

**Construcción de mutantes de *Candida glabrata* resistentes a Caspofungina
para el factor de transcripción CRZ1 de la vía Calmodulina/Calcineurina
mediante el sistema CRISPR-Cas9.**



**ESTUDIANTE PREGRADO:
DANIELA AMADO AMADO**

**DIRECTORA
CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO Bact, M.Sc, Ph.D**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2018**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA**

APROBADO

CLAUDIA MARCELA PARRA GIRALDO
Bact, M.Sc, Ph.D
Directora

GIOVANNI ANTONIO RODRÍGUEZ LEGUIZAMÓN
MD, Ph.D
Par evaluador

JOSE SALVADOR MONTAÑA LARA
MD, Ph.D
Par evaluador

NOTA DE ADVERTENCIA:

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN N° 13 DE JULIO DE 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS:

En este trabajo quiero agradecer a mi familia ya que fue una bendición contar con su apoyo incondicional y paciencia, no solo en esta etapa de mi carrera profesional, sino también a lo largo de todos mis triunfos y tropiezos. Gracias por su apoyo en cada una de las metas que me he propuesto y por estar presentes en todos los momentos importantes.

También quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Claudia Parra, por ayudarme a solucionar y a afrontar cada una de las dificultades que se presentaron durante el desarrollo de este trabajo, por enseñarme y acogerme en su grupo de investigación y brindarme la oportunidad de aprender cosas nuevas y participar en diferentes proyectos de investigación, que me permitieron crecer en mi procesos de formación académica.

Por último quiero agradecer a Andrés Ceballos por permitirme ser parte de su proyecto de investigación de doctorado, brindarme su conocimiento y apoyo en el proceso de construcción de este trabajo, acogerme de la mejor manera en el laboratorio y hacer de este proceso una experiencia muy divertida. Además, quiero agradecer a Norida Velez por ser mi apoyo incondicional en el laboratorio, por hacer de mí una mejor profesional, por compartir conmigo su experiencia y estar presente en los momentos más alegres y difíciles de este proceso y contribuir con su conocimiento en el desarrollo de este Trabajo de grado para que saliera de la mejor manera.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCION	8
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
4. REFERENTES CONCEPTUALES	11
5. ANTECEDENTES	19
6. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
8. METODOLOGÍA	21
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
10. CONCLUSIONES:	44
11. PERSPECTIVAS	45
12. BIBLIOGRAFÍA	46
5. MATERIAL SUPLEMENTARIO	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Diseño experimental	21
Tabla 2 Diseño experimental	22
Tabla 3 Materiales	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Material biológico	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de acción de las equinocandinas.....	13
Figura 2: Vía de señalización Calmodulina/Calcineurina.	15
Figura 3: comparación de secuencias FNAT y CRZ1 utilizando el algoritmo BLASTn.	16
Figura 4: Unión de la proteína Cas9 con sgRNA, ADN de interés, secuencia PAM.	17
Figura 5: Sistema CRISPR-Cas	19
Figura 6: Crecimiento mediante spot assay de <i>C. albicans</i> y mutantes de la vía Cam/Cal en medio YPD y en medio YPD + Micafungina	20
Figura 7 Plasmido pCYC1 para la transformación de <i>Candida glabrata</i>	41
Figura 8 Concentración mínima inhibitoria de <i>Candida glabrata</i> frente a caspofungina.	42
Figura 9 Porcentaje de supervivencia de <i>Galleria mellonella</i> infectada con <i>Candida glabrata</i> 1.5×10^9 Cel/mm ³	43

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Candida glabrata* es una levadura oportunista que causa infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunosuprimidos con una tasa de mortalidad muy alta debido a la resistencia que este microorganismo ha desarrollado a los antifúngicos; esta levadura posee MIC muy alta para fluconazol, y en los últimos años se han aislado cepas resistentes a la caspofungina (equinocandina de elección como tratamiento de primera línea) debido a mutaciones en genes FKS cuya sobreexpresión es mediada por la vía Calcineurina/Calmodulina. Por lo anterior se hace necesario realizar una mutante del factor de transcripción CRZ1 y evidenciar retornar de un fenotipo resistente a sensible.

OBJETIVO: Obtener mutantes de *Candida glabrata* resistentes a Caspofungina aisladas de muestras clínicas para el factor de transcripción CRZ1 mediante el sistema CRISPR-Cas9.

METODOLOGÍA: se realizó una búsqueda informática de la literatura sobre el sistema CRISPR-Cas en levaduras. Además, se diseñó un plásmido con la secuencia del sgRNA complementario a una fracción de la secuencia del gen CRZ1, y con el sistema CRISPR-Cas9 para transfectar las levaduras y seleccionar las cepas mutadas a través de un marcador de selección fluorescente.

RESULTADOS: En la búsqueda sistemática se analizaron 39 artículos en los cuales, se obtuvo información sobre el sistema CRISPR-Cas en levaduras de importancia clínica e industrial, se documentó las variantes descritas en levaduras para el uso del sistema CRISPR/Cas. La construcción bioinformática de *C. glabrata*, se obtuvieron dos sgRNA con score de 89 y 71%, un mapa del constructo del plásmido con el sistema CRISPR más el marcador YFP y el SgRNA, la generación del mutante no se logró realizar por incumplimiento de la casa comercial.

CONCLUSIÓN: El sistema CRISPR es un sistema muy versátil y eficientes, que permite realizar la edición del genoma de diferentes organismos celulares. Para lograr el éxito de la edición, es muy importante un buen diseño bioinformática que garantice la especificidad del sistema, y el reconocimiento adecuado de la Cas9 de la secuencia diana que se quiere editar.

2. INTRODUCCION

Desde los años 80's los hongos se han convertido en importantes causas de enfermedades humanas [1]. *Candida* spp. es uno de los géneros más prevalentes en las infecciones fúngicas cuya incidencia es de 8 – 10 casos por 100.000 habitantes. En Latinoamérica *C. albicans* es la más prevalente, con un 40,9% hasta 62% de los casos [2,3]; esta levadura es capaz de producir candidemias en pacientes que presentan algún tipo de inmunosupresión; sin embargo, otras especies son capaces de generar esta misma enfermedad en el ser humano entre las cuales se encuentran. *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, siendo *C. glabrata* la segunda más prevalente a nivel mundial cuyo tratamiento se basa en el empleo de equinocandinas (caspofungina).

C. glabrata es saprofita de la microbiota comensal que no forma hifas cuyo genoma es más similar a *Saccharomyces cerevisiae* [4], en su estado patógeno, expresa, proteasas que le permiten degradar colágeno, queratina, mucina, moléculas de adhesión EPA, que le confieren la capacidad de invadir el tejido y generar la infección [5]. Esta levadura en los últimos años ha presentado altas tasas de resistencia, principalmente al fluconazol, debido a que sobre expresa bombas de flujo y tiene la capacidad de tomar el ergosterol del medio para reutilizarlo; además, de desarrollar resistencia a las equinocandinas debido a mutaciones en el gen FKS que codifican para la enzima 1, 3- β - D glucano-sintasa [6].

Dentro de las diferentes vías de señalización presentes en esta levadura, se sabe que la vía Calmodulina-Calcineurina (Cam/Cal) está implicada en procesos de resistencia principalmente a las equinocandinas y que su factor de transcripción es Crz1 activa cerca de 87 genes que están relacionados con procesos de termotolerancia, crecimiento, estrés oxidativo. Para el estudio de esta vía y comprender el papel que cumple el factor de transcripción CRZ1, se decidió realizar un mutante utilizando el sistema CRISP-Cas9. Este sistema revolucionó la forma de realizar edición génica, debido a que es un sistema con una eficiencia mayor a los métodos tradicionales (TALENs por sus siglas en inglés Activador de transcripción como efector nucleasas y SINES por sus siglas en inglés Elementos cortos de ADN repetitivos nucleares intercalados) y posee una mayor versatilidad que estos [7]. Por todo lo anteriormente mencionado, este estudio pretende realizar mutantes del

factor de transcripción CRZ1 de la vía Cam/Cal para evidenciar el efecto de su mutación utilizando el sistema CRISPR-Cas9, en el cambio de patogenicidad y resistencia.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, las infecciones fúngicas se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que 1,2 millones de personas en el mundo padecen estas infecciones [8]. Más del 90% de las muertes reportadas por infecciones fúngicas se deben a los géneros, *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* [9]. *Candida spp* es una levadura oportunista que causa candidemia en pacientes inmunocomprometidos; esta infección oportunista tiene una incidencia a nivel mundial más de 400,000 casos por año, resultando mortales el 27% principalmente debido a fallos en el tratamiento de los cuales algunos de ellos son producto de las resistencias a los antimicóticos [10].

La especie más prevalente es *C. albicans* siendo responsable de la mayoría de los casos de candidiasis, seguida por *C. glabrata*, la segunda especie más prevalente en candidemias cuya incidencia en la resistencia a los medicamentos antimicóticos es mucho mayor que para *C. albicans* [11] (la más prevalente en este tipo de infecciones); por lo que es importante estudiar la resistencia a los medicamentos antimicóticos, como los azoles (Fluconazol, itraconazol y voriconazol) y las Equinocandinas (Caspofungina, micafungina, anidulafungina) en estos microorganismos, ya que han incrementado las tasas de resistencia significativamente, debido al constante uso de estos agentes terapéuticos [12]; las equinocandinas tienen como blanco la enzima (1-3)- β -glucano sintetasa y la resistencia frente a las equinocandinas es un problema que está relacionado con respuesta al estrés generado por los antifúngicos debido a mutaciones en los genes FKS1 y FKS2, que codifican para enzima (1-3)- β -glucano sintetasa, implicada en la biosíntesis del 1,3 β D glucano [13,14]. Se ha descrito que la ruta de señalización Calmodulina/Calcineurina está implicada en múltiples procesos biológicos entre los cuales se encuentra la respuesta a antifúngicos, y que al inhibir la vía con medicamentos o construyendo mutantes de la misma, se logra retornar de un fenotipo resistente a un fenotipo sensible [8]. El factor de transcripción Crz1,

identificado por primera vez en la levadura *S. Cerevisiae* como un mediador de los cambios dependientes a calcineurina en la expresión génica, en *C. glabrata* modula la biosíntesis de la pared celular, síntesis de proteínas de choque térmico, patogénesis, homeostasis. En mamíferos el homólogo del factor de transcripción Crz1 es el factor nuclear de las células T activadas (FNAT) [15]. Regulador de múltiples procesos celulares, incluidos activación de linfocitos T, diferenciación de neuronas, fecundación y contracción muscular. Teniendo en cuenta lo anterior se puede afirmar que la vía Cam/Cal es un promisorio blanco terapéutico; sin embargo, al estar presente tanto en las levaduras como en lo humanos es necesario buscar blancos selectivos en la levadura para proponer nuevas estrategias terapéuticas. Es por esto, que en este trabajo se pretende construir mutantes para el factor de transcripción Crz1 (presente en la levadura, pero no en el humano) de la vía Cam/Cal implicada en la resistencia a Caspofungina para posteriores estudios enfocados en el diseño de nuevas dianas terapéuticas.

En el tratamiento de las micosis, los antifúngicos disponibles son limitados: (análogos de pirimidina, polienos, azoles y equinocandinas), su toxicidad, eficacia y la aparición de resistencia, limita los tratamientos exitosos en los pacientes. Aunque, estos fármacos se dirigen a distintas vías fúngicas, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos antifúngicos que sean más eficaces, específicos para hongos, con toxicidad reducida o nula y, al mismo tiempo, no induzcan resistencia. Con la obtención de una mutante del factor de transcripción *CRZ1* de la vía Cam/Cal en cepas de *C. glabrata* resistentes a caspofungina, se espera modular la resistencia y la patogenicidad de la levadura, permitiendo diseñar y evaluar nuevas moléculas que estén direccionadas de forma selectiva, evaluándose como moléculas altamente efectivas o como moléculas coadyuvadores de los antifúngicos, generando alternativas de tratamiento para pacientes que cursan infecciones fúngicas invasivas por cándidas resistentes.

4. REFERENTES CONCEPTUALES

3.1) *Candida glabrata*

C. glabrata es la segunda especie más prevalente aislada en candidemias, con una tasa de mortalidad hasta del 50% [16] y es el agente infeccioso más común en pacientes neoplásicos y adultos mayores [16]. Se sabe muy poco sobre la virulencia de esta especie, y prácticamente no se sabe nada sobre las defensas del huésped dirigidas contra el organismo. A diferencia de *C. albicans*, *C. glabrata* no es dimórfica por lo cual no genera pseudomicelios durante su proceso de patogenicidad, posee la capacidad de asimilar solamente glucosa y trehalosa, lo que permite su identificación *in vitro* [17]. Por otro lado esta especie se ha convertido en un importante patógeno debido a su difícil tratamiento, ya que presenta una alta tasa de resistencia a los antifúngicos. Actualmente, para el tratamiento invasivo de candidiasis se recomienda fluconazol o una equinocandina como terapia de primera línea [18], sin embargo, la resistencia de *C. glabrata* a las equinocandina es un problema emergente y se ha asociado con mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2* [13]. Estos genes codifican la subunidad principal del complejo (1,3) - β -d-glucano sintasa, que permite la síntesis de (1,3) - β -d-glucano, el principal componente de la pared celular [19].

3.2) Características Biológicas de *C. glabrata*

C. glabrata es un microorganismo unicelular que posee una reproducción asexual por gemación mediante la producción de blastoconidias que dan origen a otra célula, genéticamente idéntica a la célula progenitora. Dentro de las estructuras más importantes en la levadura, se encuentra la pared celular, la cual es la fracción más externa de la levadura y que tiene la función de actuar como una barrera protectora y permeable, para evitar que la célula sufra daños osmóticos o físicos, además brinda forma y le confiere rigidez a la célula [19]. Esta estructura fúngica, está formada por polisacáridos como β -glucanos, quitina y en una menor proporción por manoproteína, siendo los β -glucanos, el principal blanco terapéutico para las infecciones. Esta levadura posee 13 cromosomas, es un microorganismo haploide y solo se conoce el 4,48% de la función de las proteínas codificadas por su genoma [20].

3.3) Tratamiento

Para el tratamiento de las infecciones causadas por esta levadura se usan antifúngicos que atacan diversas moléculas presentes en la levadura, causando su muerte en el hospedero. Dentro de los antifúngicos hay diferentes grupos de los cuales los azoles y las equinocandinas son usados para el tratamiento de las infecciones causadas por *C. glabrata*. Los azoles se conforman por imidazoles y triazoles, moléculas heterocíclicas que actúan como fungistáticos frente a la especie de candida. Actualmente, en el ámbito clínico se encuentran disponibles en el grupo de los triazoles para combatir infecciones fúngicas profundas el fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol. El mecanismo de acción de este grupo de antifúngicos consiste en inhibir la síntesis de ergosterol, utilizando como diana la enzima lanosterol desmetilasa, lo que genera una inhibición en la producción de oxígeno impidiendo la demetilación del lanosterol y provocando acumulación del 14- α -metil-3,6-diol el cual es un esteroles tóxico que produce estrés en la membrana celular [21].

El otro grupo de antifúngicos utilizado en clínica para el tratamiento de las infecciones causadas por *C. glabrata*, son las equinocandinas; dentro de este grupo se encuentran la anidulafungina, caspofungina y micafungina. La anidulafungina fue la primera en ser aislada en el año 1974, posteriormente caspofungina en 1989 y por último la micafungina en 1990. Estos compuestos fueron impulsados en el mercado en 2005 debido al incremento en la resistencia a los antifúngicos ya existentes (azoles y polienos) en las micosis invasivas [22]. Estas son moléculas lipopeptídicas obtenidas de forma natural de algunos hongos y modificadas, posteriormente en el laboratorio; tienen como blanco terapéutico la enzima involucrada en la síntesis de la pared celular 1, 3- β - D glucan-sintasa [23] en las subunidades Fks1 o Fks2; La interrupción de esta enzima da como resultado la pérdida de la integridad de la pared celular generándose así un estrés severo de la pared en la célula fúngica provocando la lisis celular por edema, teniendo así, este antifúngico una actividad fungicida [24]. La caspofungina es una equinocandina utilizada con frecuencia en el ámbito clínico para combatir infecciones invasivas producidas por el género *Candida*; esta es sintetizada a partir del hongo *Glarea lozoyensis* la cual presenta un amplio espectro, con una vida media prolongada de 9 a 11 horas circulando por el torrente sanguíneo, unida a la albúmina y es metabolizada por vía hepática

mediante hidrólisis peptídica [22]. Este antifúngico es utilizado como terapia de primera línea para el tratamiento de candidiasis [13], por lo cual en los últimos años se ha incrementado la resistencia, debido a la presencia de mutaciones presentes en *C. glabrata* que hacen resistentes a estos microorganismos al tratamiento [16].

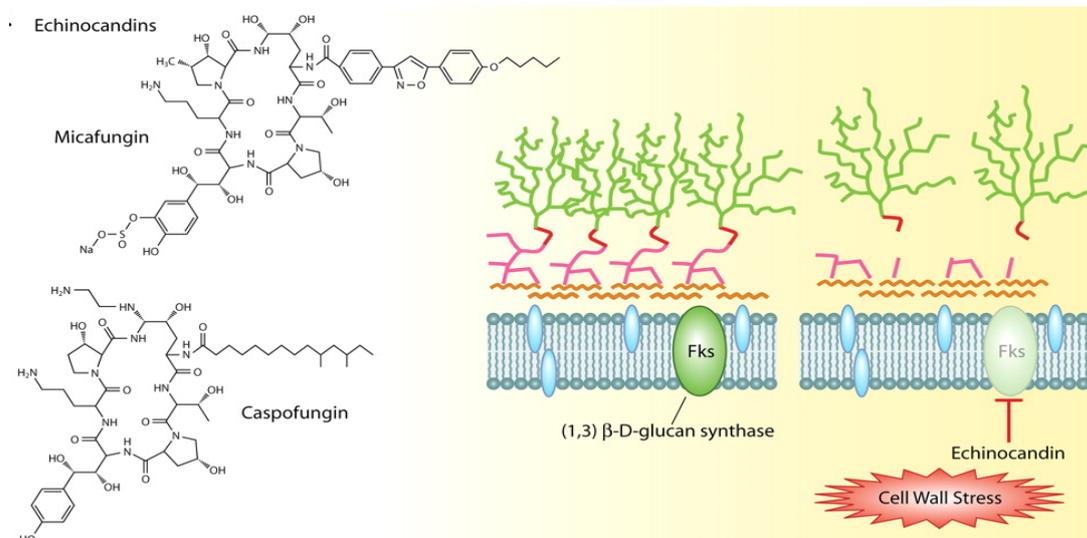


Figura 1: Mecanismo de acción de las equinocandinas.
Tomado de: Shapiro et al 2011 doi: 10.1128/MMBR.00045-10

3.4) Mecanismos de resistencia a caspofungina

Debido al incremento del uso terapéutico de la caspofungina, se ha incrementado la resistencia a este antifúngico en *C. glabrata*. Esta resistencia ha incrementado en los últimos años, debido a la presión selectiva producto del constante uso de estos antifúngicos como terapia. La resistencia adquirida por *C. glabrata* se debe a mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*, que codifican para las subunidades de la enzima 1, 3-β- D glucan-sintasa [25]. Estas mutaciones se realizan en puntos calientes de las proteínas Fks más específicamente en CgFks2; el primer punto caliente se encuentra en los aminoácidos (a.a) 659 - 667, y el segundo punto caliente se encuentra entre los a.a 1374 - 1581 [26]. Lo que genera un cambio en la estructura de la enzima, evitando así, que el antifúngico encuentre afinidad con la enzima y no se pueda unir a ella para cumplir con su mecanismo de acción. Diferentes vías de respuesta a estrés celular están implicadas en la resistencia a los antifúngicos, entre las cuales se encuentra la vía Cam/Cal, la cual está implicada en respuesta a las equinocandinas debido a que el factor de transcripción Crz1 de la vía, incrementa la expresión del gen *FKS2*.

3.5) Vía calmodulina/ calcineurina

Se ha identificado que la vía Calmodulina/Calcineurina (calm/cal) está implicada en la respuesta a antifúngicos en *C. glabrata*, la cual, se activa mediante dos proteínas principales, la calcineurina y la calmodulina. La Calcineurina es una proteína serina-treonina fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina [27], desde su descubrimiento esta ha sido estudiada principalmente en mamíferos y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, recientemente en hongos filamentosos y en otros microorganismos eucariotas como *C. glabrata*. Se ha descrito que alrededor de 87 genes son dependientes de calcineurina; estos genes descritos están implicados en la biosíntesis de la pared celular, en la respuesta a estrés por cambios de temperatura, crecimiento en suero, homeostasis de cationes, morfogénesis, respuestas a medicamentos antifúngicos y la progresión del ciclo celular [26,28]. Por otro lado la Calmodulina está compuesta por dos subunidades; la subunidad Cna1 con acción catalítica y la subunidad Cnb1 con función reguladora [29]. Cuando la levadura se encuentra en condiciones de estrés, utiliza el Ca^{2+} intracelular para activar la vía Cam/Cal. El Ca^{2+} se libera de las vacuolas por medio de canales vacuolares de calcio (Yvc1p) activando el canal Mid1-Cch1 permitiendo la entrada de Ca^{2+} . El calcio en el citosol se une a la calmodulina (codificada por CAM1), la cual es una proteína que cuenta con cuatro sitios de unión de alta afinidad a Ca^{2+} , esta unión estimula un cambio conformacional de la proteína quedando la calmodulina activa, prosiguiendo con la cascada de activación, esta proteína se une con dominios de la calcineurina, interactuando con la subunidad catalítica (Cna1). Complementario a este proceso, la proteína chaperona Hsp90 (proteína de choque térmico), se une físicamente con la subunidad catalítica de la Cam/Cal, Cna1, preparándose para la activación. Una vez activada la subunidad catalítica, tiene acción fosfatasa, des-fosforilando al factor de transcripción Crz1, que se transloca al núcleo para inducir la expresión de diferentes genes.

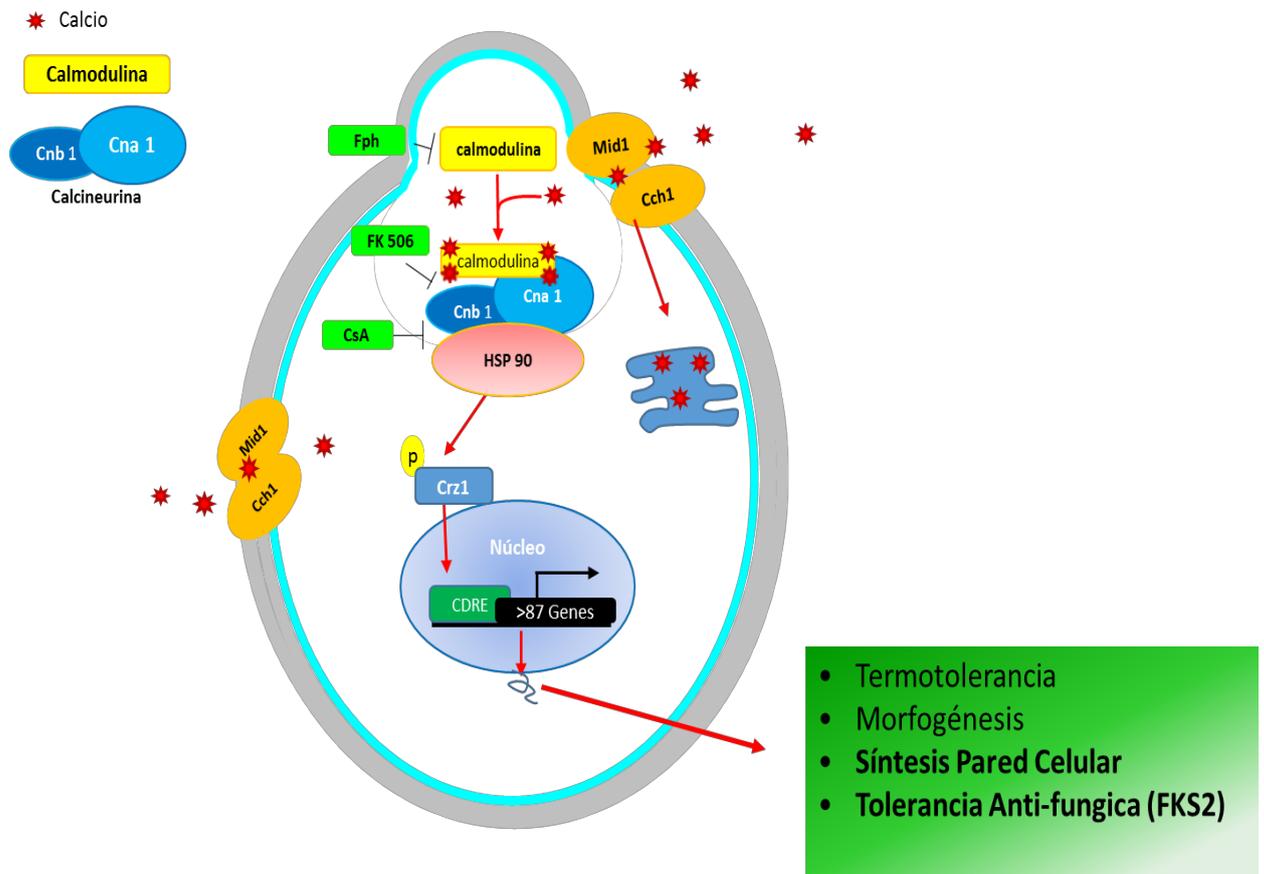


Figura 2: Vía de señalización *Calmodulina/Calcineurina*.
 Diseñado por Andres Ceballos-Garzón PhD(c) 2016.

3.6) Factor de transcripción CRZ1

El factor de transcripción Crz1 se encuentra corriente abajo de la vía calm/cal en el citosol; una vez este se activa por medio de una fosforilación mediante la subunidad Cna 1, se traslada hacia el núcleo celular y se une al promotor de genes llamado (CDRE) mediante dedos de zinc presentes en su estructura, iniciando así la activación de alrededor 87 genes, entre los cuales se encuentra de FKS2, implicado en la resistencia a la caspofungina [30].

El homólogo en los mamíferos del factor de transcripción CRZ1 es el factor nuclear de las células T activadas (FNAT) [31], mediante comparación de secuencias, utilizando el algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), con CRZ1 (CAGL0M06831g *C. glabrata* CBS138), este posee una identidad del 28% y una

cobertura de tan solo el 3%. Por lo que se le considera un posible Candidato terapéutico (figura 3).

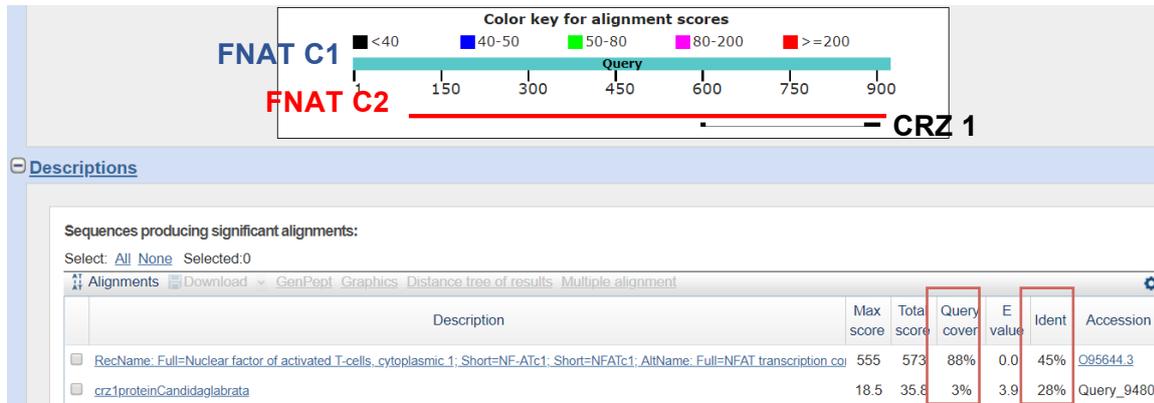


Figura 3: comparación de secuencias FNAT y CRZ1 utilizando el algoritmo BLASTn.

3.7) Sistema CRISPR- CAS9

El sistema CRISPR-CAS se identificó como un sistema de inmunidad adaptativa en procariontes para defenderse contra moléculas de ADN exógeno que pudiera afectar el ADN de la célula, como lo son las infecciones por fagos ó plásmidos [32]. Al pasar los años, se realizaron muchos estudios para comprender la función del sistema en los procariontes y la estructuras de las moléculas implicadas en este sistema, pero fue hasta el 2012 que la canadiense Jennifer Doudna y la francesa Emmanuelle Charpentier reinventan el sistema CRISPR y lo modifican para convertirlo en un mecanismo eficaz y viable en el ámbito de la ingeniería genética [33]. Este sistema ha sido muy importante en el ámbito de alteración de genes puesto que ha revolucionado la forma de editar genes por su versatilidad para adaptarse a cualquier modelo celular, y la facilidad para el diseño del protocolo de edición comparado con otros métodos para alterar el ADN de una célula.

3.7.1) Clasificación del sistema

El sistema CRISPR-CAS se divide en 2 clases; los de clase 1 son aquellos que necesitan un gran complejo de proteínas que realicen la acción de degradación del ADN mediante una secuencia de RNA guía, los de clase 2 son aquellos sistemas que necesitan de una única proteína endonucleasa efectora, guiada por un ARN para llevar a cabo la neutralización del genoma invasivo, como es el caso del sistema CRISPR-Cas9 y CRISPR-Cpf1 [34].

3.7.2) Elementos del sistema CRISPR-CAS9

Este sistema tiene dos elementos muy importantes para funcionar correctamente, entre estos se encuentra la endonucleasa Cas9, una secuencia corta de ARN y una secuencia PAM [35]. La endonucleasa consta de dos lóbulos: (REC) de reconocimiento y (NUC) de actividad nucleasas, el lóbulo REC consta de 2 dominios REC1 y REC2, mientras que el lóbulo NUC posee los dominios RuvC, HNH y PI que reconoce la secuencia PAM en la secuencia de ADN de interés a mutar [36]. Esta proteína endonucleasa va a realizar su actividad mediante los dominios RuvC y HNH tres nucleótidos corriente arriba de la secuencia PAM.

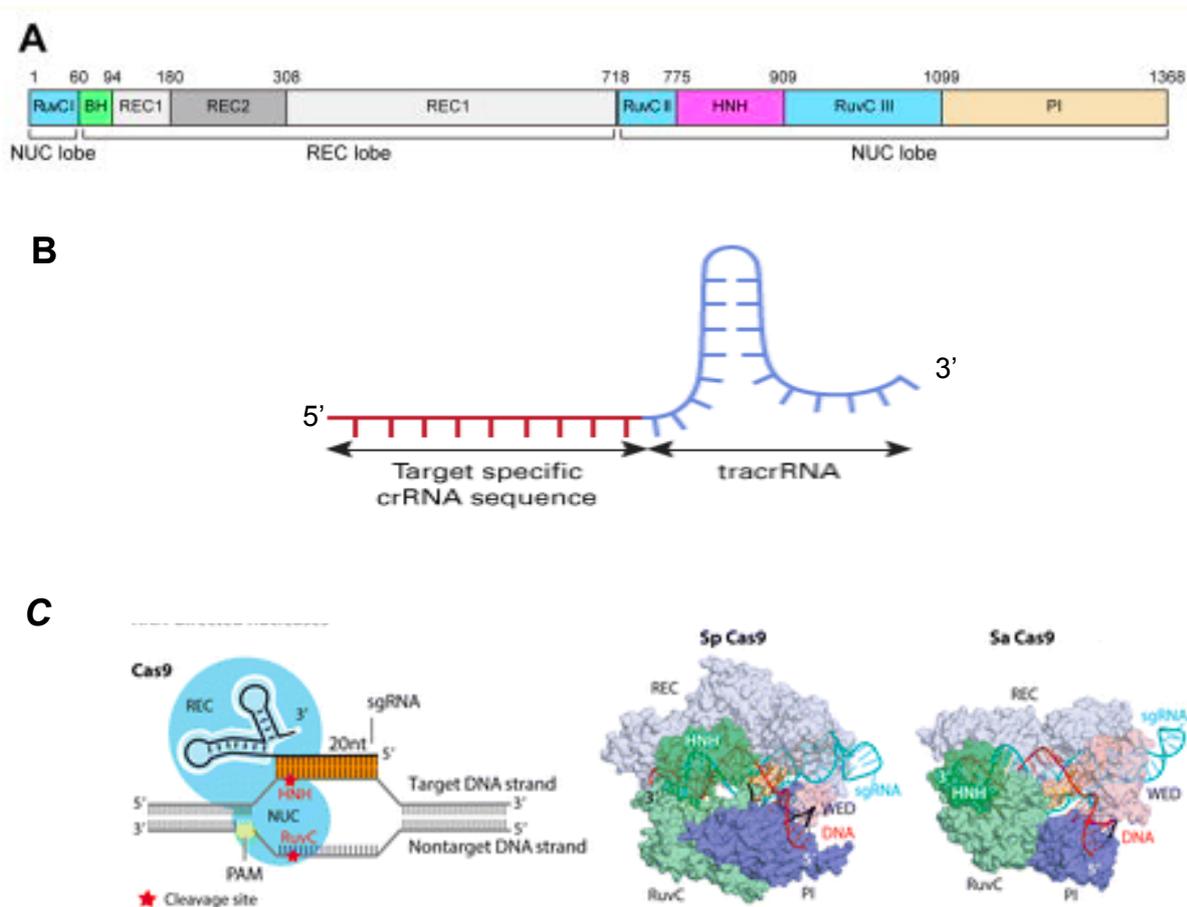


Figura 4: A) gen CRISPR, B) sgRNA, C) conformación Cas9 con sgRNA, ADN, secuencia PAM. Tomado de (Wang, La Russa & Qi et al. 2016. Nishimasu et al., REVISTA 2014)

El ARN guía (sgRNA) consta de un ARN quimérico que conserva dos características fundamentales: una secuencia en el lado 5' que determina el sitio diana del ADN de interés a mutar mediante emparejamiento de bases Watson-Crick (crRNA) y una

estructura de ARN dúplex en el 3' lado que se une a Cas9 (tracrRNA) [37].

La secuencia PAM se ubica en el ADN de interés, para estabilizar el punto de corte de la secuencia, interactuando con el dominio PI de la endonucleasa Cas9. Así, con solo estos elementos se elimina o modifica el DNA defectuoso o no deseado [37]; la secuencia PAM y la proteína Cas9 son siempre las mismas, independientemente del DNA que se quiera editar.

3.7.3) Mecanismo de acción del sistema CRISPR-CAS9

Para realizar la alteración genética en la levadura *C. glabrata*, se debe insertar un plásmido con el sistema CRISPR-Cas9. Una vez se inserta el plásmido, la levadura expresa la proteína Cas9, la cual se ensambla con la región tracrRNA de sgRNA, la cual se ubica en el surco central entre los lóbulos REC y NUC; una vez se ensambla Cas9 con sgRNA, la proteína se une con una fracción de la secuencia de CRZ1 de la levadura que se desea modificar, mediante la región crRNA del sgRNA por complementariedad de bases formando un complejo tracrRNA:crRNA:ADN y Cas9. El dominio PI se une a la secuencia PAM corriente debajo de la secuencia homóloga al crRNA, el dominio HNH del lóbulo NUC se aproxima a la cadena complementaria de la secuencia diana provocando su escisión y lo mismo ocurrirá con el dominio RuvC con la cadena no complementaria. Como consecuencia, se va a dar una rotura de doble cadena (DSB) entre ambos dominios en el genoma de la levadura [38]. Una vez se genera el daño en ambas hebras del ADN, la levadura va a activar sus mecanismos de reparación del DNA; en este caso va a utilizar el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) [39], esto ocurre cuando la célula no tiene una secuencia molde para reparar el ADN, por lo que la polimerasa inserta nucleótidos al azar y por medio de la ligasa, une los extremos producto de DSB, produciéndose inserciones ó deleciones que van a provocar una mutación en el genoma de la levadura [40].

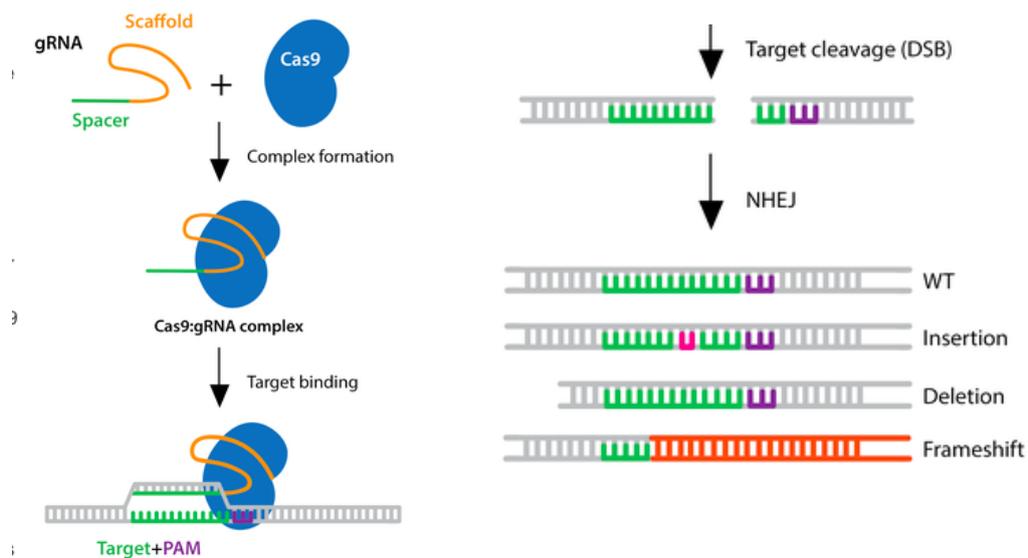


Figura 5: Sistema CRISPR-Cas9 tomado de : <http://www.addgene.org/crispr/guide/>

5. ANTECEDENTES

Desde que la canadiense Jennifer Doudna y la francesa Emmanuelle Charpentier convierten el sistema CRISPR-CAS en un mecanismo eficaz y viable en el ámbito de la ingeniería genética, muchos grupos de investigación lo han utilizado para realizar mutaciones y variaciones genéticas en levaduras; en el 2016 un grupo de investigación implementó el sistema CRISPR-CAS9 en cepas de *C. glabrata*, para realizar recombinación genética con genes de *S. cerevisiae*. En este estudio evaluaron la variabilidad del sistema CRISPR-CAS9, al realizar la recombinación de dos genes en *C. glabrata* y obtuvieron el siguiente resultado:

Al realizar la recombinación genética del gen XTAG con el sistema CRISPR-Cas9 se ve una diferencia en la frecuencia de recombinación al cambiar el número de pares bases utilizados en el sgRNA (20 - 200 pb); en este experimento se observa que la frecuencia de recombinación, es mayor si se utiliza un sgRNA de 200pb con respecto a un sgRNA de 20pb. Al realizar el mismo estudio con el gen HIS3, no se ve una diferencia en la frecuencia de recombinación al cambiar el número de pares bases utilizados en el sgRNA; en este experimento se observa cambios significativos en la frecuencia de recombinación, debido a que es muy similar si se utiliza un sgRNA de 200pb a un sgRNA de 20pb. Este estudio evidencia, que el sistema CRISPR-Cas9 funciona en la levadura *C. glabrata*, debido a que logra realizar el cambio genético esperado, sin embargo es un sistema variable, debido a que según

el gen que se quería recombinar, la longitud del sgRNA influía en el resultado [41].

Por otro lado, muchos grupos de investigación tienen como interés el estudio de la vía Cam/Cal para comprender su importancia de la patogenicidad de las levaduras. En 2009 el grupo de investigación del departamento de genética molecular de la universidad de Toronto y colaboradores, realizaron un estudio, comparando levaduras de *C. albicans* con diferentes mutaciones en las principales proteínas de esta vía, con una cepa Wild Type (WT); en este estudio se obtuvo el siguiente resultado:

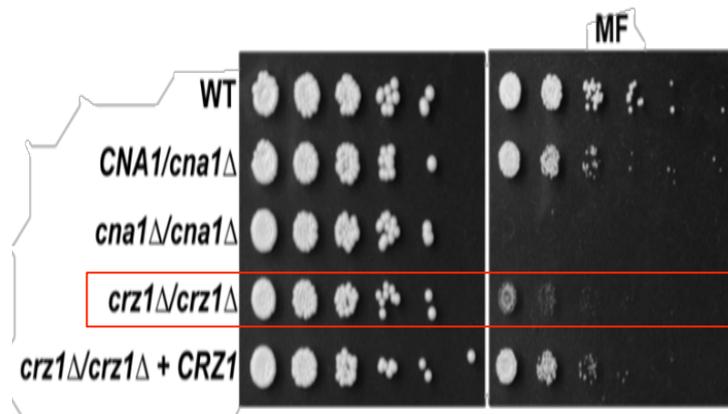


Figura 6: Crecimiento mediante spot assay de *C. albicans* y mutantes de la vía Cam/Cal en medio YPD y en medio YPD + Miconazol tomado de : (Singh SD, Robbins et al. 2009)

Se puede evidenciar que la mutante Crz1 Δ/ Crz1 Δ, tiene un crecimiento similar a la cepa WT, lo que evidencia, que la mutación del factor de transcripción Crz1, es viable y no tiene ningún efecto en el crecimiento normal de la levadura; por otro lado al exponer las cepas a la equinocandina miconazol, la mutante de Crz1 reduce su crecimiento considerablemente con respecto a la WT, lo que evidencia que el factor de transcripción Crz1 está implicado en la resistencia al antifúngico [42].

6. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener mutantes del factor de transcripción Crz1 en Cepas de *Candida glabrata* resistentes a Caspofungina aisladas de muestras clínicas mediante el sistema CRISPR-Cas9.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar una búsqueda sistemática de la literatura sobre la implementación del sistema CRISPR-Cas en la edición genética de levaduras, usos y ventaja.
- Realizar el Diseño Bioinformática para la construcción de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata*.
- Caracterización fenotípica de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata* resistentes a Caspofungina aisladas de muestras clínicas mediante el sistema CRISPR-Cas9.

7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible mediante el sistema CRISPR-Cas9 construir mutantes para el factor de transcripción CRZ1 de *C. glabrata* resistentes a caspofungina?

8. METODOLOGÍA

Objetivo 1. Realizar una búsqueda sistemática sobre la implementación del sistema CRISPR-Cas en la edición genética de levaduras, usos y ventaja.

Diseño experimental búsqueda sistemática sobre la implementación de CRISPR-Cas en la edición génica de levaduras.

Actividades.	Materiales y Condiciones.
1. Estrategia de búsqueda	Se consultaron las bases de datos Pubmed, Lilacs y google academic (Anexo 1). Los criterios de inclusión fueron todos los artículos que incluyeran el sistema CRISPR/Cas en levaduras, no se utilizó restricción de fecha, se consultaron solo artículos en inglés y español, las búsquedas se realizaron por medio de términos MeSH y operadores booleanos, los términos de exclusión fueron otros microorganismos diferentes a levaduras y otras metodologías de edición de genomas.

2. Selección de los artículos	Se realizó según la metodología PRISMA, consiste en un conjunto mínimo de elementos, basados en evidencias, para ayudar a presentar informes de revisiones sistemáticas, es útil para la valoración crítica de artículos. Los artículos fueron evaluados y verificados de manera independiente por cuatro evaluadores teniendo en cuenta el título, resumen y lectura de artículos (Ver gráfico prisma Anexo 2).
3. Análisis de artículos	Se clasificaron los artículos según el tipo de estudio, especie de levadura y tipo de tecnología CRISPR/CAS. Los datos fueron tabulados en el programa de Excel.

Objetivo 2. Construcción Bioinformática para la construcción de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata*.

Diseño experimental para construcción Bioinformática

Actividades.	Materiales y Condiciones.
1. Diseño del sgRNA y plásmido	<ol style="list-style-type: none"> 1. Conocer la secuencia completa del gen CRZ1 de <i>C. glabrata</i> 2. Se utilizó la plataforma bioinformática http://cham-ibmc.u-strasbg.fr:8080/casting.html para la seleccionar el sgRNA con score de eficiencia más alto. 3. Diseñar y sintetizar plásmido con marcador de selección (fluorescente) y con el sistema CRISPR utilizando un vector con sistema Cas9-sgRNA.

Objetivo 3. Caracterización fenotípica de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata* resistentes a Caspofungina aisladas de muestras clínicas mediante el sistema CRISPR-Cas9.

La caracterización fenotípica de las mutantes del factor de transcripción CRZA1 se realizará en tres aislamientos clínicos de *C. glabrata* (Tabla 1). Los microorganismos se obtuvieron de dos estudios metacéntricos en el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) y en muestras clínicas del Hospital Centro Universitario Hospitalario de Nantes, Francia (CHU).

Tabla 1. Material biológico

Numero de referencia	Susceptibilidad a Caspofungina
ATCC2001	Susceptible
PUJ/HUSI 0916	Susceptible
CHU-Nantes 1875	Resistente

CHU-Nantes 1256	Resistente
-----------------	------------

Diseño experimental para construcción *in vitro*.

Actividades.	Materiales y Condiciones.
Construcción de mutantes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Transfección de las levaduras con (LiOAc) y choque térmico 2. Selección por fluorescencia de los microorganismos mutados. 3. Screening de la mutación con PCR y secuenciación de los productos. 4. Secuenciación de genoma completo de las mutantes. 5. Caracterización fenotípica: susceptibilidad.

1. Transfección de la levadura:

Para transformar las levaduras se preparará un pre-cultivo de las células **Tabla 1** en medio YPD durante la noche, en el día dos, se inocularán en 4ml de medio YPD 200µl de las células pre cultivadas anteriormente y se dejarán en agitación a 30°C, 220 rpm entre 3 a 5 horas. Luego se centrifugarán a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se desechara el sobrenadante, después, se lavarán las células con 4ml de agua estéril y se centrifugaran a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las células previamente lavadas y preparadas para la transformación se les agregará 1ml de acetato de litio 0.1M (LiOAc). Seguido de centrifugación a 13,000rpm durante 15 segundos, se adicionarán 200µl de LiOAc 0.1M, agitando y se dividirá en alícuotas de 50µl. A esto se le agregará la mezcla de transformación:

- 50 µl de ADN de esperma de salmón (ssDNA) (2 mg/ml)
- 34 µl de plásmido 100ng.
- 240 µl PEG50%
- 36 µl de LiOAc 1M
- Total= 360µl

Se realizará la transformación de las levaduras por choque térmico a 42°C durante 40 minutos, seguido de centrifugación a 6,000rpm durante 1 minuto, y se realizará la siembra del pellet en medio de cultivo Sabouraud a 37°C por 24hrs.

2. selección de cepas mutadas:

Las células transformadas contarán con el marcador de selección YFP presente en el plásmido insertado (pCYC1). Se observará el cultivo bajo luz UV, y se seleccionarán las colonias fluorescentes.

3. Screening de la mutación con PCR y secuenciación:

Una vez aisladas las cepas que expresan el marcador de selección, se procederá a realizar extracción de ADN y posteriormente PCR para evidenciar la mutación; el fragmento obtenido de la PCR debe ser de menor tamaño en las mutantes que en la cepa *Wild Type* (WT) debido a que se debe evidenciar un cambio en el tamaño amplificado del gen CRZ1. Seguido realizara extracción de ADN y se enviara a secuenciación de genoma completo.

4. Características fenotípicas: se evaluará susceptibilidad de las mutantes del factor de transcripción, comparando los resultados de los aislamientos sin mutar. Siguiendo los lineamientos de CLSI para micro-dilución y patogenicidad en el modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

*Susceptibilidad antifúngica: la prueba de susceptibilidad antifúngica se llevó a cabo utilizando el método de microdilución en caldo, siguiendo las directrices del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI M27-A3) [43]. Las concentraciones de Caspofungin (Sigma) oscilaron entre y 0,0313-16 µg/ml. Las concentraciones mínimas inhibitorias CIM se determinaron visualmente después de 24 h teniendo en cuenta la concentración más baja de fármaco que causó una disminución significativa MIC-2 o $\geq 50\%$ (CAS) en comparación con la del control de crecimiento sin fármaco. El control de calidad se aseguró mediante la validación de la prueba con las cepas recomendadas por CLSI *C. parapsilosis* ATCC 22019 [44]

*Modelo invertebrado *G. mellonella*: los aislamientos fueron cultivados en agar Sabouraud por 24 horas a 37°C. Se suspendieron colonias con un asa estéril en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se contaron en hemocitómetros 1.5×10^9 células/mm³. Se inocularon 10 larvas por aislamiento por experimento, más 10 larvas para cada control (absoluto, desinfección e inoculación) en su última pata izquierda volumen final de 10µL usando una jeringa BD de 0,5mL, se incubaron a 37°C y los datos de viabilidad se obtuvieron mediante el seguimiento en intervalos

de 24 horas durante 10 días en donde se determinó el resultado de supervivencia evaluado mediante gráfica de Kaplan-Meier usando el programa Prisma. Se consideraron muertas cuando no hubo una respuesta al tacto.

Nota: la caracterización fenotípica se realizó en los aislamientos de *C. glabrata* antes descritos en material biológico, no se logró realizar la mutante del factor de transcripción CRZ1 para estos aislamientos por ende tampoco la caracterización fenotípica.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Realizar una búsqueda sistemática sobre la implementación del sistema CRISPR-Cas en la edición genética de levaduras, usos y ventaja.

Resultados de la búsqueda: se identificaron 91 artículos por Pubmed, 9 en Lilacs y 120 en Google academic (Anexo 1). Después de leer los 91 títulos se seleccionaron 84 artículos para su posterior evaluación por resumen de los cuales se excluyeron 42 artículos y se seleccionaron 42 para su lectura completa, de estos 13 fueron clasificados como tipo de tecnologías CRISPR-Cas y 29 artículos por usos y ventajas de la edición genética en levaduras por CRISPR/Cas (Anexo 2).

Estudio de edición de genomas por CRISPR-Cas en levaduras de importación industrial y clínica.

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares capaces de colonizar variados ambientes ricos en compuestos de carbono. La investigación biológica de estos microorganismos, se centran en su importancia industrial y clínica. La mayor parte de las levaduras empleadas en la industria son *Hemiascomycetales* del género *Saccharomyces*, son utilizadas en la industria de alimentos, farmacéutica entre otras aplicaciones [45] En el pasado, las infecciones invasivas por hongos eran lo suficientemente raras para considerarse que los esfuerzos en investigación debían dirigirse a estas patologías [46]. Hoy en día, el estudio de hongos patógenos es de gran importancia debido al aumento de casos clínicos y los pocos antifúngicos disponibles, además, que existen debilidades en el espectro, potencia, seguridad y farmacocinética de los fármacos antifúngicos existentes. Varias de las

investigaciones sobre el estudio de estos patógenos se centran en la patogenicidad, virulencia, diferenciación de las células fúngicas de las células de hospederos mamíferas, esto por su gran similitud entre el genomas, vías metabólicas y de señalización, entre otras [47]. En la presente revisión describimos dos especies de levaduras de importancia clínica, *Candida sp* y *Cryptococcus neoformans*, además, de especies de importancia industrial como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe*.

Levaduras de importancia clínica

Candida: es un género de levaduras que causa candidemia en pacientes inmunocomprometidos; esta infección oportunista tiene una incidencia a nivel mundial de alrededor de 700,000 casos por año [48]. Aunque el género cuenta con alrededor de 20 especies patógenas humanas, el sistema CRISPR-Cas9 a la fecha ha sido utilizado en tan solo tres especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. En un estudio en *C. albicans* mutaron el gen ADE2 (gen que codifica la fosforibosilaminoimidazol carboxilasa) implicado en virulencia, en donde encontraron que la escisión dirigida por CRISPR puede ocurrir lejos de los sitios de recombinación en *C. albicans*, la escisión interna en una región de codificación se puede utilizar para crear una eliminación completa del gen., y además encontraron que los mutantes homocigotos generados por CRISPR pueden surgir a través de eventos de conversión de genes entre alelos, un resultado que enfatiza la necesidad de validación de fenotipos mutantes con este sistema [49].

El sistema CRISPR-Cas9 fue usado para para modificar los genes ADE2, MET15 y SOK2, de *C. glabrata* ubicados en distintos cromosomas y lo compararon con un método tradicional de edición genética (utilizando un cassette SAT1). Evidenciaron que el sistema CRISPR, tiene una eficiencia 3 veces mayor a la del método tradicional, además evidenciaron que la eficiencia de CRISPR varía según el gen diana, debido que la eficiencia fue mayor para MET15 en comparación de ADE2. Además, que la eficiencia del sistema vario en el mismo gen dependiendo de la secuencia sgRNA utilizada [50].

La mutación de dos genes que codifica para una aspartil proteasa anclada a GPI involucrada en el proceso de infección de *C. glabrata* y el gen serina/treonina quinasa se desarrollaron en el sistema CRISPR-Cas9, además se implementó en el modelo de *D. melanogaster*. Se evidenció que las mutantes fueron menos virulentas que las cepas WT, concluyendo así que estos dos genes deben participar, directa o indirectamente, en el proceso de infección de *C. glabrata in vivo*. CRISPR-Cas9 es una herramienta útil para evaluar el papel potencial de los genes candidatos en la infectividad de *C. glabrata* en modelos de infección. Lograron aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga en *C. glabrata* y evidenciando que la frecuencia de recombinación variaba al cambiar el número de pares de bases utilizados en el sgRNA [51].

El desarrollo de modificaciones en el sistema CRISPR-Cas9 es frecuente, estas modificaciones dependen en gran medida de las características genotípicas conocidas del microorganismo. En *C. parapsilosis* se desarrolló un sistema de edición que consistía en un solo paso de transformación, expresando el gen CAS9 solo cuando el plásmido estaba presente, además esta modificación permite eliminar fácilmente las cepas transformadas. Es el primer sistema aplicado en *C. parapsilosis* utilizando como marcador la resistencia a la nourseotricina en el cual editaron los genes (*URA3* y *ADE2*) mediante transformación consecutiva con dos plásmidos que expresan diferentes sgRNAs para aumentar la eficiencia de la edición génica. Ese sistema de edición/eliminación de genes pudo usarse fácilmente y podría aplicarse para generar un gran número de knockouts genéticos [52]

Cryptococcus neoformans: la criptococosis es una micosis oportunista, adquirida por la inhalación de propágulos fúngicos presentes en el ambiente; es una infección potencialmente fatal que afecta los pulmones y el sistema nervioso central (SNC), tanto en personas inmunosuprimidas, como inmunocompetentes [53]. La infección es causada por dos especies, a saber: 1) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotipo A), var. *neoformans* (serotipo D) y un híbrido correspondiente al serotipo AD y 2) *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C). Estas especies presentan diferencias fenotípicas, genotípicas y epidemiológicas, así como en su distribución geográfica, además, es una micosis que presenta tropismo por el SNC causando meningitis, se

han descrito diferentes factores de virulencia implicados en la patogenicidad como el tamaño capsular y la producción de melanina [54]. Por lo anterior mencionado diversas investigaciones se han centrado en el establecimiento del sistema CRISPR-Cas9 para realizar la eliminación selectiva de genes y la complementación de genes para estudios de virulencia y patogenicidad en *Cryptococcus neoformans*.

Esta levadura presenta una baja frecuencia de recombinación homóloga, especialmente para las cepas de serotipo D [55], lo cual ha obstaculizado los estudios de genética molecular. En el 2016 Arras S, y colaboradores evaluaron el uso de CRISPR Clase 2 para el estudio de la patogenicidad en *Cryptococcus neoformans*. Inicialmente expresaron un derivado del *Streptococcus pyogenes* nucleasa Cas9 en *C. neoformans* y demostraron que no tiene efecto en el crecimiento, además, evaluaron la producción de factores de virulencia en un modelo murino. Probaron CAS9 en combinación con múltiples ARN de guía de autoescisión dirigidos al gen *ADE2* que codifica la fosforribosilaminoamidazol carboxilasa, lo que reveló que la funcionalidad de CRISPR en *C. neoformans* depende de que el constructo CAS9 se integre de manera estable en el genoma, mientras que la expresión transitoria del ARN guía es suficiente para aumentar las tasas de recombinación homóloga. Además, la presencia de la nucleasa CRISPR no influye en la virulencia en un modelo murino, demostraron con éxito que este sistema es compatible con los estudios de patogenicidad en *C. neoformans* [56].

Cuando el sistema CRISPR-Cas9 persiste en las células huésped, pueden producirse efectos fuera del objetivo y citotoxicidad de Cas9, lo que podría bloquear la manipulación genética realizada. Este sistema es un método poderoso para realizar mutagénesis dirigida en organismos que presentan bajas frecuencias de recombinación y para estudios de genómica funcional. Wang Y., y colaboradores informaron de un método para eliminar de forma espontánea el sistema CRISPR-Cas9 sin afectar su robusta función de edición. Expresaron el ARN guía único bajo el conductor de un promotor U6 endógeno y la endonucleasa Cas9 optimizada en codón humano con un promotor *ACT1*. Este sistema genero de manera eficiente la alteración génica a través de la reparación dirigida por homología por electroporación en la levadura, se demostró la eliminación espontánea del sistema a

través de una disposición cis de expresión CRISPR-Cas9, lo que permite la validación de funciones genéticas mediante complementación posterior y tiene el potencial de minimizar los efectos fuera del objetivo [57].

La transformación biolística en *C. neoformans*, es una herramienta utilizada para la edición del genoma donde el ADN introducido se hereda de forma estable, la eficiencia de transformación y la tasa de integración homóloga (aproximadamente 1–10%) son bajas, una herramienta útil que aumenta la tasa de transformación y de integración en la edición de genomas de esta levadura fue el desarrollo de Transient CRISPR (repetición palindrómica corta agrupada regularmente interplazada) -Cas9 junto con el sistema de electroporación (TRACE), se integró eficiente en el genoma debido a las roturas de doble cadena creadas en sitios específicos por el sistema CRISPR-Cas9 y la alta eficiencia de transformación de la electroporación. Este sistema puede eliminar eficazmente múltiples genes en una única transformación. Los ADN introducidos pueden insertarse en un sitio genético designado sin ninguna secuencia homóloga, lo que abre muchas otras aplicaciones [58]. CRISPR puede ser empleado como una herramienta para la interrupción de genes de alta eficiencia en *C. neoformans*, es un sistema útil para comprender este organismo y su patogenicidad.

Levaduras de importancia industrial en procesos biotecnológicos

Saccharomyces cerevisiae: es la levadura más utilizada en procesos industriales, seguida por *S. bayanus* y *S. pastorianus*. Además, es la levadura mejor estudiada tanto en sus características fisiológicas como genéticas, incluso fue la primera célula Eucariota en ser secuenciada [59]. En la industria se ha implementado la edición de su genoma para optimizar procesos, edición de genes para cepas específicas, entre otras aplicaciones. Se han realizado estudios utilizaron la tecnología CRISPR-Cas9 para reducir el carbamato de etilo (EC), un carcinógeno potencial, que se forma durante el proceso de fermentación del etanol en esta levadura, realizando un “knock out” del gen CAR1 implicado en el proceso de síntesis de EC, sin dejar genes marcadores de antibióticos o cualquier secuencia residual en las cercanías del gen CAR1. Para realizar la inactivación del gen, introdujeron una mutación sin sentido reemplazando el codón de inicio de glicina (Gln) por un codón de parada (TAA) por recombinación homóloga y diseñaron otro experimento realizando el knock out

tradicional por NHEJ eliminado 1002 pb del gen. Para lograr el objetivo utilizaron dos plásmidos uno que contenía el sistema CRISPR y otro que contenía el sgRNA como se muestra en la figura 3. Evidenciaron que la inactivación mediada por CRISPR-Cas9 del gen CAR1 condujo a una reducción significativa de la actividad específica de la arginasa, urea y EC. Al comparar el fenotipo de las mutantes con cepas tipo silvestre no observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de la levadura en el cultivo, ni en el porcentaje de consumo de glucosa y producción de etanol, lo que evidencia que la mutación no afectó el rendimiento industrial de la producción y por lo contrario si redujo en un 60% los niveles de EC en el cultivo [60].

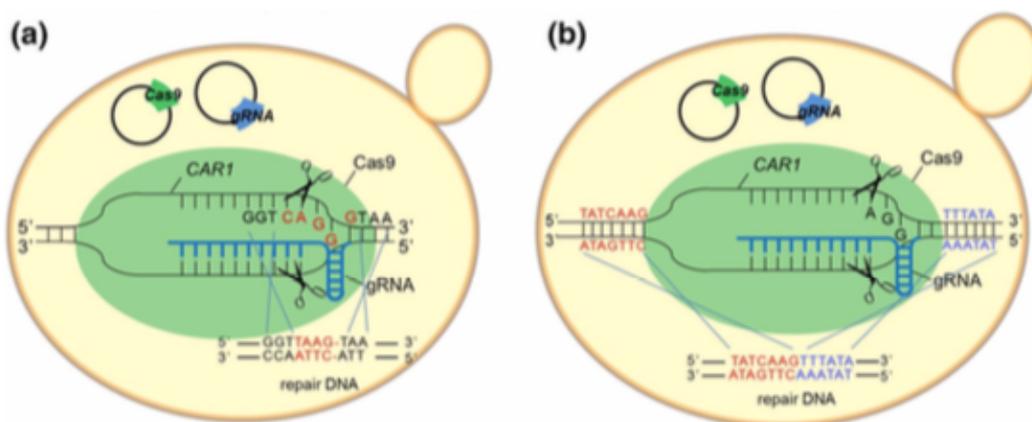


figura 7 : diseño experimental de la tecnología CRISPR-Cas9 para reducir el carbamato de etilo (EC) en *S. cerevisiae* a) cambio del codón B) elimina pb. (Chin YW, Kang WK et al. 2016)

En los últimos años se han generado nuevos diseños de CRISPR, en *S. cerevisiae*. Dashko S y colaboradores en el 2018, implementaron una nueva familia de endonucleasas programables por CRISPR-Cas clase II. Usando la endonucleasa Cpf1 constitutivamente expresado de *Francisella novicida* (Fn Cpf1), puede mediar la escisión de ADN guiada por ARN en loci genómicos específicos. Al evaluar esta nucleasa, evidenciaron que esta no es tóxica para la levadura y no interfiere en el crecimiento en el medio de cultivo. Determinaron que la secuencia PAM que reconoce esta endonucleasa es TTN y que Fn Cpf1 es capaz de realizar una edición dirigida guiado por un crRNA y a su vez realizar mutaciones puntuales en el gen ADE2 insertando un codón de parada. Fn Cpf1 mostro una eficiencia de hasta el 100% para la reparación de recombinación de ADN [61].

Un método novedoso para la edición del genoma por CRISPR-Cas9 en *S. cerevisiae*, consiste en introducir un sitio de corte en una ubicación genómica específica, seguida de la integración de una secuencia editada en la misma ubicación de una manera sin cicatrices. Editaron secuencias del promotor GAL1 y GAL80, lograron sobre-expresar ambos genes en la levadura, evidenciaron que la producción de agrosa era proporcional a la fluorescencia emitida por el marcador, para lograr ese método tuvieron que insertar de forma sintética la secuencia PAM en la región cercana al promotor para lograr que el sistema CRISPR identificará el sitio en el cual se debía insertar para estimular el promotor y sobre-expresar el gen [62]. También se han desarrollado protocolos que producen integraciones sin cicatrices y sin marcadores de ADN utilizando un sgRNA de 20pb inmediatamente seguido a la secuencia PAM (NGG) [63].

Se han generado sistema multiplex CRISPR-Cas9 para la ingeniería del genoma de hasta 5 loci genómicos diferentes en un solo paso de transformación en la levadura, con esta metodología Jakočinas T y colaboradores en el 2015, lograron sobreexpresar 41 veces el mevalonato, importante metabolito intermediario en la biosíntesis de colesterol en cepas mutadas, lo que hace de esta metodología una herramienta útil para aumentar la producción de una molécula industrial [64]. Se han generado bibliotecas de plásmidos de integración de alta eficiencia para ser implementados en el sistema CRISPR-Cas9. El instituto DOE Joint BioEnergy, Emeryville de California emplearon un conjunto de herramientas cloning-free que permite la modificación genética rápida y fácil de cepas en *S. cerevisiae*, utilizando diferentes plásmidos, los cuales presentaron una eficiencia por encima del 95% en 23 loci genómico caracterizados. El kit de herramientas descrito en este trabajo proporciona un enfoque rápido para examinar múltiples contextos de expresión génica simultáneamente [65].

En Dinamarca desarrollaron kit con vectores EasyClone-MarkerFree utilizando el sistema CRISPR/Cas9 que facilita la integración de casetes de expresión linealizados en loci genómicos definidos, expresando el (sgRNA) a partir de un conjunto de vectores auxiliares de ARNG. Usando ese conjunto de vectores de ingeniería genómica, se obtienen inserciones simples con 90-100% y triples con 60-

70% de eficiencia de focalización. El kit de herramientas vectoriales EasyClone-MarkerFree se puede usar para introducir simultáneamente uno a tres casetes de integración en el genoma de *S. cerevisiae*, sin el uso de marcadores de selección. Los casetes de integración se pueden construir para la sobreexpresión de uno o dos genes por sitio de integración; en ese estudio, integraron con éxito hasta seis genes en una sola transformación con una eficiencia de focalización del 60 al 70% [66].

Utilizando el sistema CRISPR-Cas9 integraron por recombinación homóloga (HR) los genes *XYL1*, *XYL2* y *XYL3* en los loci *PHO13* y *ALD6* (implicado en la producción de acetato), para lograr la sobreexpresión de genes heterólogos y la anulación de genes endógenos simultáneamente en cepas de *S. cerevisiae*. Para la construcción de la cepa mutada, utilizaron los sgRNA dirigidos a *PHO13* y *ALD6* de forma secuencial para reemplazar los genes; en el estudio sugieren que el proceso de integración secuencial se puede acortar en una transformación con un plásmido que lleva ambos sgRNA juntos a través de métodos múltiplex. Todo lo anterior se realizó para poder generar a nivel industrial cepas que tengan mayores niveles de fermentación y que no representen un peligro de salud pública, puesto que no presentan genes de resistencia insertados en el proceso de mutación [67].

S. cerevisiae, se ha utilizado en procesos biotecnológicos, un ejemplo de esto es la evaluación a la resistencia a un antiparasitario contra el paludismo de la familia espiroindolonas, el inconveniente con este medicamento está en que vuelve menos activo por mutaciones en una ATPasa tipo P del parásito. Para comprobar este patrón en el parásito y que las mutaciones en la enzima ATPasa tipo P confiere resistencia, utilizaron el modelo celular de *S. cerevisiae*, mutaron (utilizando CRISPR) el gen que codifica una ATPasa de tipo P (*ScPMA1* y *ScYRR1*) y expusieron las células mutadas a espiroindolonas (KAE609) para ver si estas adquirían la resistencia. Estos experimentos confirmaron que las mutaciones en *ScPMA1* y *ScYRR1* causan un aumento de 2.5 veces en la resistencia a KAE609, sin embargo, *ScYRR1* no parece ser el objetivo principal de KAE609. Por otro lado se demostró que la mutación de gen *ScPMA1* es la molécula diana de a KAE609 y su mutación está relacionada directamente con la resistencia [68].

CRISPR en *S. cerevisiae*, es un sistema muy útil a nivel industrial, se ha implementado para la edición del genoma con diversos enfoques, se han inhibido la expresión de genes que producen una molécula nociva, también esta técnica se utilizó en la sobreexpresión de genes y en bioingeniería. *S. cerevisiae*, cuyo genoma y funcionalidad de sus genes son muy conocidos, es un modelo celular, muy útil para el diseño de nuevas metodologías con variante de CRISPR que permiten la mutación multiplex y abren la posibilidad de generar cepas más rentables para la industria en corto tiempo y de manera muy sencilla.

Yarrowia lipolytica: esta levadura se ha convertido en un modelo interesante debido a su capacidad de almacenar grandes concentraciones de lípidos en su interior y su capacidad de secreción de proteínas para producir valiosos productos bioquímicos a nivel industrial [69]. Los trabajos en esta levadura se han centrado en sus características fisiológicas, metabólicas y genómicas, específicamente en la secreción de proteínas, para la utilización de sustratos hidrófobos y la biogénesis del peroxisoma, además, del estudio de moléculas implicadas en el dimorfismo, en entender la complejidad mitocondrial, la biogénesis del cuerpo lipídico y la homeostasis lipídica, se han realizado avances en el estudio de biología molecular logrando explicar el empalme de intrones y el empalme alternativo, entre otras [70].

Al ser un microorganismo completamente secuenciado y con grandes ventajas industriales, se han realizado estudios en los cuales se ha implementado la técnica de edición genética CRISPR para mutar genes específicos que mejoren la producción de ciertos compuestos en esta levadura. En China, implementaron el sistema CRISPR para editar el genoma con un único plásmido (pCAS1yl o pCAS2yl) por recombinación homóloga (RH) y recombinación no homóloga (NHEJ) para los genes TRP1 y PEX10, [71]. Evidenciaron que el mayor porcentaje de eficiencia del sistema se dio en el día 4 de crecimiento, lograron una edición multigénica doble y triple simultánea con el plásmido pCAS1yl por NHEJ. El sistema con el plásmido pCASyl fue exitoso en diferentes cepas de *Y. Lipolytica*, por lo tanto, este sistema fue más eficiente que los métodos tradicionales de edición del genoma y facilitó la biología sintética, la ingeniería metabólica y los estudios genómicos funcionales.

Zhang J lai y Col en el 2018, diseñaron un nuevo sistema de CRISPR llamado sistema CRISPRi multiplex para la represión de múltiples genes en un solo paso, en *Y. Lipolytica*, utilizando el método de ensamblaje Golden-brick que puede ensamblar diferentes partes sin el procedimiento de PCR inicial, lo que evita la introducción de nuevos errores en el proceso de amplificación por PCR y solo necesita dos sitios de enzima de restricción para que todas las partes se pueden ensamblar en un solo paso [72]. Para el diseño del sistema CRISPRi se utilizaron cuatro represores: Cpf1 desactivado con DNasa (dCpf1) de *Francisella novicida*, Cas9 desactivado (dCas9) de *Streptococcus pyogenes* y dos proteínas de fusión (dCpf1 - KRAB y dCas9 - KRAB); además se diseñaron diez gRNAs que se unieron a diferentes regiones del gen GFP (proteína fluorescente verde)y los resultados indicaron que no había una clara correlación entre la eficiencia de represión y los sitios objetivo, sin importar qué proteína represora se usó. Con el fin de producir rápidamente una fuerte represión de genes, se desarrolló una estrategia de sgRNA multiplex en la cual se logró una alta eficiencia de represión 85% (dCpf1) y 92% (dCas9) en un corto tiempo al hacer tres gRNA diferentes hacia el gen GFP simultáneamente.

En este mismo estudio, reprimieron genes plurales *vioA*, *vioB* y *vio* simultáneamente y el gen *vioE* utilizando el sistema multiplex CRISPRi en *Y. lipolytica*. Para probar la eficacia del sistema construyeron una cepa VioABE que contenía la ruta del ácido protodeoxi-violaceínico (PVA, pigmento derivado del triptófano y su contenido se puede cuantificar mediante absorbancia) utilizaron los vectores dCpf1-Multi y dCas9-Multi, con sgRNA simple y con sgRNA multiplex (3 sgRNA). La transformación se evaluó por PVA en la que se evidencio que al reprimir solo *vioE*, la absorbancia se redujo a 60% y 40% con la proteína dCpf1 y la proteína dCas9 respectivamente, el sistema CRISPRi multiplex fue factible para implementar la represión de múltiples genes.

Se han generado diversos protocolos para la edición genética de *Y. lipolytica*. En el 2016b Jassop y col., crearon una nueva herramienta genética EasyCloneYALI, que permite la construcción de cepas modificadas genéticamente con alta eficiencia de forma simplificada en *Y. lipolytica* a través de la tecnología CRISPR/Cas9. Modula la expresión génica con la integración de casetes en sitios intergénicos IntC_2, IntC_3, IntD_1, IntE_1 e IntE_3, además, no se afectó el crecimiento de la levadura [73]. El

protocolo con EasyCloneYALI, permite la eliminación de dos genes o la integración de dos casetes de expresión génica simultáneamente. En la Universidad de California desarrollaron una herramienta basada en CRISPR-Cas9 para la integración de varios genes sin marcadores en el genoma de *Y. lipolytica*. Para esto utilizaron dos plásmidos, uno con el sistema CRISPR-Cas9 y otro con la secuencia del DNA donante, para realizar la recombinación homóloga de varios genes, el marcador de selección utilizado fue LEU2. Para esto identificaron cuatro regiones del genoma (AXP, XPR2, A08 y D17) en los cuales los niveles de expresión del cassette fueran más altos y así garantizar la recombinación [74]. En este estudio lograron realizar con alta eficiencia la modificación de varios genes y muestran el sistema CRISPR-Cas9 como una herramienta útil y práctica para la modificación de genomas.

En la levadura *Y. Lipolytica* se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas9 para realizar de forma eficiente alteración del genoma, en la mayoría de los artículos se utilizó como marcador de selección LEU2, y se utilizó la técnica de PCR para confirmar la alteración del genoma; los protocolos de transformación en los cuatro artículos fueron muy similares entre sí y son una herramienta muy útil para evaluar la eficiencia de estos protocolos en otras especies de levadura.

Schizosaccharomyces pombe: Es una levadura altamente estudiada a nivel industrial y clínico junto con *S. cerevisiae*, la cual es ampliamente utilizada a nivel industrial para la fermentación de bebidas alcohólicas como el Ron, el tequila, y bebidas artesanales como el cachaça en Brasil [75]. También es una levadura utilizada en la industria de vinos debido a su capacidad para utilizar ácido málico y reducir así la acidez del vino [76]. Además, es un microorganismo totalmente secuenciado lo que permite realizar estudios biotecnológicos.

Jacobs JZ y cola., en el 2018 en la Universidad Estatal de Nueva Jersey desarrollaron un sistema CRISPR-Cas9 que permitió la edición del genoma en *S. pombe*. Editaron el gen *ade6*, al ser mutado causa la acumulación de un precursor de color rojo en medios con bajo contenido de adenina para poder identificar las células transformadas, concluyeron que la mutagénesis CRISPR-Cas9 logra una eficiencia casi completa y elimina la necesidad de marcadores seleccionables. El

único vector que expresa Cas9 y el sgRNA está marcado con *ura4*, lo que permite la eliminación del plásmido mediante la selección con ácido 5-fluoroorótico y permite la mutagénesis posterior de objetivos adicionales. El casete construido *rrk1*/Hammerhead Ribozyme, expresado en Pol II, es útil en otras situaciones en las que se necesita la expresión de RNA y secuencias arbitrarias definidas, como ARNip o lincRNA, y representa una ventaja sobre los sistemas de ARN Pol III. Los métodos y reactivos presentados aquí resultan útiles para la investigación genómica en *S. pombe* al permitir la edición rápida y específica del genoma [77].

En el 2018, describieron el sistema CRISPR-Cas9 para introducir rápidamente deleciones en las regiones de DNA que sirven como marcadores auxotróficos en *S. pombe*, estas fueron: *leu1-D0*, *his3-D0* y *lys9-D0*, *ura4-D18*. Este sistema consta de un vector de expresión de gRNA Cas9 y un par de plásmidos de ADN donante para cada eliminación. Además, reorganizaron los componentes esenciales en la serie de plásmidos pREP de uso común y ensamblaron el gen marcador auxotrófico correspondiente en estos plásmidos [78].

El desarrollo de un procedimiento cloning-free que utiliza la reparación de DNA en células de *S. pombe* de fisión para ensamblar dos fragmentos de ADN lineales se realizó en el 2018 en Beijing, utilizaron un plásmido circular que codifica Cas9 y un inserto de sgRNA amplificado por PCR, ambos fragmentos contienen solo una porción del marcador *ura4* o *bsdMX*, de modo que solo el plásmido ensamblado correctamente puede conferir prototrofia (capacidad de crecer en medio mínimo) de uracilo o resistencia a la blasticidina en las levaduras transformadas [79]. En este estudio mostraron que el CRISPR-Cas9 basado en la reparación y libre de clonación permite la mutación puntual rápida y eficiente, el marcaje N-terminal endógeno y la eliminación de la secuencia genómica en la levadura de fisión.

En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* en los últimos años se han desarrollado múltiples estudios que diseñan diversos protocolos y diferentes alternativas de mutación a través del sistema CRISPR/Cas9 que facilitan la mutación del genoma y mejoran su eficiencia para poder desarrollar estudios genómicos que expliquen la función de diferentes genes y a la vez puedan ser utilizados para otros modelos celulares.

Sistema CRISPR-Cas en Levaduras atípicas

En la actualidad hay descritas, aproximadamente, 900 especies de levaduras, las investigaciones están centradas a un número limitado de estas especies, nosotros quisimos recopilar algunos estudios realizados en levaduras que son poco frecuentes como es el caso de *Pichia pastoris* y *Saccharomyces pastorianus*, específicamente en la edición genómica por CRISPR-Cas, reflejamos una visión general de los últimos avances en edición genómica en estas levaduras, sus principales aplicaciones y los principales retos.

Pichia pastoris: reclasificada como *Komagataella pastoris*, utilizada hoy en día ampliamente en el campo biotecnológico para la producción de proteínas heterólogas [80]. En Austria demostraron la integración de casetes con DNA donante sin marcadores en la cepa de tipo salvaje de *P. pastoris*, que permite nuevas estrategias de ingeniería. Probaron tres variantes de Cas9 (Sp Cas9, Pp Cas9, Hs Cas9) disponibles, para ser evaluadas en la cepa *pastorku70* de *P. pastoris*, querían determinar si necesitaría un nivel de expresión diferente. Para la cepa de tipo salvaje solo se incluyó la Hs Cas9 y proporcionaron a los plásmidos de expresión Cas9/gRNA un marcador de resistencia a Geneticin que demostró ser una herramienta versátil para el reciclado de marcadores. La herramienta CRISPR-Cas9 puede aplicarse para modificar las cepas de producción existentes y también abrir el camino para estudios de modificación del genoma completo sin marcadores en *P. pastoris*. Además, se puede implementar para secuencias de replicación autónoma (ARS) en cassettes knockout clásicos para garantizar el mantenimiento del cassette, especialmente en los ciclos celulares en la fase S/G2 donde predomina la HR y, por lo tanto, favorecer su integración [81].

En el 2016 el mismo grupo de investigación de Austria antes mencionado, probaron sistemáticamente más de 90 construcciones que contenían diferentes secuencias de ADN optimizadas con codones de Cas9, varias secuencias de ARNg y promotores de ARN Pol III y ARN Pol II (en combinación con ribozimas) para la expresión de los ARNg con diferentes promotores de ARN Pol II para la expresión de Cas9 y gRNAs, con el fin de identificar las falencias del sistema en *P. pastoris*. Lograron generar un sistema optimizado para este modelo el cual permite alterar genes, introducir

eliminaciones de genes multiplexados y probar la integración dirigida de casetes de ADN homólogos [82].

Saccharomyces pastorianus: es una levadura de importancia industrial, es ampliamente utilizada para la elaboración de cerveza y en los últimos años su interés se ha relacionado con ciertos procesos de glucolisis. En Holanda se diseñó un método basado en la edición del genoma de por CRISPR-Cas9 para la eliminación precisa de los genes (SeATF1 y SeATF2) en *S. pastorianus*. Se combinó el gen cas9 expresado desde un elemento genético móvil en combinación con un casete de expresión de gRNA transmitido por plásmido, la expresión de un gRNA flanqueado con ribozimas Hammerhead y Virus delta Delta que usan el promotor TDH3 dependiente de RNA polimerasa II condujo exitosamente a la eliminación precisa de los cuatro alelos del SeLV6 en la cepa CBS1483, además, la expresión de dos gRNA flanqueados por ribozimas separados por un enlazador de 10pb en una matriz policistrónica condujo exitosamente a la eliminación simultánea de los genes SeATF1 y SeATF2, ubicados en dos cromosomas separados [83].

La recopilación de estos estudios de edición del genoma por CRISPR-Cas en levaduras, permitió consolidar una visión general de los avances de esta tecnología de mostrando versatilidad en edición y enfoques, lo que ha permitido la creación de una colección de cepas CRISPRi para más de 99% de los genes necesarios para el crecimiento fermentativo o respiratorio [84]. Los estudios antes mencionados sobre la edición de genoma en levaduras de interés industrial, biotecnológico o clínico son de gran importancia para entender la biología de células fúngicas en procesos fermentativos importantes para la industria, procesos patogénicos importantes para estudios clínicos o procesos farmacocinéticos. CRISPR-Cas aun es una metodología nueva implementada en levaduras, falta mucho por explorar y aprender.

Desarrollo de diversos enfoques para el uso del sistema CRISPR/Cas

Desde 2012, el sistema CRISPR-Cas se ha utilizado para la edición de genes y su uso se ha ampliado a diferentes especies, en los últimos años se han diseñado metodologías que emplean diferentes sistemas de CRISPR dependiendo de las modificaciones que se quieran realizar en el genoma, aquí recopilamos algunas de las modificaciones de edición de genoma (Tabla 2).

Tabla 2 Nuevas metodologías CRISPR.

Tecnología	Nombre	Función	Referencia
Di-CRISPR	Delta Integración CRISPR/Cas	Integración de rutas bioquímicas en un solo paso, sin marcadores para Cas9, mediante la selección de sitios delta repetidos.	[85]
CasEMBLR		integración genómica multi loci facilitada por Cas9 de partes ensambladas in-vivo.	[86]
CRISPR-AID	Sistema ortogonal, comprende CRISPRa, CRISPRi y CRISPRd	Permite incrementar la activación de un gen para sobre-expresar compuestos metabólicos. Se puede usar para la optimización varios objetivos de ingeniería metabólica y la exploración de las interacciones sinérgicas entre la activación transcripcional, la interferencia transcripcional y la eliminación de genes.	[87]
CRISPR-Cpf1	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas en intervalos regulares con la caspasa Cpf1	Identifica secuencias de DNA y realiza un corte en el DNA sin necesidad de tracrRNA.	[88]
CRISPR-PCS	División de cromosomas mediada por PCR	Mejora la eficiencia de la división de cromosomas casi 200 veces. Permitiendo crear nuevas cepas con rasgos específicos para aplicaciones industriales e investigar la función del genoma.	[89]
dCas9-VPR	Cas9 con el dominio de activación quimérico VPR	Permite realizar una represión transcripcional o una activación transcripcional.	[90]
TAR-CRISPR	Recombinación asociada a la transformación	Permite aislar cualquier región cromosómica grande de genomas por recombinación homóloga, entre células de mamíferos y levaduras como <i>S. cerevisiae</i>	[91]
CRISPRm.	Sistema multiplex CRISPR	Permite realizar edición de múltiples loci simultáneamente	[92]
CRISPRa	Activador	Permite la activación transcripcional	[93]
mCRISTAR	Combina CRISPR Cas9 y TAR	Permite la sustitución multiplexada de promotores en grupos de genes biosintéticos evitando los elementos reguladores de la transcripción, induciendo la expresión génica	[94]
dCas9	Cas9 desactivada	Permite la represión génica en un sitio de represión de alta eficiencia	[95] [96]

De las modificaciones realizadas para CRISPR y su implementación en la edición del genoma en levaduras encontramos que el sistema es muy dinámico, se adapta a casi cualquier diseño experimental y puede ser implementado para cualquier modificación genética que se desee realizar; cada una de estas variantes mejora la eficiencia del sistema y facilita el proceso de edición.

Objetivo 2. Construcción Bioinformática para la construcción de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata*.

Construcción bioinformática de la mutante: Mediante el software casting se seleccionaron 4 secuencias guía sgRNA:

- CACTATACGAAGAGACCGCA (50,97% score)
- TGTGGTGGTAAATTGAAGGA (36,39% score)
- AAATCGCCTTCATCGAACAA (71,44% score)
- CCGGTAGTAATGATATACCG (89.69% score)

De los cuales fueron enviados a síntesis los 2 que presentaron mayor puntuación.

>Gen_CRZ1

```
AACTATTACCGGTAAATTCGCATGGTTACAAGTACGTGACTGACTTCAATCAGCT
AGGGCAATTAATTGG AGGAGATCCATTTGAACTTGACTTCAATGGAGATAACGA
CATTATAAATTCTAATGACTTGAAAGTTGATGCTGAAACGCTACTAAATTCAGAG
AACGTTACCTACAGGCTCCTCAACCCAATAACAATAGTAGTAATAATAATAACG
TTTCGTCACCATCGGGCTCAAATAAGATGCCTACAACCCCAATAATTTCAATTGA
GGAATATGATGATAATAATAAAACTCTAACGATGATGAGTATGCGATTGATATG
GACTCTTCAAATGCTCTCCAAGAGAATAGAGGTTTCCTCGGTATATCATTACTAC
CGGCGGAGGACTCGGACGCAACACATGACGAAATATTACAAGGAAGGAAACAA
AAGCTGAAAAATAGAAGGGTATCTCAAAGTAGTTCCCGTAGGTCTTCTCGATCAT
CCATGCGCAGCTTAACACCTGAAGAAAAAGCCCGTTCATTGAGTTCGAACAGGA
ATAAATTATTGGAAATGGCTGACTTATTACCAAAATCGCCTTCATCGAACAACGG
TTCGAATAAATACTCTAGAAGATCTTCTTCTATGAGGAAAGTGAAGATATTTCC
ATGGATACCAACATATCCGAAAATAACAATACCAACAATAACTGGCACCGATT
ATGTATGTGAAGTTTGTGGGAAAGTTTTCTCTCGACCATATAACCTGAAGTCACA
TTTG AGAACACATACAGATGAAAAGCCATACCAATGCTCTATATGTGGGAAGGC
ATTTGCAAGACAGCACGATAAAAAGAGGCACGAGGATTTGCATACTGGTAAAAA
ACGGTATGTATGTGGTGGTAAATTGAAGGATGGTACTTTTTGGGGGTGTGGTAA
GAAGTTTGCAAGAAGTGTATGCCTTAGGTAGACATTTTAAGACGAGTAGCGGGAG
GAAATGTATCACCCCAC TATACGAAGAGACCGCAAGAGAGAGGAATCTCCCTAG
TATAGACGATACGAATATTCAAGCAACTGAGATGGGTGTTACTTTGGAATAA
```

Los sgRNA que se obtuvieron fueron 4 los cuales se encuentran resaltados en azul en la secuencia del gen para hacer más fácil su visualización en la posición de la secuencia en donde se encuentra; en negro se encuentra la región que codifica para el dominio de dedos de zinc del factor de transcripción.

Una vez se definidos los sgRNA, se seleccionó un vector que permita introducir el sistema en la levadura; para este caso, se utilizara un plásmido que contenga

proteína Cas9, sgRNA y el marcador de selección (fluorescencia) YFP Proteína de fluorescencia amarilla.

En el mapa del plasmido (figura 8) se pueden evidenciar tre marcadores, URA3, AmpR y mVenus, siendo este ultimo el marcador de fluorescencia YFP (yellow fluorescen protein), El marcador AmpR, se utilizara para seleccionas las células de *E.coli* que se van a trasformar para preservar el plasmido y replicarlo en este modelo celula. En morado se evidencia la proteina Cas9 y resaltado en rojo se evidencia la secuencia del sgRNA.

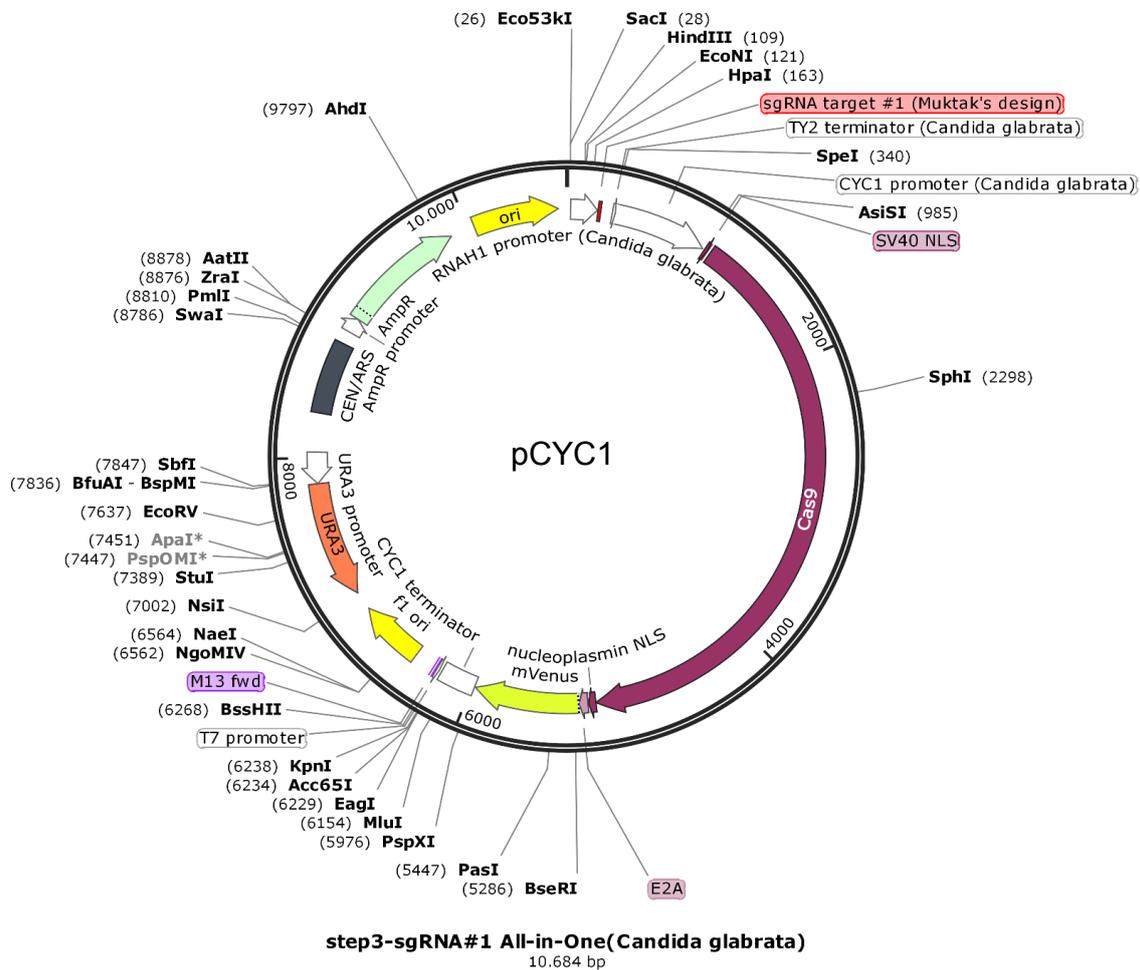


Figura 8 Plasmido pCYC1 para la transformación de *Candida glabrata*

2. Screening de la mutación con PCR:

Se diseñaron dos pares de cebadores utilizando la herramienta informática *Primer desing* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) que permitan amplificar

tamaños distintos de la secuencia del gen CRZ1 y que se solapen entre sí, para lograr evidenciar la mutación que conlleva a un cambio en el tamaño del fragmento.

Amplifica el segmento de 549 pb	Amplifica el segmento 626pb
F- CATCCATGCGCAGCTTAACA	F- AACGTTACCTACAGGCTCC
R- AAGTAACACCCATCTCAGTTGC	R TCTTGCAAATGCCTTCCCAC
Rcomplement GCAACTGAGATGGGTGTTACTT	RComplement GTGGGAAGGCATTTGCAAGA

Objetivo 3. Caracterización fenotípica de mutantes del factor de transcripción CRZ1 en aislamientos de *C. glabrata* resistentes a Caspofungina aisladas de muestras clínicas mediante el sistema CRISPR-Cas9.

Caracterización fenotípica de las levaduras: se determinó susceptibilidad basal de los 4 microorganismos frente a caspofungina se obtuvieron 2 susceptibles PUJ/HUSI 0916-ATCC2001 y 2 resistentes CHU-Nantes 1875 y 1256. Los resultados fueron abalados por la cepa control de *Candida parapsilosis* ATCC22019.

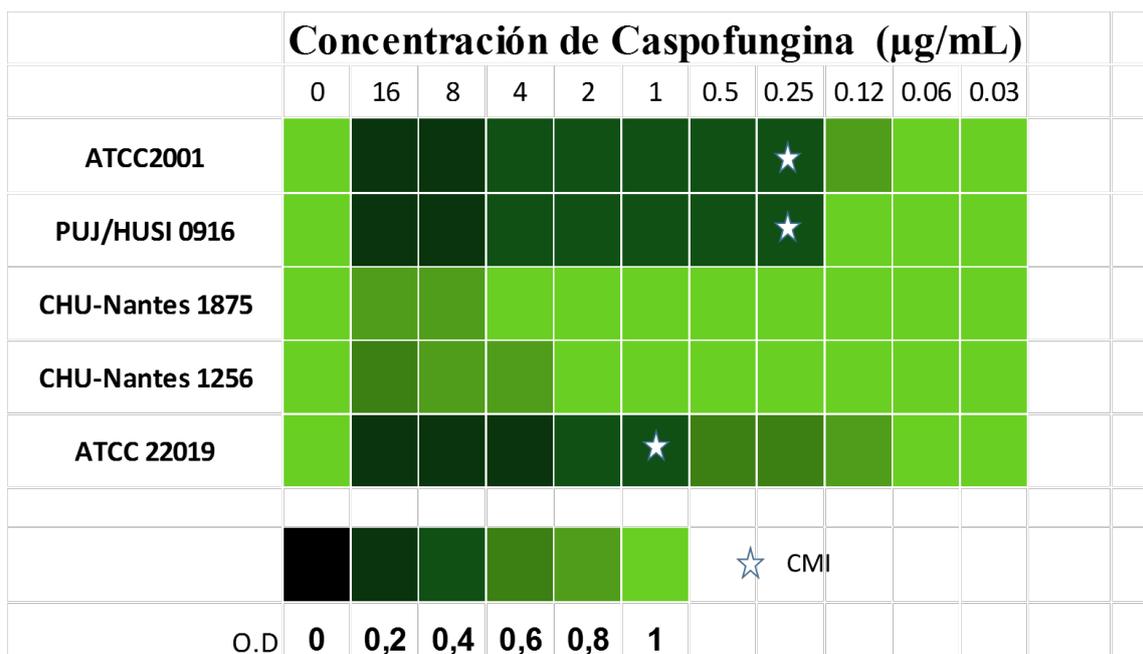


Figura 7 Concentración mínima inhibitoria de *Candida glabrata* frente a caspofungina.

Determinación de patogenicidad basal

Los cuatro microorganismos evaluados presentaron patogenicidad similar generando totalidad de la mortalidad de las larvas entre el día 4 y 6 post infección.

Sobrevivencia de *G. mellonella* después de infección con *C. glabrata* 1.5×10^9 Cel /mm³

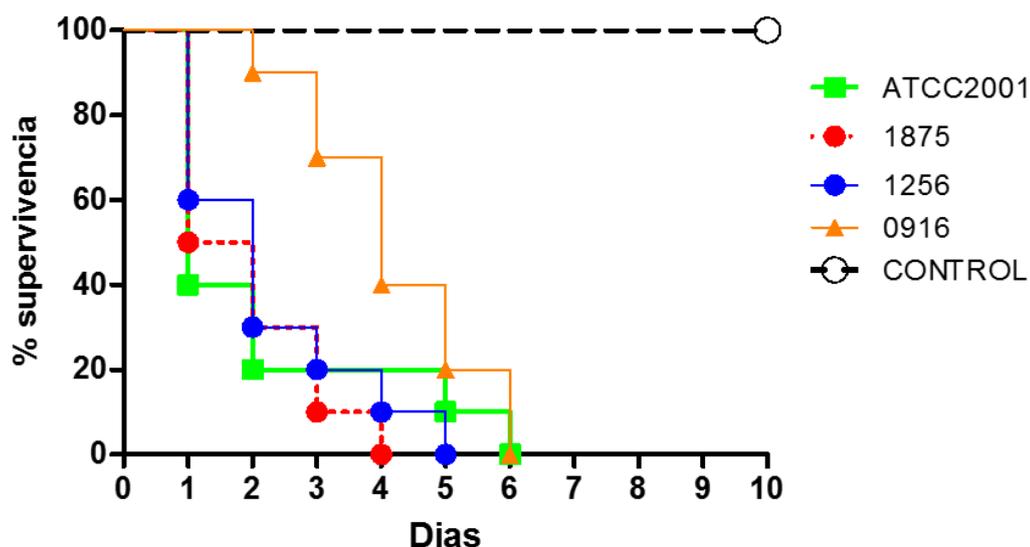


Figura 10 Porcentaje de supervivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Candida glabrata* 1.5×10^9 Cel/mm³.

Este objetivo no se pudo lograr debido a que la casa comercial ABM, no cumplió con los tiempos de entrega establecidos previamente, por lo tanto, no tuvimos a tiempo el plásmido ni los reactivos necesarios para realizar la transformación de la levadura. Al no poder obtener las mutantes no se pudo evidenciar si con la mutación se retornaba de un fenotipo sensible y se disminuía la patogénica; esta hipótesis surgió de un estudio previo realizado en el Grupo de Investigación del laboratorio de Miosis Humanas y Proteómica en el cual, al utilizar inhibidores de la vía Cam/Cal (Fk 506, ciclosporina) la CMI de las cepas estudiadas se reducía considerablemente en *Candida albicans*.

10. CONCLUSIONES:

El sistema CRISPR, es uno de los sistemas de edición genética más diversos debido a las múltiples variantes descritas de este sistema, que se encuentra disponible hoy en día en el mercado, permite realizar edición en diferentes organismos siempre y cuando se realice un buen diseño informático de las secuencias sgRNA que se van a utilizar y del tipo de caspasa que se va a implementar para lograr el objetivo del estudio, bien sea eliminar un gen, realizar mutaciones puntuales, sobre expresar algún gen, o hacer lo anteriormente mencionado en varios genes simultáneamente. Por otro lado los nuevos Kits generados para este sistema, tiene ciertas limitaciones como es el caso del Kit Easy-Clone-MarkerFree diseñado en Dinamarca en el cual obtuvieron inserciones simples y triples, insertando en el genoma de la levadura varios casetes de integración simultáneamente, ensayado en solo dos cepas, la cepa CEN-PK(aploide) y la cepa industrial de etanol (diploide), lo que hace que estos resultados probablemente no sean comparables con otras cepas debido a la diversidad genética que poseen las levaduras en la naturaleza y en el laboratorio por las diversas interacciones epigenéticas a las que se ven expuestas.

Una de las mayores preocupaciones en la utilización de CRISPR-Cas es el manejo de las cepas modificadas, en la mayoría de los casos los autores utilizan puntos de chequeo en el cual pueden dilucidar los cambios efectuados y estos mismo en algunos casos indican cuando se ha perdido las modificaciones realizadas. Sin embargo, en algunas investigaciones no es claro el manejo de estas cepas, si bien CRISPR/CAS es una tecnología que ha proporcionado muchos beneficios en la edición del genoma debido a que es altamente específica y eficiente comparado con la edición por TALENS y SINES; su rápida evolución deja poco tiempo al análisis ético y de bioseguridad, puesto que los organismos editados por esta tecnología podrían perturbar ecosistemas si no se tiene una adecuada eliminación.

Como se evidencio en cada uno de los artículos, CRISPR es una herramienta muy utilizada para mejorar los procesos industriales, bien sea para aumentar la producción o para eliminar algún compuesto toxico que se genera durante el proceso de producción de alguna molécula o producto industrial en el que se necesitan levaduras para sintetizarlos o fermentarlos como lo es en el caso de las bebidas alcohólica, además, en el área clínica esta herramienta ha facilitado el estudio de

varios genes implicados en vías de señalización que le confieren a la levadura, bien sea resistencia al tratamiento farmacológico, o le confiera patogenicidad en el hospedero. Permitiendo así generar alternativas tanto para la industria y en clínica a problemas que afectan al ser humano

11. PERSPECTIVAS

Lograr culminar el proyecto, con mutaciones suficientes para obtener una delección del gen CRZ1 y poder evaluar las características fenotípicas de las cepas mutadas, para confirmar la hipótesis, de que mutando el factor de transcripción CRZ1, las cepas retornan de un fenotipo sensible a uno resistente y evidenciar si hay un cambio en la patogenicidad de estas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, et al. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006 May;44:5. doi:10.1128/JCM.44.5.1681-1685.2006
2. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, et al. Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:5. doi:10.1086/655683
3. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31:1. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001
4. Ahmad KM, Kokošar J, Guo X, Gu Z, Ishchuk OP, Piškur J. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2014;14:4. doi:10.1111/1567-1364.12145
5. Timmermans B, De Las Peñas A, Castaño I, Van Dijck P. Adhesins in *Candida glabrata*. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2018 20;4:2. doi:10.3390/jof4020060
6. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. *Genes.* 2018 Sep 19;9:9. doi:10.3390/genes9090461
7. Nerys-Junior A, Braga-Dias LP, Pezzuto P, et al. Comparison of the editing patterns and editing efficiencies of TALEN and CRISPR-Cas9 when targeting the human CCR5 gene. *Genet Mol Biol.* 2018;41:1. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2017-0065
8. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, et al. Hidden killers: Human fungal infections. Vol. 4, *Science Translational Medicine.* American Association for the Advancement of Science; 2012. p. 165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
9. Denning DW, Bromley MJ. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science.* 2015 27;347:6229. doi:10.1126/science.aaa6097
10. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007 1;20:1. doi:10.1128/CMR.00029-06
11. Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2015 Jun 1;15:4. doi:10.1093/femsyr/fov025
12. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis.* 2012 15;55:10. doi:10.1093/cid/cis697
13. Bourgeois N, Laurens C, Bertout S, et al. Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida glabrata* by the Etest®, CLSI, and EUCAST methods, and detection of FKS1 and FKS2 mutations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 13;33:7. doi:10.1007/s10096-014-2069-z
14. Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, et al. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:12. doi:10.1128/AAC.00813-12
15. Zhao Y, Du J, Zhao G, et al. Activation of calcineurin is mainly responsible for the calcium sensitivity of gene deletion mutations in the genome of budding yeast. *Genomics.* 2013;101:1. doi:10.1016/J.YGENO.2012.09.005
16. Rosenwald AG, Arora G, Ferrandino R, et al. Identification of Genes in *Candida glabrata* Conferring Altered Responses to Caspofungin, a Cell Wall Synthesis Inhibitor. *G3.* 2016; 6:9. doi:10.1534/g3.116.032490
17. Kwon-Chung kj, Bennett JE. Medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992 Dec;34:6. doi:10.1590/S0036-46651992000600018
18. Bourgeois N, Laurens C, Bertout S, Balard Y, Krasteva D, Rispaill P, et al. Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida glabrata* by the Etest®, CLSI, and EUCAST methods, and detection of FKS1 and FKS2 mutations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*

- 2014 Jul;33:7. doi:10.1007/s10096-014-2069-z
19. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 2003;362:9390. doi:10.1016/S0140-6736(03)14472-8
 20. *Candida glabrata* CBS138 Genome Snapshot/Overview.
 21. Cuenca estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quim*. 2010;23:4.
 22. Cortés JA, Russi JA. Antimicrobianos.
 23. Azanza Perea JR. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. *Rev Iberoam Micol*. 2016;33:3. doi:10.1016/j.riam.2016.02.004
 24. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75:2. doi:10.1128/MMBR.00045-10
 25. Bizerra FC, Melo ASA, Katchburian E, et al. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1. doi:10.1128/AAC.00633-10
 26. Kołaczowska A, Kołaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:6. doi:10.1093/jac/dkv445
 27. Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, et al. Discovery of a Ca²⁺-and calmodulin-dependent protein phosphatase. *FEBS Lett*. 1982;137:1. doi:10.1016/0014-5793(82)80319-0
 28. Thewes S. Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryot Cell*. 2014;13:6. doi:10.1128/EC.00038-14
 29. Cyertt MS, Thorner J. Regulatory Subunit (CNB1 Gene Product) of Yeast Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Phosphoprotein Phosphatases Is Required for Adaptation to Pheromone. *Mol Cell Biol*. 1992
 30. Tisi R, Rigamonti M, Groppi S, Belotti F. Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. *AIMS Mol Sci*. 2016;3:4. doi:10.3934/molsci.2016.4.505
 31. Karababa M, Valentino E, Pardini G, et al. CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2006;59:5. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05037.x
 32. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471:7340. doi:10.1038/nature09886
 33. Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-). 2012;337:6096. doi:10.1126/science.1138140
 34. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9:6. doi:10.1038/nrmicro2577
 35. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157:6. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010
 36. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014 Feb 27;156:5. doi:10.1016/j.cell.2014.02.001
 37. Jennifer A. Doudna, Emmanuelle Charpentier. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 2014;346:6213. doi:10.1126/science.1192272
 38. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:1. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607
 39. Weninger A, Killinger M, Vogl T. Key Methods for Synthetic Biology: Genome Engineering and DNA Assembly. In: *Synthetic Biology*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 101–41. doi:10.1007/978-3-319-22708-5_3
 40. Barnes DE. Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol*.

- 2001;11:12. doi:10.1016/S0960-9822(01)00279-2
41. Enkler L, Richer D, Marchand AL, et al. Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. 2016;6. doi:10.1038/srep35766
 42. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, et al. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. 2009;5:7. doi:10.1371/journal.ppat.1000532
 43. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. 2008.
 44. M27 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2017.
 45. Ghaemmaghami S, Huh W-K, Bower K, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003;425:6959. doi:10.1038/nature02046
 46. Zhang H-Z, Gan L-L, Wang H, Zhou C-H. New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents. *Mini Rev Med Chem*. 2017;17:2.
 47. Roque L, Molpeceres J, Reis C, et al. Past, Recent Progresses and Future Perspectives of Nanotechnology Applied to Antifungal Agents. *Curr Drug Metab*. 2017;
 48. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J fungi*. 2017;3:4. doi:10.3390/jof3040057
 49. Min K, Ichikawa Y, Woolford CA, Mitchell AP. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. 2016; doi:10.1126/sciadv.1500248
 50. Cen Y, Timmermans B, Souffriau B, et al. Comparison of genome engineering using the CRISPR-Cas9 system in *C. glabrata* wild-type and lig4 strains. *Fungal Genet Biol*. 2017;107. doi:10.1016/j.fgb.2017.08.004
 51. Enkler L, Richer D, Marchand AL, et al. Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep35766
 52. Lombardi L, Turner SA, Zhao F, Butler G. Gene editing in clinical isolates of *Candida parapsilosis* using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*. 2017; doi:10.1038/s41598-017-08500-1
 53. Mesquita Da Costa M, Teixeira FM, Schalcher TR, et al. Cryptococcosis, A Risk for Immunocompromised and Immunocompetent Individuals. *Open Epidemiol J*. 2013;6. doi:10.2174/1874297101306010009
 54. Cogliati M, Fett JP, Liao D, Taylor-Robinson A. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Artic ID*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/675213
 55. Davidson RC, Cruz MC, Sia RAL, Allen B, Alspaugh JA, Heitman J. Gene Disruption by Biolistic Transformation in Serotype D Strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*. 2000; 29:1. doi:10.1006/FGBI.1999.1180
 56. Arras SDM, Chua SMH, Wizrah MSI, et al. Targeted Genome Editing via CRISPR in the Pathogen *Cryptococcus neoformans*. 2016; doi:10.1371/journal.pone.0164322
 57. Wang Y, Wei D, Zhu X, Pan J, et al. A "suicide" CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. *Nat Publ Gr*. 2016; doi:10.1038/srep31145
 58. Fan Y, Lin X. Multiple Applications of a Transient CRISPR-Cas9 Coupled with Electroporation (TRACE) System in the *Cryptococcus neoformans* 2 Species Complex 3 Running title: No more biolistic transformation in *Cryptococcus*. 2018;706. doi:10.1534/genetics.117.300656
 59. A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B, et al. Life with 6000 Genes. *Science* (80-). 1995;269:5223. doi:10.1126/science.7542800
 60. Chin YW, Kang WK, Jang HW, et al. CAR1 deletion by CRISPR/Cas9 reduces formation of ethyl carbamate from ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43:11. doi:10.1007/s10295-016-1831-x
 61. Dashko S, den Ridder M, Wijsman M, et al. FnCpf1: a novel and efficient genome editing tool for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:2. doi:10.1093/nar/gkx1007

62. Elison GL, Song R, Acar M. A Precise Genome Editing Method Reveals Insights into the Activity of Eukaryotic Promoters. *Cell Rep.* 2017;18:1. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.014
63. Ryan OW, Poddar S, Cate JHD. Crispr–cas9 genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016:6. doi:10.1101/pdb.prot086827
64. Jakočinas T, Bonde I, Herrgård M, Harrison SJ, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng.* 2015;28. doi:10.1016/j.ymben.2015.01.008
65. Reider Apel A, d’Espaux L, Wehrs M, Sachs D, et al. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:1. doi:10.1093/nar/gkw1023
66. EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. 2016; doi:10.1002/biot.201600147
67. Tsai CS, Kong II, Lesmana A, Million G, Zhang GC, Kim SR, et al. Rapid and marker-free refactoring of xylose-fermenting yeast strains with Cas9/CRISPR. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112:11. doi:10.1002/bit.25632
68. Goldgof GM, Durrant JD, Otilie S, Vigil E, Allen KE, Gunawan F, et al. Comparative chemical genomics reveal that the spiroindolone antimalarial KAE609 (Cipargamin) is a P-type ATPase inhibitor OPEN. 2016 [cited 2018 Nov 9]; doi:10.1038/srep27806
69. Coelho MAZ, Amaral PFF, Belo I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse [Internet]. [cited 2018 Nov 10].
70. Nicaud J-M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2018 Nov 10];29:10. doi:10.1002/yea.2921
71. Gao S, Tong Y, Wen Z, Zhu L, Ge M, Chen D, et al. Multiplex gene editing of the *Yarrowia lipolytica* genome using the CRISPR-Cas9 system. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016;43:8. doi:10.1007/s10295-016-1789-8
72. Zhang J lai, Peng YZ, Liu D, Liu H, Cao YX, Li BZ, et al. Gene repression via multiplex gRNA strategy in *Y. lipolytica*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2018;17:1. doi:10.1186/s12934-018-0909-8
73. Dam MI, Dahlin J. EasyCloneYALI : CRISPR / Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast b Present a Present address : ALK-Abelló Nordic A / S , Bøge Allé 6-8 , DK-2970 Hørsholm , .
74. Schwartz C, Shabbir-Hussain M, Frogue K, Blenner M, Wheeldon I. Standardized Markerless Gene Integration for Pathway Engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol.* 2017;6:3. doi:10.1021/acssynbio.6b00285
75. Gomes FCO, Pataro C, Guerra JB, Neves MJ, Corrêa SR, Moreira ESA, et al. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Can J Microbiol* [Internet]. 2002 May [cited 2018 Nov 16];48:5.
76. Volschenk H, van Vuuren HJJ, Viljoen–Bloom M. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr Genet* [Internet]. 2003 Sep 12 [cited 2018 Nov 16];43:6. doi:10.1007/s00294-003-0411-6
77. Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, Zaratiegui M. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. [cited 2018 Nov 9]; doi:10.1038/ncomms6344
78. Zhao Y, Boeke JD. Construction of Designer Selectable Marker Deletions with a CRISPR-Cas9 Toolbox in *Schizosaccharomyces pombe* and New Design of Common Entry Vectors. 2018 [cited 2018 Nov 9]; doi:10.1534/g3.117.300363
79. Zhang X-R, He J-B, Wang Y-Z, Du L-L. A Cloning-Free Method for CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Fission Yeast. 2018 [cited 2018 Nov 9]; doi:10.1534/g3.118.200164
80. Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2009 Nov 17 [cited 2018 Nov 16];36:11. doi:10.1007/s10295-009-0638-4
81. Weninger A, Fischer JE, Raschmanová H, Kniely C, Vogl T, Glieder A. Expanding the

- CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers. *J Cell Biochem*. 2018;119:4. doi:10.1002/jcb.26474
82. Weninger A, Hatzl AM, Schmid C, Vogl T, Glieder A. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol [Internet]*. 2016;235. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.03.027
 83. Gorter De Vries AR, De Groot PA, Van Den Broek M, Daran J-MG. CRISPR-Cas9 mediated gene deletions in lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Microb Cell Fact [Internet]*. 2017 [cited 2018 Nov 9];16. doi:10.1186/s12934-017-0835-1
 84. Smith JD, Schlecht U, Xu W, Suresh S, Horecka J, Proctor MJ, et al. A method for high-throughput production of sequence-verified DNA libraries and strain collections. *Mol Syst Biol [Internet]*. 2017 [cited 2018 Nov 9];13. doi:10.15252/msb.20167233
 85. Shi S, Liang Y, Zhang MM, Ang EL, Zhao H. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng [Internet]*. 2016 Jan 1 [cited 2018 Nov 17];33. doi:10.1016/J.YMBEN.2015.10.011
 86. Jakočiūnas T, Jensen ED, Jensen MK, Keasling JD. Assembly and Multiplex Genome Integration of Metabolic Pathways in Yeast Using CasEMBLR. In Humana Press, New York, NY; 2018 [cited 2018 Nov 17]. p. 185–201. doi:10.1007/978-1-4939-7295-1_12
 87. Lian J, HamediRad M, Hu S, Zhao H. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system. *Nat Commun [Internet]*. 2017 Dec 22 [cited 2018 Nov 17];8:1. doi:10.1038/s41467-017-01695-x
 88. Li Z-H, Liu M, Wang F-Q, Wei D-Z. Cpf1-assisted efficient genomic integration of in vivo assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett [Internet]*. 2018 Aug 24 [cited 2018 Nov 17];40:8. doi:10.1007/s10529-018-2574-8
 89. Sasano Y, Nagasawa K, Kaboli S, Sugiyama M, Harashima S. CRISPR-PCS: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep [Internet]*. 2016 Sep 17 [cited 2018 Nov 17];6:1. doi:10.1038/srep30278
 90. Deaner M, Mejia J, Alper HS. Enabling Graded and Large-Scale Multiplex of Desired Genes Using a Dual-Mode dCas9 Activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol [Internet]*. 2017 Oct 20 [cited 2018 Nov 17];6:10. doi:10.1021/acssynbio.7b00163
 91. Lee NCO, Larionov V, Kouprina N. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2015 Apr 30 [cited 2018 Nov 17];43:8. doi:10.1093/nar/gkv112
 92. Ryan OW, Cate JHD. Multiplex Engineering of Industrial Yeast Genomes Using CRISPRm. In: *Methods in enzymology [Internet]*. 2014 [cited 2018 Nov 17]. p. 473–89. doi:10.1016/B978-0-12-801185-0.00023-4
 93. Schwartz C, Curtis N, Löbs A-K, Wheeldon I. Multiplexed CRISPR Activation of Cryptic Sugar Metabolism Enables *Yarrowia Lipolytica* Growth on Cellobiose. *Biotechnol J [Internet]*. 2018 Sep [cited 2018 Nov 17];13:9. doi:10.1002/biot.201700584
 94. Kang H-S, Charlop-Powers Z, Brady SF. Multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-Mediated Promoter Engineering of Natural Product Biosynthetic Gene Clusters in Yeast. *ACS Synth Biol [Internet]*. 2016 Sep 16 [cited 2018 Nov 17];5:9. doi:10.1021/acssynbio.6b00080
 95. Deaner M, Alper HS. Systematic testing of enzyme perturbation sensitivities via graded dCas9 modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng [Internet]*. 2017 Mar [cited 2018 Nov 17];40. doi:10.1016/j.ymben.2017.01.012
 96. Jensen ED, Ferreira R, Jakočiūnas T, Arsovska D, Zhang J, Ding L, et al. Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies. *Microb Cell Fact [Internet]*. 2017 Dec 15 [cited 2018 Nov 17];16:1. doi:10.1186/s12934-017-0664-2

5. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo 1: Estrategias de búsquedas electrónicas

Tipo de fuente	Fuente	Dirección electrónica
Bases de datos generales	Pubmed	https://www.nlm.nih.gov
	Lilacs	http://pesquisa.bvsalud.org/portal/advanced/?lang=es
	Google académico	https://scholar.google.es/schhp?hl=es&as_sdt=0,5

Pubmed

Reporte de búsqueda electrónica No. 1	
Tipo de búsqueda	Nueva
Base de datos	MEDLINE
Plataforma	Pubmed
Fecha de búsqueda	2 de Octubre 2018
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción.
Restricciones de lenguaje	Inglés y español
Otros límites	Ninguno.
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. Search ("CRISPR-Cas Systems"[Mesh]) 2. Search "Yeasts"[Mesh]

3. Search "CRISPR-Associated Proteins"[Mesh]
4. Search "Cryptococcus/pharmacology"[Mesh]
5. Search ("Yeasts"[Mesh]) AND ("CRISPR-Cas Systems"[Mesh])
6. Search ("Yeasts"[Mesh]) AND "CRISPR-Associated Proteins"[Mesh]
7. Search ("environment"[Mesh])
8. Search ("plants"[Mesh])
9. Search ("bacterial"[Mesh])
10. Search ("virus"[Mesh])
11. Search ("parasities"[Mesh])
12. 1 OR 3 AND 2 NOT 7-11

Número de referencias identificadas n=91

LILACS

Reporte de búsqueda electrónica No. 2	
Tipo de búsqueda	Nueva
Base de datos	Lilacs
Plataforma	Lilacs
Fecha de búsqueda	2 de Octubre 2018
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción.
Restricciones de lenguaje	Inglés y español
Otros límites	Ninguno.
Estrategia de búsqueda (resultados)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Search CRISPR-Cas 2. Search YEAST 3. Search ("environment"[Mesh]) 4. Search ("plants"[Mesh]) 5. Search ("bacterial"[Mesh]) 6. Search ("virus"[Mesh]) 7. Search ("parasities"[Mesh]) 8. 1 AND 2 NOT 3-7
Número de referencias identificadas n=9	

Google academic

Reporte de búsqueda electrónica No. 3	
Tipo de búsqueda	Nueva
Base de datos	Google academic
Plataforma	Google
Fecha de búsqueda	2 de Octubre 2018
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción.
Restricciones de lenguaje	Inglés y español
Otros límites	Ninguno.
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. Search CRISPR-Cas 2. Search YEAST 3. Search ("environment"[Mesh]) 4. Search ("plants"[Mesh]) 5. Search ("bacterial"[Mesh]) 6. Search ("virus"[Mesh]) 7. Search ("parasities"[Mesh]) 8. 1 AND 2 NOT 3-7
Número de referencias identificadas n=120	

Anexo 2: Diagrama PRISMA de artículos seleccionados para la revisión

