



APLICAÇÕES DO CRISPR-CAS NA CLIVAGEM DE GENES DE RESISTÊNCIA PARA RESENSIBILIZAÇÃO BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Maria Eduarda Gomes Ceolin¹, Rodrigo Staggemeier^{2,A}

¹Acadêmica da Faculdade de Biomedicina da universidade Feevale – Novo Hamburgo – Rio Grande do Sul – Brasil

²Professor dos Cursos de Biomedicina e Farmácia na Universidade Feevale – Novo Hamburgo – Rio Grande Do Sul – Brasil

RESUMO

A transmissão horizontal de genes de resistência entre bactérias e a disseminação de cepas multirresistentes ultrapassam progressivamente os limites de eficácia das terapias antimicrobianas. Considerado um problema urgente e global, a constante evolução dos mecanismos adaptativos bacterianos evidencia a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas. Nesse contexto, o sistema CRISPR-Cas e sua capacidade de edição gênica têm se mostrado um método promissor para restaurar a sensibilidade bacteriana a antibióticos e controlar cepas multirresistentes. Diante disso, este estudo analisa os mecanismos e as possibilidades de utilização do CRISPR para a clivagem de sequências associadas a mecanismos de resistência presentes em plasmídeos e no cromossomo, além de sistematizar as evidências experimentais recentes sobre seu uso. A metodologia consistiu em uma revisão qualitativa narrativa de literatura, com coleta de dados nas bases Web of Science, PubMed e EMBASE, incluindo estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* publicados entre 2015-2025. A pesquisa indica que o uso do sistema CRISPR, majoritariamente associado à nuclease Cas9, apresenta resultados promissores na clivagem de genes de resistência, resultando na restauração parcial ou total da sensibilidade na maioria dos estudos analisados. Entretanto, esta tecnologia ainda enfrenta desafios relevantes, como limitações relacionadas aos mecanismos de transporte, como capacidade de armazenamento, restrições de hospedeiros e baixa eficiência de conjugação. Além disso, a elevada variabilidade genética dos genes de resistência dificulta o desenho de sgRNAs eficientes e enfatiza a necessidade de avanços na área, apesar do elevado potencial terapêutico do sistema CRISPR-Cas.

Palavras-chave: CRISPR-Cas. Bactérias. Genes de resistência.

ABSTRACT

The horizontal transmission of resistance genes between bacteria and the spread of multidrug-resistant strains are progressively exceeding the effectiveness limits of antimicrobial therapies. Considered an urgent and global problem, the constant evolution of bacteria's adaptive mechanisms emphasizes the need for the development of new antimicrobials. In this context, the CRISPR-Cas system and its gene editing capacity have emerged as a promising strategy to restore bacterial sensitivity to antibiotics by selectively cleaving genetic sequences associated with resistance mechanisms located in plasmids and chromosomes. Therefore,

^AAtor Correspondente: Rodrigo Staggemeier – rodrigostaggemeier@feevale.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0144-3861>

this study analyzes the mechanisms and possibilities of CRISPR to restore bacterial susceptibility and control multidrug-resistant and systematizes recent experimental evidence regarding its use. The methodology consisted of a qualitative narrative literature review, with data collection from the Web of Science, PubMed, and EMBASE databases, including in vitro and in vivo experimental studies published between 2015 and 2025. The results indicate that the use of the CRISPR-based approaches, mainly associated with the Cas9 nuclease, demonstrate promising outcomes in the targeted cleavage of resistance genes, resulting in partial or complete resensitization in the majority of the analyzed studies. However, this technology presents several challenges related to transport mechanisms, such as limitations in capacity, host range restrictions, and low efficiency of conjugation. Furthermore, the high number of mutations in resistance genes hinders the design of efficient sgRNA and highlights the need for further advances in the area, despite the great therapeutic potential of the CRISPR-Cas system.

Keywords: CRISPR-Cas. Bacteria. Resistance genes.

INTRODUÇÃO

A relação entre bactérias e humanos percorre um amplo espectro, variando desde interações comensais até a presença de espécies patogênicas responsáveis por doenças ao longo da história [1]. Entretanto, menos de um século após a introdução dos antibióticos na prática clínica, observa-se uma redução significativa na eficácia dessas terapias frente à rápida adaptação bacteriana, que frequentemente precedem e superam o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, a resistência antimicrobiana (RA), especialmente associada ao surgimento de bactérias multirresistentes (BMR) configura-se com um dos principais desafios globais em saúde pública [2].

No Brasil são registrados aproximadamente 221 mil óbitos por infecções bacterianas, dos quais 62,4% estão relacionados à RA e, quase, 15% são causados diretamente por bactérias resistentes [3]. Em resposta a esse cenário, em 2024, a Organização Mundial da Saúde (OMS) [4] divulgou a versão atualizada da "Bacterial Priority Pathogens List (BPPL)", incluindo cinco das seis bactérias as pertencentes ao grupo "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*) [4]. Nela, as bactérias são divididas em risco crítico, alto e médio para a saúde pública de acordo com diversos fatores, incluindo a capacidade de limitar terapias disponíveis a alternativas mais tóxicas, onerosas e, por vezes, menos eficazes [4,5].

Segundo a OMS, fatores como a seleção inadequada, o fácil acesso a antibióticos e a automedicação, são alguns determinantes importantes na emergência da resistência bacteriana [1]. Além disso, o desenvolvimento de RA também é beneficiado pela disseminação de BMR entre diferentes populações, incluindo ciclos de compartilhamento entre humanos, animais e ambiente [6].

Esses fatores impõem pressões seletivas contínuas que favorecem a sobrevivência e disseminação de cepas mais resistentes, promovendo a transferência de mecanismos de resistência entre bactérias e gerações bacterianas [1,7,8]. Como consequência, invariavelmente e independente do mecanismo envolvido, o resultado não se limita à redução da eficácia dos antibióticos, mas inclui também a emergência de BMR, altos níveis de morbimortalidade e o aumento da complexidade e refinamento

dos mecanismos de resistência [1].

Esses mecanismos possuem 3 diferentes origens: intrínseca, adaptativa e adquirida [9]. Algumas bactérias apresentam de forma intrínseca habilidades biológicas próprias que limitam a ação de antimicrobianos [8]. Outras, possuem a capacidade de se adaptar e sobreviver a condições de estresse através de rápidas alterações genéticas e comportamentais em resposta a estímulos ambientais, resultando na formação de biofilme por exemplo [9,10]. Por sua vez, bactérias que não possuem esse tipo de vantagem evolutiva, a possibilidade de adquirir RA é viabilizada a partir de mutações cromossômicas aleatórias; transferência de plasmídeos e alterações cromossômicas por transferência horizontal de genes (HGT); ou incorporação de material genético de bacteriófagos ou DNA livre, que podem resultar em alterações benéficas e conferir a capacidade de evitar a ação dos antibióticos [7,9,11].

Em contrapartida, em resposta a pressão imposta por esses materiais genéticos invasores, algumas espécies desenvolveram sistemas de defesa que controlam e protegem contra a ação nociva e lisante de bacteriófagos e plasmídeos [9]. O sistema CRISPR-Cas, atua como um sistema imune adaptativo, promovendo a degradação de sequências genéticas invasoras e limitando a HGT [9,12].

Posteriormente, Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna demonstraram o potencial do sistema CRISPR-Cas, tornando-o uma importante ferramenta nas mais diversas pesquisas e metodologias envolvendo a modificação específica de genes nos mais diversos microrganismos, incluindo nas próprias bactérias [13]. Dessa forma, através do reconhecimento e clivagem de sequências responsáveis por mecanismos de defesa em diferentes espécies, o CRISPR se transformou em um método promissor para restaurar a sensibilidade de bactérias a antibióticos. [14,15].

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo compreender o sistema CRISPR-Cas como uma ferramenta de edição gênica avaliando seu potencial na inativação seletiva de genes de resistência localizados em plasmídeos ou cromossomo, *in vitro* e *in vivo*, visando reestabelecer a sensibilidade bacteriana. Adicionalmente, busca-se investigar possíveis vetores, suas vantagens e limitações, em relação a sua capacidade de realizar o transporte do sistema e suas sequências-alvo até microrganismos bacterianos específicos. Finalizando com uma avaliação de

questões éticas e perspectivas futuras do uso do CRISPR-Cas na ressensibilização das bactérias resistentes e controle de cepas multirresistentes.

METODOLOGIA

O presente estudo caracteriza-se como uma revisão da literatura, com abordagem qualitativa narrativa, com caráter exploratório e descritivo, baseada na análise crítica de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* sobre o uso do sistema CRISPR-Cas na modificação de genes de resistência bacteriana com o intuito de restaurar sua sensibilidade a antibióticos e controlar cepas multirresistentes. A busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados: Web Of Science, Pub Med e EMBASE. Foram utilizados descritores em inglês e português, incluindo: “CRISPR-Cas”, “resistência antimicrobiana”, “bactérias multirresistentes”, “sensibilizar”, “bactérias resistentes”, “ética”, “saúde pública”, “perspectivas futuras” e “limitações” combinadas com conectivo “AND”.

A partir da identificação dos artigos encontrados, esses foram submetidos à uma análise crítica. Foram incluídos estudos que atenderam aos seguintes critérios: (i) investigam o uso do sistema CRISPR no controle, eliminação ou modulação de genes de resistência bacteriana, tendo como finalidade a ressensibilização de bactérias resistentes a antibióticos; (ii) artigos publicados entre 2015-2025; (iii) disponibilidade na íntegra; e (iv) escritos em português ou inglês. Assim, foram descartados capítulos de livro, editoriais e cartas ao editor; artigos que não apresentavam uma abordagem pertinente ao tema; estudos cuja metodologia utilize mecanismo de edição gênica distintos do sistema CRISPR e suas variantes; experimentos que tenham como alvo genes que não expressem resistência a antibióticos; artigos que utilizem do sistema CRISPR-Cas apenas para finalidade de detecção; estudos que sejam realizados em outros microrganismos (alternativos a bactérias); e materiais duplicados ou incompletos.

A busca inicial resultou em 10.894 artigos, aos quais foram aplicados filtros automáticos de período e idioma, permanecendo 8.062 artigos. Após a remoção de 1.240 duplicatas, foi iniciada a etapa de leitura de título, onde foram excluídos 6.378 estudos. Após a leitura dos resumos, 286 artigos foram eliminados por não atenderem aos critérios de inclusão. Assim, 158 artigos foram selecionados para leitura na íntegra e desses, 44 estudos foram excluídos por não abordarem diretamente a aplicação da tecnologia CRISPR na resistência bacteriana ou não apresentarem dados experimentais relevantes. Foram adicionados 2 artigos técnicos, 1 página da Web e 3 legislações. Totalizando, no final, em 52 materiais incluídos na revisão bibliográfica. Para a construção da fundamentação teórica, foram utilizados artigos clássicos, livros, estudos publicados a partir do ano de 1987, em limitação rígida de período. Resultando na inclusão de 20 materiais, como objetivo contextualizar e definir os principais conceitos relacionados ao tema.

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

(CRISPR) é o termo utilizado para descrever sequências de DNA (17-84 pb) compostas por fragmentos não-repetitivos de origem viral ou plasmidial, denominados de “*spacers*” (32-28 pb), intercalados por pequenas repetições palindrômicas (23-50 pb) [12,16–19]. Esses elementos estão associados a um conjunto de genes codificadores de proteínas *Cas* (*CRISPR-associated genes*) e são antecidos por uma sequência líder não codificadora rica em adeninas (A) e timinas (T) [12,20].

O termo CRISPR foi utilizado pela primeira vez por Jansen *et al.* (2002), embora essas sequências já tivessem sido previamente identificadas em 1987 por Ishino *et al.*, no gene *iap* — responsável pela conversão de isoenzimas de fosfatase alcalina — localizado no cromossomo de uma bactéria *Escherichia coli* [12,13]. Seu papel como mecanismo imune adaptativo e hereditário em procariontes foi demonstrado por Barrangou *et al.* (2007) [17], que caracteriza “No geral, procariontes parecem ter desenvolvido um sistema “imunológico” com base em ácidos nucleicos, em que a especificidade é ditada pelos fragmentos contidos no CRISPR, enquanto a resistência é fornecida pelo maquinário enzimático da *Cas*” (tradução própria). Posteriormente, essa teoria foi aprofundada e discutida por Marraffini e Sontheimer (2010) [12].

A presença de um sistema CRISPR-Cas ativo confere, essencialmente, resistência bacteriana contra plasmídeos e bacteriófagos. Levando a diminuição da patogenicidade através do bloqueio da HGT mediante a clivagem de material genético exógeno [9,12,17,20]. Ainda não existe consenso sobre a relação do sistema CRISPR e a virulência. Alguns autores acreditam que, dependendo do ambiente onde estão inseridas, bactérias se beneficiariam com a sua desativação. Entretanto, outras fontes apontam que a presença desse sistema em diferentes espécies bacterianas pode também contribuir com a redução da resposta inflamatória em células invadidas (em *P. aeruginosa*) e estimula positivamente a formação de biofilme (em *Salmonella enterica*) [9].

Atualmente, a tecnologia CRISPR-Cas é dividida em duas classes de acordo com seus genes marcadores, a organização do locus, semelhança de suas sequências, características fisiológicas e bioquímicas, mecanismos moleculares, entre outros parâmetros [21,22]. A classe 1 engloba Tipo I, III e IV, com 16 subtipos e possuem módulos efetores multiproteicos que atuam em conjunto, com capacidade de reconhecer sequências alvo mais longas e induzir grandes mutações de deleção [13,22–24]. A classe 2, contém Tipo II, V e VI, com 17 subtipos e possuem módulos efetores de proteína única, que trabalham de maneira independente. Esses módulos são responsáveis pela identificação e clivagem de sequências-alvo, incluindo, por exemplo, a enzima *Cas9* (tipo II), utilizada amplamente na edição de genomas [13,21,22,24].

A aquisição de novas sequências invasoras é mediada principalmente pelas proteínas *Cas1* e *Cas2*, com participação eventual da *Cas4*. A identificação de sequências invasoras é realizada através de características presentes nos DNAs-alvo (*protospacers*), um exemplo sendo a presença de PAM (*protospacer adjacent motif*), uma sequência de 2-5 pares de bases presente em material genético exógeno. Ela precede a

sequência alvo, que será futuramente agregado ao locus CRISPR, e auxilia a enzima Cas a distinguir entre DNA invasor (com PAM) e DNA “próprio” (sem PAM) [25–27].

A regulação positiva dos genes *Cas*, do locus CRISPR e aquisição de novos *spacers*, acontece quando a bactéria está mais suscetível à invasão de fagos, por exemplo durante uma diminuição de fontes de carbono (p. ex. glicose) ou aumento da densidade populacional [12,28]. Esses estímulos externos ativam a transdução de sinal de reguladores, como a proteína AMP cíclica (cAMP) em bactérias *Thermus thermophilus* ou uma versão mutante da protease ClpP em *Streptococcus mutans*, que permitem uma resposta imune à alvos previamente reconhecidos e estão relacionado diretamente com o aumento da possibilidade de sobrevivência e evolução de bactérias e arqueas [12,19].

Diferentemente de outros mecanismos de defesa, como RecBCD, o sistema CRISPR-Cas apresenta uma memória genética, ampliada pela incorporação de novos *spacers* derivados de genomas invasores [12,19]. Esse processo contribui para a diversidade genética entre cepas bacterianas e possibilita aplicações em tipagem molecular e identificação de patógenos [13].

CRISPR-Cas COMO ANTIMICROBIANO

Atualmente, os tratamentos disponíveis contra infecções

causadas por BMR tornaram-se limitados e ineficientes, causando declínio em prognósticos positivos. Ademais, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas apresenta diversos impasses que vão além do descobrimento da sua capacidade terapêutica e nociva para bactérias. Os elevados custos dos experimentos clínicos, os potenciais efeitos colaterais, toxicidade e capacidade de alteração da microbiota simbiótica humana são barreiras à inovação farmacêutica, que já enfrenta a pressão do tempo e da rápida evolução de cepas bacterianas multirresistentes [9].

Diante dessa problemática, a tecnologia de edição gênica do CRISPR-Cas tornou-se uma solução promissora no combate às BMRs. Sua capacidade de reconhecer e clivar específicas sequências de DNA ou RNA invasor pode ser adaptada para cumprir a função de antimicrobiano [9,15,21,29].

Dentre suas possibilidades, o CRISPR-Cas pode ser aplicado no reconhecimento e clivagem de genes não essenciais carregadores de mecanismos de resistência, no cromossomo ou em plasmídeos bacterianos, resultando na ressensibilização pela incapacidade de expressar os genes de resistência ou pela eliminação de cepas resistentes específicas, sem afetar cepas sensíveis [30]. Esse processo torna-se possível devido à presença de dois componentes essenciais do sistema CRISPR-Cas: uma proteína *Cas* (*Cas9*, *dCas9*, *Cas13a* ou *Cas14*) e um RNA guia, expressados tanto no seu modelo natural, quanto no seu modelo de laboratório (Figura 1) [22,31].

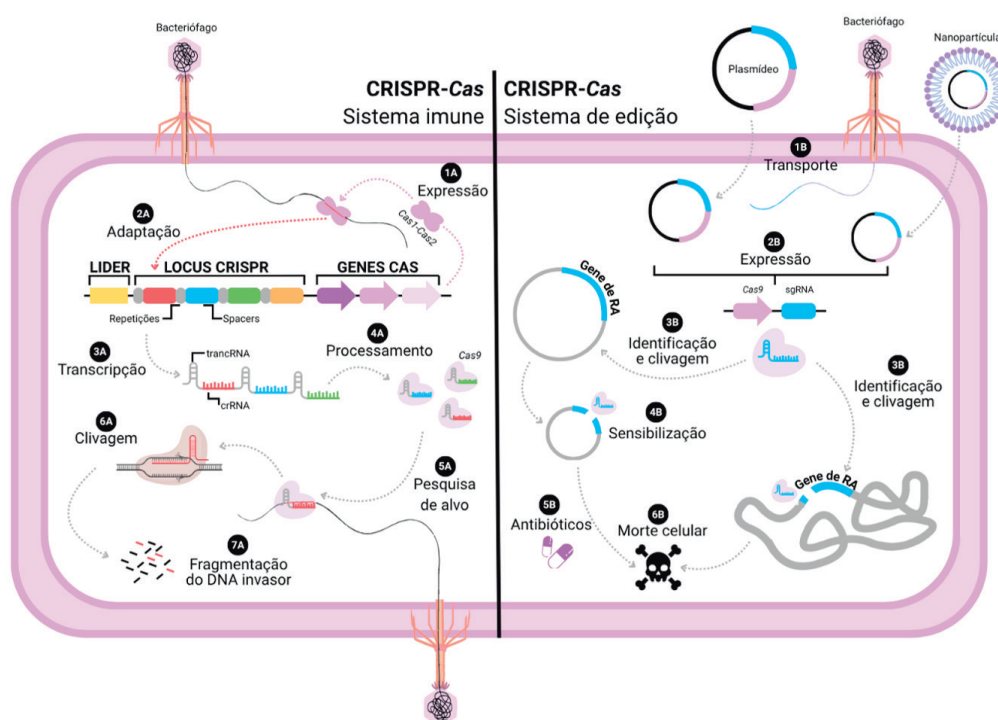


Figura 1. Comparativo entre o sistema CRISPR-Cas9 em seu modelo natural de imunidade bacteriana contra fagos (esquerda) e seu modelo criado em laboratório para edição de DNA utilizado para clivagem de genes de resistência em plasmídeos e no cromossomo (direita). No modelo de sistema

imune, a expressão do conjunto Cas1-Cas2 (1A) identifica DNA invasor, cliva e adiciona parte (protospacer) no locus CRISPR (2A). A transcrição dos protospacers (3A), transformados em RNA guias, e enzima Cas9 (4A) identifica (5A) e cliva o DNA invasor (6A), levando a sua inativação e fragmentação (7A). No modelo de

sistema de edição, o CRISPR-Cas e o RNA guia é entregue por transportadores como: plasmídeos, bacteriófagos e nanopartículas (1B). As sequências da enzima Cas9 e sgRNA são expressos (2B) e realizam a identificação e clivagem do gene de resistência alvo em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano (3B). Em plasmídeos, a clivagem resulta em sensibilização (4B) que com terapia antimicrobiana combinada (5B) leva a morte das bactérias resistentes (6B). No cromossomo, a clivagem é citotóxica e resulta diretamente na morte celular (6B). Ilustração autoral baseada em ilustrações dos artigos “CRISPR-Cas-Based Antimicrobials: Design, Challenges, and Bacterial Mechanisms of Resistance” de Mayorga-Ramos et al. (2023); “CRISPR Technology” de Wilson, R.C. (2022); e “CRISPR-Cas system as a promising player against bacterial infection and antibiotic resistance” de Abavisani et al. (2023). Criado com Canva.com e BioRender.com.

Componentes do sistema de edição CRISPR-Cas

RNA GUIA

Diferente de outros mecanismos, como TALENs e ZFNs, os quais necessitam a criação de proteínas de ligação específicas, a ativação, o direcionamento e especificidade do sistema CRISPR-Cas é realizado pelo pareamento de bases [9,16]. Essa ligação é realizada por duas moléculas de RNA: crRNA e tracrRNA. O crRNA contém o fragmento de RNA de 42 nucleotídeos complementar (*spacer*), que localiza a sequência alvo. Ao se ligar ao tracrRNA (80 nucleotídeos), por meio de ligação entre sequências complementares de 16 nucleotídeos, forma-se um complexo ativo [16,32]. Em modelos laboratoriais, o complexo crRNA:tracrRNA foi simplificado em uma única molécula chamada *single-guide RNA* (sgRNA) (Figura 1) [33]. Sintetizada como uma única molécula de 102 nucleotídeos, contendo uma dobra tipo “*hairpin*” de quatro bases (GAAA), o sgRNA desempenha a mesma função [34].

O planejamento apropriado da sgRNAs é de extrema importância para evitar clivagens de sequências não pertencentes ao gene alvo (efeito “*Off-target*”) e otimizar a eficiência do sistema CRISPR [15]. Quando realizado corretamente, permite o reconhecimento da sequência PAM e clivagem da fita dupla de DNA nos sítios alvo específicos de 17-20 pb subsequentes [14,15,30]. Esse processo possibilita a diferenciação entre bactérias patogênicas e simbióticas, que em conjunto com a ineficiência dos métodos de reparo de DNA em bactérias (NHEJ e HR), permite a clivagem e inativação de genes de resistência resultando a ressensibilização bacteriana a antibióticos [35].

Entretanto, estudos como os de Neo et al. (2024) [36] e Kim et al. (2016) [14] descrevem desafios significativos no desenvolvimento de sgRNAs eficientes devido à elevada mutagenicidade observada em um mesmo gene. A falha na clivagem e desativação, resultando na sobrevivência bacteriana, está frequentemente associadas à incapacidade de reconhecimento da sequência alvo pelas mutações nela presente [36]. Por exemplo, em 2018, haviam sido identificadas 207 variantes do gene blaCTX-M, responsáveis pela resistência a β -lactâmicos [37]. No mesmo contexto, He et al. (2021)

observaram limitações na ressensibilização de *E. coli* resistentes a colistina pela presença de deleções de aproximadamente 511 pb nos sgRNAs projetados e inseridos, resultando na perda da capacidade de reconhecimento do gene alvo mcr-1 pelo RNA-guia.

Apesar de aparentemente existirem respostas bacterianas específicas para determinadas classes de antibióticos, diferentes bactérias podem utilizar de mecanismos diferentes para combater o mesmo quimioterápico [38]. Isso é possível pela capacidade bacteriana de diversificação de mecanismos, localizados em diferentes sequências ou plasmídeos, para combater o mesmo antibiótico [38]. Dessa maneira, apesar a criação de sgRNAs eficientes, que resultem na clivagem e inativação da sequência alvo, a resistência a certo antimicrobiano pode ainda ser mantida através de outro mecanismo [30,31].

CRISPR-ASSOCIATED GENES

Nos microrganismos, as enzimas Cas presentes impõem limitações às ações realizadas pelo sistema. Em contrapartida, em laboratório, a possibilidade de escolha entre diferentes enzimas existentes e outras desenvolvidas, permite a ampliação e alcance de resultados mais específicos ou alternativos, que realizam funções além da clivagem de DNA [33].

Kiga et al. (2020) [39] (Quadro 1), em experimentos realizados em *E. coli*, optaram pelo uso da Cas13a por sua elevada capacidade bactericida independentemente do local onde a sequência alvo esteja inserida. Quando comparada à Cas9, apresentou uma diferença de inibição em plasmídeos de 2-3 ordens de magnitude [39]. Incluída na Classe IV, a Cas13 realiza uma “clivagem colateral” de bases de uracila próximas ao alvo, além de RNAs vizinhos após a identificação da *protospacer flanking sequence* (PFS) — sequência similar a PAM — que identifica o mRNA alvo [9].

Apesar do avanço no descobrimento das capacidades de diferentes enzimas Cas e o potencial da Cas13a para aplicações bactericidas direcionadas ao RNA, a Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) segue sendo a mais popular para a edição de genoma [9]. Kim et al. (2016) [14] (Quadro 1) utilizaram a Cas9 devido à alta especificidade quanto à sequência alvo, diminuindo a citotoxicidade e possibilitando a ressensibilização sem resultar, diretamente, na morte celular [9, 14].

A capacidade de quebra da fita-dupla de uma ampla gama de sequências de DNA, característica da Cas9, é realizada através de uma alteração conformacional resultante da ligação RNAguia:Cas9, resultando na ativação da enzima e início da busca pela sequência PAM (5'-NGG-3') [16]. Uma vez reconhecida, a enzima Cas9 induz a abertura e desenrolamento parcial da fita dupla de DNA, possibilitando o reconhecimento da “*seed region*” — sequência de 10 nucleotídeos adjacente à PAM — e, em caso de pareamento, permite a continuidade do desenrolamento, o reconhecimento dos nucleotídeos alvo restantes e formação do R-loop [32].

Na ocorrência de quase total complementariedade entre o sgRNA e a sequência alvo — com tolerância de até 3 incompatibilidades —, o domínio HNH passa por alteração estrutural posicionando-se próximo ao DNA e realizando a clivagem do terceiro nucleotídeo posterior à PAM na fita alvo [16,32]. A mudança de conformação ativa o domínio RuvC, responsável pelo corte simultâneo da fita complementar sequência alvo na mesma altura de nucleotídeos [16,32].

A partir dessas características básicas, diferentes estratégias de aperfeiçoamento puderam ser desenvolvidas. Utilizando a *Cas9* e buscando a ampliação da ressensibilização em meio líquido, Valderrama *et al.* (2019) [40] desenvolveram uma estratégia baseada na modificação da enzima adicionando um sistema de autorreplicação *pro-active* (*pro-AG*). Esse sistema possui a capacidade de recombinação homóloga e realiza a inserção do sgRNA após a clivagem e durante o reparo. Essa inclusão, força a bactéria a replicar a sequência inserida, que apresenta braços homólogos ao gene alvo (aprox. 500 bp cada), ampliando a quantidade de alvos e plasmídeos sensibilizados [40].

MECANISMOS DE ENTREGA

Diferentemente do sistema CRISPR-Cas em seu contexto natural, que pode ou não estar presente ou funcional em bactérias, o sistema de edição gênica necessita ser transportado para dentro da célula, ultrapassando uma parede celular espessa [33]. A eficiência dessa técnica está diretamente relacionada a uma ampla e precisa distribuição do sistema — um complexo proteína-RNA de aproximadamente 160 kDa — à população resistente-alvo [29,30,41]. Em bactérias, a entrega é realizada através de mecanismos virais e não-virais, como plasmídeos editados, nanocomplexos e bacteriófagos [21,33].

Sünderhauf *et al.* (2023) [43], destacam uma limitação relevante associada ao comportamento de bactérias na natureza e a escolha dos mecanismos de entrega ideais. Em seu artigo, os autores, durante o processo de desenvolvimento de uma ferramenta de entrega de amplo hospedeiro e com capacidade de transferência natural para diferentes espécies bacterianas, ressaltam a capacidade bacteriana de formar comunidades microbianas complexas, compostas por grande diversidade de espécies e cepas bacterianas nelas inseridas. Nessas comunidades, o mesmo plasmídeo de resistência antimicrobiana (plasmídeos epidêmicos) pode ser encontrado em distintas espécies e cepas bacterianas, frequentemente com elevada variabilidade genética. Essa diversidade pode se representar um desafio significativo para vetores com espectro de hospedeiro restrito, que necessitariam de ferramentas de entrega individualmente projetados para cada cepa alvo [43].

Tal limitação reforça a necessidade de estratégias capazes de atingir múltiplos hospedeiros, especialmente quando se considera a transição de estudos *in vitro* para aplicações clínicas, nas quais a heterogeneidade bacteriana é um fator determinante para o sucesso terapêutico.

PLASMÍDEOS

Encontrados em múltiplas cópias em células bacterianas, os elementos de DNA extracromossômico autorreplicante ou plasmídeos, frequentemente carregam genes responsáveis pela RA podendo, em diversos casos, carregar múltiplos genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos [30]. Os plasmídeos conjugativos, em específico, apresentam estruturas genéticas especializadas que permitem seu compartilhamento horizontal para bactérias vizinhas não resistentes. O conjunto dessas características está relacionada, respectivamente, ao aumento da expressão de genes carregadores de RA e, por consequência, dos mecanismos de resistência, conferindo a esses elementos genéticos móveis a responsabilidade pela disseminação de resistência e multirresistência bacteriana [15,30].

Devido à alta gama de ferramentas e a facilidade da sua programação, através da adição de nucleases CRISPR, plasmídeos podem ser modificados para desempenhar a função de transporte [31]. Esses grandes modelos de codificação, além de serem resistentes à sistemas de restrição-modificação e possuem uma ampla gama de hospedeiros, apresentam capacidade elevada de transferência entre células e diferentes espécies [44]. Ademais, bactérias recipientes de plasmídeos *cis* conjugativos — plasmídeos que contém na mesma molécula, o maquinário conjugativo e a nuclease CRISPR — tornam-se protegidas contra a aquisição de plasmídeos de resistência e possíveis doadoras, possibilitando um maior alcance e o desenvolvimento de uma possível ferramenta para modificação de microbiomas [21,44,45].

As limitações dos plasmídeos como vetores estão relacionadas à dependência de uma bactéria doadora, geralmente pertencente a uma cepa probiótica, para serem introduzidos, replicados, transportados e conjugados [31]. Essa bactéria doadora é determinante no sucesso da disseminação desses elementos genéticos móveis, que dependem da sua capacidade de sobrevivência, adaptação e colonização em diferentes partes de um organismo [31].

Fatores ambientais também influenciam significativamente a eficiência de conjugação. Em superfícies sólidas ou em condições que favorecem a formação de biofilmes, as taxas de transferência podem atingir níveis elevados, próximos de 100%, com plasmídeos *cis*-conjugativos. Em contrapartida, em culturas líquidas ou em modelos *in vivo*, a falta de uma superfície ou biofilme altera significativamente a capacidade de transmissão do sistema CRISPR-Cas [45].

Em estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2019) [44] (Quadro 1), a utilização de plasmídeos reativos a feromônios (PRP), específicos de *Enterococcus faecalis*, resultou em altos níveis de especificidade e conjugação em populações mistas. Esse processo é possível pela capacidade dos PRPs de reagirem a pequenos peptídeos sinalizadores liberados por *E. faecalis* que ainda não foram invadidas pelo plasmídeo CRISPR-Cas [44,46]. Em testes *in vitro* com cepas de *E. faecalis* domesticadas, a ressensibilização através da clivagem de genes *emrB* e *tetM* foi completa. *In vivo*, observou-se a diminuição da resistência à eritromicina, apesar da

baixa taxa de conjugação em camundongos [44]. Esse impasse também foi encontrado em experimentos de Upreti *et al.* (2024) [64] (Quadro 1), nos quais os autores teorizam sobre a relação inversamente proporcional entre o tamanho do plasmídeo utilizado e a capacidade de conjugação.

BACTERÍOFAGOS

Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias, atuando como predadores bacterianos naturais [35]. Através da sua capacidade eficiente de injetar suas sequências genômicas no citoplasma de células bacterianas, que deriva da necessidade de replicação dentro de um hospedeiro, e de características inerentes, como o direcionamento e destruição específicos para bactérias, possibilita que bacteriófagos sejam utilizados como vetores [8,31,35,47].

Fagos líticos e lisogênicos, utilizados frequentemente em fagoterapia, diferenciam-se pelo método de utilização do maquinário de replicação do hospedeiro. Os fagos lisogênicos inserem suas sequências dormentes ao genoma do hospedeiro, que passa a realizar sua multiplicação em conjunto com o material genético viral. Em contrapartida, os fagos líticos sequestram o maquinário celular e podem causar a lise bacteriana através de suas habilidades naturais, auxiliando a função do sistema CRISPR-Cas caso a ressensibilização não seja possível [31,47].

Como demonstrado em experimento anteriormente citado, Kiga *et al.* (2020) [39] (Quadro 1) utilizaram plasmídeos empacotados em bacteriófagos com alvo em genes de resistência localizados tanto em plasmídeos quanto no cromossomo bacteriano. O estudo atingiu uma diminuição aproximada de 88% e 94% no crescimento bacteriano de cepas carregadoras dos genes *bla*IMP-1 e *mcr*-2, respectivamente. *In vivo*, o experimento resultou em uma melhora significativa da sobrevivência das larvas *Galleria mellonella* tratadas com bacteriófago carregador de *Cas13a*, em comparação às não tratadas [39].

Apesar de seu potencial, o uso de bacteriófagos apresenta limitações importantes. A primeira está relacionada ao espaço dentro do capsídeo, que pode não ser compatível com o tamanho das sequências do sistema CRISPR-Cas [31]. Entretanto, esse problema pode ser solucionado por meio da remoção de sequências assumidamente não essenciais e substituindo-as pelo conjunto *Cas:sgRNA* no genoma do fago [47,48].

Quanto a limitações adaptativas, fagos isolados de ambientes como efluentes e esgoto, podem ser utilizados como vetores para patógenos naturalmente presentes em áreas associadas, como hospitais [31]. Entretanto, apesar da adaptação ao ambiente, a disseminação entre diferentes cepas bacterianas é limitada dada à capacidade restrita de adaptação do bacteriófago a diferentes locais de administração (p. ex. variações de pH e temperatura) [16,29,31,49]. A vulnerabilidade a fatores ambientais resulta na diminuição das taxas de sobrevivência dos bacteriófagos, por exemplo, quando introduzidos em um hospedeiro humano [31].

Outra limitação está relacionada diretamente à baixa afinidade dos receptores de membrana, resultando na limitação da

quantidade de possíveis hospedeiros bacterianos [16]. Diferentes estudos abordam possíveis soluções, incluindo a realização de mutações em genes da cauda do fago, a fim de causar a perda da função de especificidade ditada pelas proteínas expressadas na região e ampliar o alcance desse vetor [29].

Outras estratégias testadas incluem a encapsulação dos fagos carregadores do sistema CRISPR-Cas por fibras, lipossomas, hidrogéis e nanoemulsões. Esses não apenas possuem a capacidade de destruição de biofilmes (lipossomas e hidrogéis), mas também possibilitam aumentar a capacidade de sobrevivência dos vetores virais contra o sistema imunológico e alterações metabólicas celulares. Dessa forma, tornam possível a aplicação de vetores anteriormente limitados ao tratamento de infecções externas e superficiais, como adenovírus, em infecções bacterianas intracelulares [9]. Assim, a encapsulação possibilita que os mecanismos capazes de clivar os genes de resistência atinjam os seus alvos bacterianos específicos independente com maior efetividade [29].

NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas não apenas possuem a capacidade de entrega de drogas, mas também são capazes de carregar genes, plasmídeos e mRNAs proporcionando um envelope protético, de tamanho flexível, contra a degradação dos elementos genéticos, os quais, quando isolados, apresentam uma baixa capacidade de alcançar a célula alvo [29,31,50]. Segundo Mayorga-Ramos *et al.* (2023) [31], “[...] suas propriedades relacionadas ao tamanho nanométrico permitem que penetrem profundamente nas células bacterianas e danifiquem seus componentes internos, contribuindo para sua atividade antimicrobiana”.

Diferentes tipos de nanopartículas vêm sendo explorados como sistemas de entrega para o CRISPR-Cas, incluindo lipossomas catiônicos, nanopartículas lipídicas (LNPs), polímeros catiônicos, vesículas e nanopartículas de ouro. Esses sistemas atuam como cápsulas protetoras capazes de preservar a integridade do complexo CRISPR-Cas e de plasmídeos CRISPR negativamente carregados até sua chegada à célula bacteriana-alvo com maior estabilidade e eficiência [31,35,51]. Entre essas estratégias, as nanopartículas metálicas (óxidos de Prata, Zinco e Titânio) se mostraram extremamente eficientes contra bactérias multirresistentes gram-positivas e gram-negativas [52].

Utilizadas em experimentos realizados por Li *et al.* (2023) [61], com as nanopartículas metálicas de óxido de Zinco (ZnO) foi possível atingir a ressensibilização de bactérias *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos *in vitro* e *in vivo*. O nanocomplexo é formado por ZnO e dióxido de silício (SiO₂), carregando o plasmídeo contendo o sistema CRISPR-Cas9 e o sgRNA com alvo no gene *bla*NDM (pBECAB-apr), além do antibiótico imipeném e L-arginina. Seu mecanismo em cascata é desencadeado por alterações ácidas de pH, que ocorrem em ambientes associados à infecção, levando à liberação do imipeném e de íons Zn²⁺. Após a invasão da célula bacteriana, através da destruição da parede bacteriana, o nanocomplexo libera o complexo *sgRNA:Cas9*, que

realiza a clivagem do gene de resistência e restaura a sensibilidade ao imipeném, que, previamente liberado, passa a exercer sua ação contra *A. baumannii* [61].

Como efeito adicional, as nanopartículas geram espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagem com a L-arginina, produzindo óxido nítrico e causando danos adicionais, o que potencializa a morte bacteriana. Essa reação resulta também na redução da inflamação e favorece o reparo tecidual [61]. *In vitro*, a ressensibilização levou à diminuição da CIM em diferentes graus para ampicilina, gentamicina e levofloxacina. *In vivo*, camundongos com pneumonia aguda e peritonite apresentaram maior taxa de sobrevivência, com menor carga bacteriana, menos lesão tecidual, redução da resposta inflamatória e melhor recuperação geral [61].

Apesar dos resultados positivos relacionados as nanopartículas metálicas, as LNPs destacam-se como uma das abordagens mais exploradas devido à sua baixa imunogenicidade e à alta biocompatibilidade [31,35]. Kang *et al.* (2017) [53] (Quadro 1) utilizaram polímeros catiônicos de polietilenoimina ramificada (bPEI) para o empacotamento do complexo *sgRNA:Cas9* em nanopartículas compactadas. Nos experimentos realizados com nanopartículas contendo CRISPR, observou-se aumento da eficiência de entrega, atribuído à interação entre partículas carregadas positivamente e a superfície bacteriana negativamente carregada. Além disso, verificou-se redução de aproximadamente 32% no crescimento de cepas de MRSA *in vitro*, bem como ausência de toxicidade associada ao vetor desprovido de *sgRNA* [53].

Apesar de quando comparadas a vetores virais, as nanopartículas serem consideradas mais seguras [9], o seu uso na edição ressensibilização de bactérias ainda está em estágios preliminares [35]. Suas limitações incluem, em relação às bactérias, a baixa penetração em biofilmes, e em relação a estudos *in vivo*, o risco do acúmulo de partículas a longo prazo, a escassez de pesquisas relacionadas às interações dos nanomateriais com células e tecidos, além de investigações *in vivo* para determinar a toxicidade em curto e longo prazo [29,31,50,54].

GENE ALVO EM PLASMÍDEOS

Com a finalidade de induzir e reverter BMRs a células sensíveis a antibióticos convencionais, o sistema CRISPR-Cas9 é direcionado por *sgRNAs* complementares ao gene alvo em plasmídeos [14,30]. Esse processo causa a inativação desses elementos de DNA extracromossômico, resultando na modificação, repressão transcricional e desativação de genes de resistência em bactérias patogênicas sem afetar outras populações bacterianas [29,30,51].

No caso de BMRs contendo plasmídeos com genes de resistência a múltiplos fármacos, o uso de apenas um *sgRNA* não é considerado efetivo. Para casos mais complexos, a eficiência pode ser aperfeiçoada através de duas abordagens: o desenvolvimento de múltiplos sítios de clivagem utilizando um arranjo CRISPR ou

o uso de mais de um *sgRNA*, resultando na inativação dos genes em si; ou o direcionamento do CRISPR para genes essenciais nos plasmídeos de resistência, causando sua inativação ou destruição, e consequentemente, de seus genes [29].

GENE ALVO EM CROMOSSOMO BACTERIANO

Por meio de processos como transdução e transformação, sequências genéticas contendo possíveis genes de resistências podem ser integradas ao genoma bacteriano e, quando expressas, conferem capacidade de resistência à ação de antimicrobianos [7]. Dessa maneira, o direcionamento do sistema CRISPR-Cas para a clivagem das sequências não-essenciais no DNA cromossômico introduz defeitos irreversíveis, resultando em citotoxicidade por alterações em genes essenciais, por exemplo, relacionados ao processo de divisão celular [22,55,56].

Bikard *et al.* (2014) [57], realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* em cepas de *Staphylococcus aureus*, bactérias frequentemente associadas à microbiota da pele e causadora comum de diferentes tipos de infecções. O experimento teve como sequência alvo o gene *aph-3*, presente no cromossoma bacteriano e responsável pela resistência à canamicina. O resultado da clivagem desse gene foi a inibição do crescimento das cepas que apresentavam a resistência, quanto cepas controle (sem a presença da resistência à canamicina) não foi afetada. Esse experimento demonstra que a ressensibilização pode resultar na morte seletiva de cepas bacterianas dentro de uma população heterogênea, possibilitando a manutenção da microbiota e possíveis cepas não-virulentas da mesma espécie bacteriana [57].

DO CRISPR-Cas NA RESENSIBILIZAÇÃO BACTÉRIANA

Conforme sintetizado no Quadro 1, observou-se, a partir de 2015, um aumento e uma diversificação das aplicações do sistema CRISPR-Cas em estudos relacionados à modificação de genes não-essenciais em plasmídeos e/ou no cromossomo bacteriano. A busca pela ressensibilização bacteriana ao longo de aproximadamente dez anos demonstrou não apenas o avanço para estudos *in vivo*, mas também o aperfeiçoamento de seus mecanismos, incluindo a adição de sistemas de autorreplicação e a capacidade de desativação em enzimas Cas [40,42]. A introdução de nanopartículas como mecanismo de entrega representa uma inovação relevante [53], apesar da preferência pelo uso de plasmídeos e bacteriófagos. Independente da metodologia, os estudos apresentam resultados promissores, com altas taxas de ressensibilização, redução da CIM e, em um dos casos, demonstrando aumento da sobrevivência após o tratamento [39].

Quadro 1 - Aplicações do sistema **CRISPR-Cas** na ressensibilização de bactérias, *in vivo* e *in vitro*, com alvo em genes não-essenciais de resistência em plasmídeos e cromossomo.

(continua)

Sistema Cas	Bactéria	Gene(s) alvo	Transporte	Resultados	Ref.
<i>In vitro e in vivo</i>					
Cas9	<i>E. faecalis</i>	ermB tetM	Plasmídeo (PRP)	Resultou na eliminação completa da resistência a eritromicina e tetraciclina em <i>E. faecalis in vitro</i> e diminuição da resistência à eritromicina nas populações de <i>E. faecalis in vivo</i> . Encontrado efeito preventivo, onde células portadoras do CRISPR se tornaram protegidas da aquisição de novos plasmídeos de resistência.	[44]
	<i>E. coli</i>	tet(X4) mcr-1	Plasmídeo	O uso de um sistema CRISPR com 2 sgRNAs atingiu ~100% de eficiência de conjugação e ~90% de eficiência de ressensibilização. Em camundongos, <i>E. coli</i> resistentes foram reduzidas para ~1% da contagem inicial.	[58]
	<i>A. baumannii</i>	blaNDM-5	Nanocomplexo	O complexo de nanopartículas (CRISPR/Cas9sgRNA-I/L@ZS) atingiu a redução do CIM de três antibióticos e inibição do biofilme <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> , o complexo demonstrou efeito terapêutico bom, inibição da inflamação e promoveu a recuperação do tecido infectado.	[61]
Cas13a	<i>E. coli</i>	blaIMP-1 blaOXA-48 blaVIM-2 blaNDM-1 blaKPC-2 mcr-1 mcr-2	Capsídeo de fago (M13)	<i>In vitro</i> foi possível observar a redução da viabilidade dos genes de resistência presente em cromossomos e plasmídeos, com uma diferença de 2 a 3 ordens de magnitude. Em cultura mista, foi possível atingir a diminuição no crescimento de bactérias resistentes específicas. Quando testadas em larvas de <i>Galleria mellonella</i> elevou as chances de sobrevivência após tratamento.	[39]
<i>In vitro</i>					
I-E CRISPR-Cas	<i>E. coli</i>	blaNDM-1 CTX-M-15	Fago lisogênico e lítico	Bactérias atingidas pelo fago lisogênico carregador do CRISPR-Cas ficaram sensibilizadas aos antibióticos através da perda do plasmídeo resistente. Bactérias que não receberam o sistema, foram eliminadas pelo fago lítico modificado, promovendo a substituição por bactérias sensíveis.	[59]
Cas9	<i>E. coli</i>	aacC1	Plasmídeo	Reestabelecimento da sensibilidade a gentamicina através da quase erradicação do plasmídeo alvo e redução da conjugação e aquisição do plasmídeo de resistência.	[43]
		blaTEM blaSHV	Plasmídeo	Induziu ressensibilização à ampicilina e cefalosporina através da eliminação do plasmídeo de resistência e seus genes, atingindo 99% de eliminação das bactérias resistentes.	[14]
		blaKPC-2	Plasmídeo	Os resultados mostraram redução no valor de CIM, indicando que com a clivagem do gene foi necessário menor quantidade do antibiótico para inibir <i>E. coli</i> . Também, houve total eliminação dos plasmídeos resistentes em 32 horas.	[15]
		blaNDM-1	Plasmídeo	A sensibilidade a carbapenêmicos foi restaurada em experimentos com população isolada e mista, atingindo em ambos os casos a sensibilização das bactérias que apresentavam o plasmídeo pNDM1.	[60]

(conclusão)					
Sistema Cas	Bactéria	Gene(s) alvo	Transporte	Resultados	Ref.
<i>In vitro</i>					
Cas9	<i>E. coli</i>	mcr-1	Plasmídeo	Sensibilização das bactérias portadoras do mcr-1 plasmidial à colistina e morte celular das bactérias portadoras do mcr-1 cromossômico. Integração do sistema CRISPR-Cas9 permitiu aquisição de imunidade a plasmídeos contendo o gene mcr-1.	[62]
				Foi possível atingir a ressensibilização das colônias de <i>E. coli</i> aos antibióticos colistina e carbenicilina. Os cortes realizados pela <i>E. coli</i> , nesse contexto, não foram tóxicos. Após a perda do gene mcr-1, o plasmídeo sofreu recombinação e manteve sua viabilidade, mesmo não sendo mais resistente.	[63]
	<i>E. faecalis</i>	ermB	Plasmídeo	Os resultados demonstraram que, apesar da baixa taxa de conjugação, houve a diminuição na resistência a eritromicina em dois dos três meios utilizados.	[64]
	<i>S. aureus</i>	mecA	Nanocomplexo	A entrega do Cr-nanocomplexo para MRSA <i>in vitro</i> observou uma melhor eficiência em comparação ao controle. Os resultados da clivagem do gene mecA demonstraram uma diminuição do crescimento bacteriano em 32% em comparação com o controle. Também foi comprovado que o Cr-nanocomplexo sem a presença do sgRNA não apresenta toxicidade para a célula bacteriana.	[53]
TevSpCas9	<i>S. enterica</i>	acrB marR tsf, rplC/rplA murF fabB	Plasmídeo	Demonstrado a capacidade dos plasmídeos conjugadores cis, com a frequência de conjugação 1000x maior quando comparada a conjugadores trans. Os genes alvos localizados no cromossomo atingiram uma média de 80 a 100% de efeito bactericida e os localizados em plasmídeos, foi observado uma eficiência de 50-80%.	[45]
Pro-AGCas9	<i>E. coli</i>	bla	Plasmídeo	As UFC de bactérias modificadas pelo pPro-AG, com capacidade de inserção de gRNA em plasmídeos de resistência a Ampicilina, sofreram uma redução em 2-3 ordens de magnitudes quando expostas ao antibiótico ampicilina em relação a experimentos com pCRISPR. Indicando a maior eficiência de sensibilização do pPro-AG.	[40]
Sth1Cas9	<i>M. abscessus</i>	bla arr eis2	Plasmídeo	Os resultados das clivagens de genes não-essenciais ligados a resistência de b-lactâmicos, Rifamicina e Aminoglicosídeos, realizados separadamente e em conjunto, resultaram em uma queda de resistência de 90-98% a 99.8%, respectivamente.	[36]

LIMITAÇÕES, BIOSSEGURANÇA e FUTURO

As aplicações citadas nesse estudo concentram-se principalmente na utilização do sistema CRISPR-Cas como estratégia alternativa para prevenção e/ou tratamento a resistência antimicrobiana, exclusivamente em espaço laboratorial. Entretanto,

o avanço para outros âmbitos (humano-animal-ambiental) exige uma avaliação criteriosa de seus impactos biológicos, ecológicos e evolutivos. Considerando as interações entre o sistema CRISPR-Cas, seus vetores de entrega e os diferentes organismos potencialmente expostos, dado que modificações realizadas na saúde, agricultura e no meio ambiente apresentam resultados e

impacto interligados e recíprocos [15].

Até o momento, em relação à legislação e organismos geneticamente modificados (OGM), a Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005), estabelece normas e dispõe de órgãos fiscalizadores. A lei proíbe a implementação de projetos sem registro e acompanhamento, bem como a realização de modificações *in vivo* e *in vitro* em desacordo com as normas previstas, correspondentes ao Art. 6º [65].

Dessa forma, pesquisas realizadas com OGMs devem ser submetidas à CTNBio para aprovação e ficam dependentes de autorização prévia se houver intenção de liberação desses ou seus derivados no meio ambiente, por serem considerados atividade potencialmente causadora de degradação ambiental [66]. O Art. 3º da Resolução Normativa nº 18/2018 da CTNBio caracteriza OGMs, como bactérias modificadas, na classe de risco 2 ou superior, pela capacidade de se tornarem vetores biológicos de agentes causadores de agravos à saúde humana, animal, vegetal ou ao meio ambiente [65,66].

Nesse contexto, a abordagem One Health torna-se especialmente relevante, uma vez que alterações promovidas em microbiotas humanas, animais ou ambientais podem gerar consequências interdependentes e de longo alcance. Segundo Tsolakidou *et al.* (2025) [54], “a antecipação da resposta de comunidades afetadas pela edição genética de bactérias é crítica para manutenção da biossegurança”. Assim, modificações genéticas destinadas ao controle de bactérias resistentes não devem ser avaliadas apenas sob a perspectiva terapêutica imediata, mas também considerando seus potenciais impactos sobre ecossistemas microbianos e dinâmicas evolutivas [67].

A avaliação do alcance dos mecanismos de entrega é essencial para prevenir alterações não previstas no ecossistema, como a disseminação de elementos genéticos ou de microrganismos geneticamente modificados. A eficiência e o alcance dos mecanismos de entrega precisam ser cuidadosamente avaliados, especialmente diante da possibilidade de transferência horizontal de genes e disseminação inadvertida do sistema CRISPR-Cas entre populações bacterianas não alvo [41]. Além disso, mutações fora do alvo (*Off-target effects*) e alterações não intencionais em cepas não patogênicas podem causar impactos na composição da microbiota, incluindo a redução da diversidade e da abundância de comunidades microbianas. Essas alterações podem comprometer a saúde do hospedeiro, por exemplo, por meio da proliferação descontrolada de microrganismos oportunistas [41,68,69].

Outro aspecto ainda pouco compreendido refere-se à resposta evolutiva bacteriana frente ao uso contínuo do CRISPR-Cas. Assim como ocorre com antibióticos convencionais, pressões seletivas impostas por sistemas de edição genética podem favorecer o surgimento de mecanismos de escape, incluindo mutações em sequências-alvo, alterações em receptores bacterianos e expressão de proteínas *anti*-CRISPR. Esses mecanismos podem reduzir a eficácia terapêutica ao longo do tempo e representar um novo desafio para estratégias antimicrobianas baseadas em engenharia genética [70].

No futuro, ferramentas de Inteligência Artificial (IA) podem

oferecer aperfeiçoamento dos componentes do sistema CRISPR-Cas, visando à previsão de respostas por meio da análise de dados de alta qualidade. *sgRNAScorer*, *Elevation* e *AlphFold2* são alguns modelos desenvolvidos com a função de criar enzimas Cas e sgRNAs otimizados, possibilitando a diminuição dos efeitos *Off-target* e do tempo utilizado na criação, teste e aperfeiçoamento desses componentes [71]. Esse auxílio pode ser o passo necessário para a aplicação do sistema na medicina personalizada, visando à identificação e ressensibilização de cepas bacterianas singulares de pacientes ou ambientes.

Em relação a avanços em pesquisas, as limitações experimentais decorrentes da utilização de cepas domesticadas de *E. coli* pela maioria dos estudos restringe a compreensão dos efeitos do sistema CRISPR em bactérias selvagens e em comunidades microbianas complexas. Essa escolha impede a produção de resultados relacionados a espécies com relevância clínica (ESKAPE) ou BMR isoladas de ambientes ou casos clínicos [72].

Esses processos mostram os obstáculos necessários a serem superados antes da migração dos testes *in vitro* e em modelos animais, almejando suas aplicações na prática clínica [15]. O futuro das edições genéticas do sistema CRISPR-Cas, incluindo em BRM, depende da ampliação dos estudos em ambientes reais, destacando a necessidade de maior precisão, controle dos efeitos fora do alvo e avaliação dos impactos ecológicos e evolutivos [51]. Além disso, os riscos e transparência relacionados à manipulação genética de diferentes organismos devem ser avaliados e utilizados no desenvolvimento de estratégias mais seguras e na atualização de regulamentações específicas relacionadas à biossegurança. Embora altamente promissor, o CRISPR-Cas ainda herda limitações observadas em outras tecnologias de engenharia genética, reforçando a necessidade de cautela em sua aplicação translacional.

CONCLUSÃO

Como esperado, através da identificação e clivagem de genes específicos de resistência pelo sistema CRISPR-Cas e suas variantes, é possível restaurar a sensibilidade e/ou causar a morte de cepas resistentes. Desse modo, visando ao estudo de formas alternativas para a resolução do problema das BMRs e dos altos níveis de morbimortalidade no Brasil e no mundo, o CRISPR, em seu modelo de edição gênica, apresentou-se como um mecanismo capaz e promissor. E por meio da revisão, confirmou a hipótese a partir da análise de suas possibilidades de inativação de genes não essenciais localizados em plasmídeos e cromossomos de bactérias resistentes a antibióticos, buscando aumentar a eficiência desses fármacos.

Com o passar do tempo, a resistência bacteriana e por consequência a ineficiência de fármacos antibacterianos tornaram-se um desafio de saúde global difícil de ser solucionado com terapias tradicionais. Esse cenário é induzido por diversos fatores relacionados ao uso inadequado de antibióticos por parte da população e a habilidade natural de compartilhamento

mecanismos de resistência pelas bactérias. Tornando, no caso de bactérias classificadas pela OMS como risco crítico, a criação de novos antibióticos insuficiente.

Nesse contexto, a literatura apresenta soluções entre elas a terapia individual com o uso do CRISPR com finalidade de ressensibilização e morte celular, a partir da clivagem de genes presentes no cromossomo bacteriano, induzido a morte celular de cepas resistentes por incapacidade de correção de erro pelos sistemas de reparo bacteriano em resposta ao corte da dupla fita de DNA. Nos artigos, também é mencionado a terapia combinada com a introdução de antibióticos de espectro reduzido após clivagem do gene de resistência, ampliando as opções terapêuticas incluindo alternativas menos tóxicas. Por último, a combinação CRISPR-Cas e um vetor viral com capacidade tóxica à bactéria, como em caso de fagos líticos que apresentam capacidade natural lisante, assim auxiliando e complementando a função do sistema.

Durante a pesquisa, tornou-se evidente a importância que os componentes do sistema de edição: os sgRNA, as enzimas Cas e os mecanismo de entrega. A escolha de sequências ideais para a criação de sgRNAs é necessária para a diminuição os efeitos *Off-target*, permitindo que a especificidade ditada pelo guia possibilite o reconhecimento de cepas resistentes em meios heterogêneos. Nos artigos incluídos, em relação as enzimas Cas, a Cas9 se mostrou a preferida. Suas vantagens, como menor citotoxicidade e maior especificidade, não se tornaram impedimento para melhoramento como visto de estudos de Valderrama *et al.* (2019) [40] e Neo *et al.* (2024) [36]. Quanto aos mecanismos de entrega, apesar dos plasmídeos apresentarem uma ampla gama de hospedeiros e dos bacteriófagos possuírem uma capacidade natural de infectar células, as nanopartículas se destacam-se pela baixa imunogenicidade, proteção de sequências e biocompatibilidade, apesar da escassez de estudos.

Desse mesmo modo, apesar dos avanços apresentados na literatura, ainda existem limitações relacionadas à falta de pesquisas sobre os efeitos a longo prazo do uso do sistema CRISPR-Cas e seus impactos em diferentes ambientes e comunidade microbianas complexas. Essa limitação evidencia a necessidade de estudos e experimentos que utilizem espécies bacterianas de relevância clínica (ESKAPE), além da compreensão da capacidade de disseminação do CRISPR-Cas a partir de bactérias dessensibilizadas geneticamente e seus efeitos sobre diferentes organismos visando um futuro de aplicações clínicas ou ambientais.

Dessa forma, esta revisão contribui para a consolidação do conhecimento acerca de uso de ferramentas de edição gênica na ressensibilização de bactérias, em específico o sistema CRISPR-Cas e suas variantes. Além disso, evidencia lacunas para futuras investigações e para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento contra a resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho JJVD, Boaventura FG, Silva ADCRD, Ximenes RL, Rodrigues LKC, Nunes DADA, et al. Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. RSD. 10 de junho de 2021;10(6):e58810616303. doi:10.33448/rsd-v10i6.16303
2. Aguilar GR, Swetschinski LR, Weaver ND, Ikuta KS, Mestrovic T, Gray AP, et al. The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. The Lancet Regional Health - Americas. setembro de 2023;25:100561. doi:10.1016/j.lana.2023.100561
3. Brasil, Ministério da Saúde. RAM no Brasil. Brasília, DF; 17 de dez. 2024. RAM no Brasil — Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/ram/ram-no-brasil>. Acesso em: 15 out. 2025.
4. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2024. WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>. Acesso em: 10 out. 2025.
5. Oliveira RDSMD, Conceição KSD, Jacob RDES, Araújo AABD, Silva BZ, Teixeira PHM, et al. Impacto das infecções por bactérias multirresistentes em unidades de terapia intensiva. Braz J Implantol Health Sci. 15 de abril de 2025;7(4):705–15. doi:10.36557/2674-8169.2025v7n4p705-715
6. Booton RD, Meeyai A, Alhusein N, Buller H, Feil E, Lambert H, et al. One Health drivers of antibacterial resistance: Quantifying the relative impacts of human, animal and environmental use and transmission. One Health. 1º de junho de 2021;12:100220. doi:10.1016/j.onehlt.2021.100220
7. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 23 de março de 2007;128(6):1037–50. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004 PubMed PMID: 17382878.
8. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2006.
9. Abavisani M, Khayami R, Hoseinzadeh M, Kodori M, Kesharwani P, Sahebkar A. CRISPR-Cas system as a promising player against bacterial infection and antibiotic resistance. Drug Resistance Updates. 1º de maio de 2023;68:100948. doi:10.1016/j.drug.2023.100948
10. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. Venter H, organizador. Essays in Biochemistry. 3 de março de 2017;61(1):49–59. doi:10.1042/EBC20160063
11. Dalmolin J, Nakano RL, Marcusso PF, Boleta-Ceranto DDCF, Cogo J, Melo PGBD, et al. MECANISMOS DE EXPRESSÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS E SAÚDE PÚBLICA. Arq Ciênc Saúde Unipar. 7 de outubro de 2022;26(3). doi:10.25110/arqsaude.v26i3.2022.8851
12. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet. março de 2010;11(3):181–90. doi:10.1038/nrg2749
13. Gostimskaya I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. Biochemistry (Mosc). 2022;87(8):777–88. doi:10.1134/S0006297922080090 PubMed PMID: 36171658; PubMed Central

PMCID: PMC9377665.

14. Kim JS, Cho DH, Park M, Chung WJ, Shin D, Ko KS, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 de fevereiro de 2016;26(2):394–401. doi:10.4014/jmb.1508.08080
15. Tao S, Chen H, Li N, Fang Y, Zhang H, Xu Y, et al. Elimination of blaKPC-2-mediated carbapenem resistance in *Escherichia coli* by CRISPR-Cas9 system. *BMC Microbiol*. 26 de outubro de 2023;23(1):310. doi:10.1186/s12866-023-03058-7
16. Al-Ouqaili MTS, Ahmad A, Jwair NA, Al-Marzooq F. Harnessing bacterial immunity: CRISPR-Cas system as a versatile tool in combating pathogens and revolutionizing medicine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1588446. doi:10.3389/fcimb.2025.1588446 PubMed PMID: 40521034; PubMed Central PMCID: PMC12162490.
17. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 23 de março de 2007;315(5819):1709–12. doi:10.1126/science.1138140
18. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 1º de agosto de 2005;151(8):2551–61. doi:10.1099/mic.0.28048-0
19. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 1º de outubro de 2015;526(7571):55–61. doi:10.1038/nature15386
20. Jansen Ruud, Embden JanDAV, Gaastra Wim, Schouls LeoM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. março de 2002;43(6):1565–75. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
21. Gholizadeh P, Köse Ş, Dao S, Ganbarov K, Tanomand A, Dal T, et al. How CRISPR-Cas System Could Be Used to Combat Antimicrobial Resistance. *IDR*. abril de 2020;Volume 13:1111–21. doi:10.2147/IDR.S247271
22. Junaid M, Thirapanmethee K, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. CRISPR-Based Gene Editing in *Acinetobacter baumannii* to Combat Antimicrobial Resistance. *Pharmaceuticals*. julho de 2023;16(7):920. doi:10.3390/ph16070920
23. Huang YY, Zhang XY, Zhu P, Ji L. Development of clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated technology for potential clinical applications. *WJCC*. 26 de junho de 2022;10(18):5934–45. doi:10.12998/wjcc.v10.i18.5934
24. Yoshimi K, Mashimo T. Genome editing technology and applications with the type I CRISPR system. *Gene and Genome Editing*. 1º de dezembro de 2022;3–4:100013. doi:10.1016/j.ggedit.2022.100013
25. Charbonneau AA, Eckert DM, Gauvin CC, Lintner NG, Lawrence CM. Cyclic Tetra-Adenylate (cA4) Recognition by Csa3; Implications for an Integrated Class 1 CRISPR-Cas Immune Response in *Saccharolobus solfataricus*. *Biomolecules*. 9 de dezembro de 2021;11(12):1852. doi:10.3390/biom11121852
26. Mitić D, Bolt EL, Ivančić-Baće I. CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*. 31 de março de 2023;43(3):BSR20221198. doi:10.1042/BSR20221198
27. Stamereilers C, Wong S, Tsourkas PK. Characterization of CRISPR Spacer and Protospacer Sequences in *Paenibacillus* larvae and Its Bacteriophages. *Viruses*. 11 de março de 2021;13(3):459. doi:10.3390/v13030459
28. Zakrzewska M, Burmistrz M. Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems. *Front Microbiol*. 28 de fevereiro de 2023;14:1060337. doi:10.3389/fmicb.2023.1060337 PubMed PMID: 36925473; PubMed Central PMCID: PMC10013973.
29. Wu Y, Battalapalli D, Hakeem MJ, Selamneni V, Zhang P, Draz MS, et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *J Nanobiotechnol*. 4 de dezembro de 2021;19(1):401. doi:10.1186/s12951-021-01132-8
30. Kippnich J, Benz F, Uecker H, Baumdicker F. Effectiveness of CRISPR-Cas in Sensitizing Bacterial Populations with Plasmid-Encoded Antimicrobial Resistance [Internet]. *Evolutionary Biology*; 2024 [citado 10 de outubro de 2025]. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.07.05.602127> doi:10.1101/2024.07.05.602127
31. Mayorga-Ramos A, Zúñiga-Miranda J, Carrera-Pacheco SE, Barba-Ostria C, Guamán LP. CRISPR-Cas-Based Antimicrobials: Design, Challenges, and Bacterial Mechanisms of Resistance. *ACS Infect Dis*. 14 de julho de 2023;9(7):1283–302. doi:10.1021/acsinfecdis.2c00649
32. Rozners E. Chemical Modifications of CRISPR RNAs to Improve Gene-Editing Activity and Specificity. *J Am Chem Soc*. 20 de julho de 2022;144(28):12584–94. doi:10.1021/jacs.2c02633 PubMed PMID: 35796760; PubMed Central PMCID: PMC9636589.
33. Wilson RC. CRISPR Technology. *Innovative Genomics Institute (IGI)*. In M.L. Hochstrasser et al. (Eds.) *CRISPRpedia*. Berkeley: Innovative Genomics Institute, University of California, Berkeley. Retrieved from: <https://innovativegenomics.org/crisprpedia/crispr-technology/> (Last updated: September 12, 2022.). Acesso em: 15 nov. 2025.
34. Turk R, Spencer NY. Difference between crRNA and sgRNA. *IDT [Internet]*. 2 de julho de 2019. Disponível em: <https://www.idtdna.com/page/support-and-education/decoded-plus/a-high-degree-of-similarity-in-crispr-cas9-editing-efficiency-is-found-between-2-part-guide-rnas-and-single-guide-rnas/>. Acesso em: 24 maio 2026.
35. Allemailem K. Recent Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Multidrug Resistance and Novel Approaches of CRISPR/Cas9-Based Genome-Editing to Combat This Health Emergency. *IJN*. fevereiro de 2024;Volume 19:1125–43. doi:10.2147/IJN.S453566
36. Neo DM, Clatworthy AE, Hung DT. A dual-plasmid CRISPR/Cas9-based method for rapid and efficient genetic disruption in *Mycobacterium abscessus*. *J Bacteriol*. 21 de março de 2024;206(3):e0033523. doi:10.1128/jb.00335-23 PubMed PMID: 38319218; PubMed Central PMCID: PMC10955840.
37. Buckner MMC, Ciusa ML, Piddock LJV. Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. *FEMS Microbiol Rev*. 1º de novembro de 2018;42(6):781–804.

doi:10.1093/femsre/fuy031

38. Wartu JR, Butt AQ, Suleiman U, Adeke M, Tayaza FB, Musa BJ, et al. MULTIDRUG RESISTANCE BY MICROORGANISMS: A REVIEW. *Science World Journal*. 2019;14(4):49–56.

39. Kiga K, Tan XE, Ibarra-Chávez R, Watanabe S, Aiba Y, Sato'o Y, et al. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nat Commun*. 10 de junho de 2020;11(1):2934. doi:10.1038/s41467-020-16731-6

40. Valderrama JA, Kulkarni SS, Nizet V, Bier E. A bacterial gene-drive system efficiently edits and inactivates a high copy number antibiotic resistance locus. *Nat Commun*. 16 de dezembro de 2019;10(1):5726. doi:10.1038/s41467-019-13649-6 PubMed PMID: 31844051; PubMed Central PMCID: PMC6915771.

41. Ahmed MM, Kayode HH, Okesanya OJ, Ukoaka BM, Eshun G, Mourid MR, et al. CRISPR-Cas Systems in the Fight Against Antimicrobial Resistance: Current Status, Potentials, and Future Directions. *IDR*. 26 de novembro de 2024;17:5229–45. doi:10.2147/IDR.S494327

42. Wan X, Li Q, Olsen RH, Meng H, Zhang Z, Wang J, et al. Engineering a CRISPR interference system targeting AcrAB-TolC efflux pump to prevent multidrug resistance development in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 28 de julho de 2022;77(8):2158–66. doi:10.1093/jac/dkac166

43. Sünderhauf D, Klümper U, Pursey E, Westra ER, Gaze WH, van Houte S. Removal of AMR plasmids using a mobile, broad host-range CRISPR-Cas9 delivery tool. *Microbiology (Reading)*. 25 de maio de 2023;169(5):001334. doi:10.1099/mic.0.001334 PubMed PMID: 37226834; PubMed Central PMCID: PMC10268836.

44. Rodrigues M, McBride SW, Hullahalli K, Palmer KL, Duerkop BA. Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22 de outubro de 2019;63(11):10.1128/aac.01454-19. doi:10.1128/aac.01454-19

45. Hamilton TA, Pellegrino GM, Therrien JA, Ham DT, Bartlett PC, Karas BJ, et al. Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun*. 4 de outubro de 2019;10:4544. doi:10.1038/s41467-019-12448-3 PubMed PMID: 31586051; PubMed Central PMCID: PMC6778077.

46. González de Aledo M, González-Bardanca M, Blasco L, Pacios O, Blieriot I, Fernández-García L, et al. CRISPR-Cas, a Revolution in the Treatment and Study of ESKAPE Infections: Pre-Clinical Studies. *Antibiotics*. julho de 2021;10(7):756. doi:10.3390/antibiotics10070756

47. Fagen JR, Collias D, Singh AK, Beisel CL. Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. dezembro de 2017;4:57–64. doi:10.1016/j.cobme.2017.10.001

48. Fage C, Lemire N, Moineau S. Delivery of CRISPR-Cas systems using phage-based vectors. *Curr Opin Biotechnol*. abril de 2021;68:174–80. doi:10.1016/j.cobio.2020.11.012 PubMed

PMID: 33360715.

49. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1º de janeiro de 2019;53(1):16–21. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004

50. Duan L, Ouyang K, Xu X, Xu L, Wen C, Zhou X, et al. Nanoparticle Delivery of CRISPR/Cas9 for Genome Editing. *Front Genet*. 12 de maio de 2021;12. doi:10.3389/fgene.2021.673286

51. Tao S, Chen H, Li N, Liang W. The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist*. 2 de agosto de 2022;15:4155–68. doi:10.2147/IDR.S370869 PubMed PMID: 35942309; PubMed Central PMCID: PMC9356603.

52. Sen D, Mukhopadhyay P. Antimicrobial resistance (AMR) management using CRISPR-Cas based genome editing. *Gene Genome Editing*. 2024;7((Sen D.) Department of Microbiology, University of Kalyani, West Bengal, Nadia, India). Located at: Embase. doi:10.1016/j.ggedit.2024.100031

53. Kang YK, Kwon K, Ryu JS, Lee HN, Park C, Chung HJ. Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjugate Chem*. 19 de abril de 2017;28(4):957–67. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00676

54. Tsolakidou PJ. CRISPR–Cas systems against carbapenem resistance: from proof-of-concept to clinical translation. *Front Microbiol*. 19 de dezembro de 2025;16. doi:10.3389/fmicb.2025.1725247

55. Javed MU, Hayat MT, Mukhtar H, Imre K. CRISPR-Cas9 System: A Prospective Pathway toward Combatting Antibiotic Resistance. *Antibiotics*. junho de 2023;12(6):1075. doi:10.3390/antibiotics12061075

56. O'Donnell M, Langston L, Stillman B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1º de julho de 2013;5(7):a010108. doi:10.1101/cshperspect.a010108 PubMed PMID: 23818497; PubMed Central PMCID: PMC3685895.

57. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*. novembro de 2014;32(11):1146–50. doi:10.1038/nbt.3043

58. Zhang H, Chen B, Wang Z, Peng K, Liu Y, Wang Z. Resensitizing tigecycline- and colistin-resistant *Escherichia coli* using an engineered conjugative CRISPR/Cas9 system. *Jun SR, organizador. Microbiol Spectr*. 2 de abril de 2024;12(4):e03884-23. doi:10.1128/spectrum.03884-23

59. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9 de junho de 2015;112(23):7267–72. doi:10.1073/pnas.1500107112

60. Wongpayak P, Meesungnoen O, Saejang S, Subsoontorn P. A highly effective and self-transmissible CRISPR antimicrobial for elimination of target plasmids without antibiotic selection. *PeerJ*. 2021;9:e11996. doi:10.7717/peerj.11996 PubMed PMID: 34567840; PubMed Central PMCID: PMC8428258.

61. Li X, Gui S, Gui R, Li J, Huang R, Hu M, et al.

Multifunctional Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9-Based Nanobomb against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection through Cascade Reaction and Amplification Synergistic Effect. *ACS Nano*. 26 de dezembro de 2023;17(24):24632–53. doi:10.1021/acsnano.3c03267

62. He YZ, Yan JR, He B, Ren H. A Transposon-Associated CRISPR/Cas9 System Specifically Eliminates both Chromosomal and Plasmid-Borne mcr-1 in *Escherichia coli* [Internet]. 2021 [citado 30 de outubro de 2025]. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aac.01054-21> doi:10.1128/aac.01054-21

63. Wang Y, Wang S, Chen W, Song L, Zhang Y, Shen Z, et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in *Klebsiella pneumoniae*. Drake HL, organizador. *Appl Environ Microbiol*. dezembro de 2018;84(23):e01834-18. doi:10.1128/AEM.01834-18

64. Upreti C, Kumar P, Durso LM, Palmer KL. CRISPR-Cas inhibits plasmid transfer and immunizes bacteria against antibiotic resistance acquisition in manure. *Appl Environ Microbiol*. 19 de agosto de 2024;90(9):e00876-24. doi:10.1128/aem.00876-24 PubMed PMID: 39158272; PubMed Central PMCID: PMC11409644.

65. BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB e dá outras providências. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 28 mar. 2005. Disponível em: Planalto – Lei nº 11.105/2005. Acesso em: 3 abr. 2026.

66. BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Resolução Normativa nº 18, de 23 de março de 2018. Brasília, DF: CTNBio, 2018. Disponível em: Resolução Nº 18 – CTNBio. Acesso em: 24 maio 2026.

67. Collignon PJ, McEwen SA. One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. março de 2019;4(1):22. doi:10.3390/tropicalmed4010022

68. Cordeiro ABV, Amaro TJU, Tavares GHO, De Sousa Filho EB, Silva LCD, De Carvalho MUWB. DISBIOSE VAGINAL E INFECÇÕES RECORRENTES: UMA REVISÃO DA RELAÇÃO ENTRE MICROBIOTA E SAÚDE GENITAL FEMININA. *LEV*. 28 de maio de 2025;16(48):5755–67. doi:10.56238/levv16n48-089

69. Yang L, Bajinka O, Jarju PO, Tan Y, Taal AM, Ozdemir G. The varying effects of antibiotics on gut microbiota. *AMB Express*. 16 de agosto de 2021;11:116. doi:10.1186/s13568-021-01274-w PubMed PMID: 34398323; PubMed Central PMCID: PMC8368853.

70. Borges AL, Davidson AR, Bondy-Denomy J. The Discovery, Mechanisms, and Evolutionary Impact of Anti-CRISPRs. *Annu Rev Virol*. 29 de setembro de 2017;4(1):37–59. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041616

71. Kim M gyeong, Go M ji, Kang SH, Jeong S hwan, Lim K. Revolutionizing CRISPR technology with artificial intelligence. *Exp Mol Med*. julho de 2025;57(7):1419–31. doi:10.1038/s12276-025-01462-9

72. de Souza HCA, Panzenhagen P, Portes AB, Dos Santos AMP, Fidelis J, Junior CAC. CRISPR-Cas systems in combating antimicrobial resistance: which system to choose? A systematic review. *World J Microbiol Biotechnol*. 14 de outubro de 2025;41(10):381. doi:10.1007/s11274-025-04608-z PubMed PMID: 41085803.