 Karginov y Hannon. Las secuencias repetidas de CRISPR. *Cell* 2010. Disponible en:

<https://www.google.com/amp/s/www.dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/amp/>

44 Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol.* 2014 Nov;32(11):1141-5. doi: 10.1038/nbt.3011. Epub 2014 Sep 21. PMID: 25240928; PMCID: PMC4237163. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4237163/>

44 Haisi Dong, Hua Xiang. Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the mcr-1 gene from *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53 (2019) 1-8.

45 M02-A12 Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard – Twelfth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. January 2015. Disponible en: <https://clsi.org>

46 Tomado de internet

www.crispr.mit.edu.co

47 Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. Rev Panam Salud Publica. 2019;43:e65. Disponible en:

<https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>

48 Didovik A Borek B Tsimring L Hasty J. Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: Principles, advances, and applications. Current Opinion in Biotechnology 2016. Disponible en:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0958166916301537?token=A9109FC63A378A3349936B18259C6FA70C21FE461684748011D671B2DAC95A973BD82ECC5934124DE153DC8006F723B5>

49 Tomado de internet:

<https://www.ins.gov.co/TyS/programas-de-calidad/programas-directos/bacteriolog%C3%ADa>