doi.org/10.51891/rease.v12i11.32089

APLICAÇÕES DO CRISPR-CAS9 NO COMBATE À RESISTÊNCIA BACTERIANA: REVISÃO DA EVIDÊNCIA EXPERIMENTAL E PERSPECTIVAS PARA A MICROBIOLOGIA CLÍNICA

APPLICATIONS OF CRISPR-CAS9 IN COMBATING BACTERIAL RESISTANCE: A REVIEW OF EXPERIMENTAL EVIDENCE AND PERSPECTIVES FOR CLINICAL MICROBIOLOGY

APLICACIONES DE CRISPR-CAS9 EN EL COMBATE A LA RESISTENCIA BACTERIANA: REVISIÓN DE LA EVIDENCIA EXPERIMENTAL Y PERSPECTIVAS PARA LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Elaiene da Silva Diniz[1]
Gabriel Oliveira Ortolane[2]
Gabriele Marcelino Gomes[3]

RESUMO: A resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui um desafio crescente, especialmente pela disseminação de genes de resistência associados a plasmídeos e outros elementos genéticos móveis. Nesse contexto, o sistema CRISPR-Cas9 com atividade de nuclease apresenta potencial para o combate à resistência bacteriana por meio do direcionamento de genes de resistência, alteração de elementos plasmidiais e ressensibilização bacteriana. Foi realizada uma revisão narrativa da literatura, com busca estruturada nas bases PubMed/MEDLINE, ScienceDirect, SciELO e Google Scholar, abrangendo publicações de 2014 a setembro de 2026. Estudos experimentais com Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis e Enterobacteriaceae demonstraram diferentes graus de perda plasmidial, inativação funcional e ressensibilização bacteriana. Estratégias de entrega por plasmídeos conjugativos, bacteriófagos, fagemídeos e nanocomplexos também apresentaram resultados distintos conforme o patógeno e o modelo experimental. As evidências sustentam a viabilidade experimental do CRISPR-Cas9 como estratégia antimicrobiana de precisão, porém os resultados permanecem predominantemente pré-clínicos, com desafios relacionados à entrega, mecanismos de escape, segurança ecológica e validação em modelos biológicos complexos.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Genes de resistência. Plasmídeos. Ressensibilização. Antimicrobianos de precisão.

ABSTRACT: Bacterial resistance to antimicrobials is a growing challenge, especially due to the spread of resistance genes associated with plasmids and other mobile genetic elements. In this context, the CRISPR-Cas9 system with nuclease activity shows potential for combating bacterial resistance through the targeting of resistance genes, alteration of plasmid elements, and bacterial resensitization. A narrative literature review was conducted, with a structured search in the PubMed/MEDLINE, ScienceDirect, SciELO, and Google Scholar databases, covering publications from 2014 to September 2026. Experimental studies with Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, and Enterobacteriaceae demonstrated different degrees of plasmid loss, functional inactivation, and bacterial resensitization. Delivery strategies using conjugative plasmids, bacteriophages, phagemids, and nanocomplexes also showed distinct results depending on the pathogen and the experimental model. Evidence supports the experimental viability of CRISPR-Cas9 as a precision antimicrobial strategy, but results remain predominantly preclinical, with challenges related to delivery, escape mechanisms, ecological safety, and validation in complex biological models.

Keywords: Antimicrobial resistance. Resistance genes. Plasmids. Resensitization. Precision antimicrobials.

[1] Graduanda em Biomedicina. UNINASSAU Cacoal.
[2] Médico Veterinário.
[3] Mestra em Ciências Ambientais. Biomédica. Docente do ensino superior e analista clínica, UNINASSAU Cacoal.

RESUMEN: La resistencia bacteriana a los antimicrobianos constituye un desafío creciente, especialmente debido a la diseminación de genes de resistencia asociados a plásmidos y otros elementos genéticos móviles. En este contexto, el sistema CRISPR-Cas9 con actividad nucleasa presenta potencial para combatir la resistencia bacteriana mediante la focalización en genes de resistencia, la alteración de elementos plasmídicos y la resensibilización bacteriana. Se realizó una revisión narrativa de la literatura, con una búsqueda estructurada en las bases de datos PubMed/MEDLINE, ScienceDirect, SciELO y Google Scholar, abarcando publicaciones desde 2014 hasta septiembre de 2026. Los estudios experimentales con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacteriaceae* demostraron diversos grados de pérdida plasmídica, inactivación funcional y resensibilización bacteriana. Las estrategias de administración mediante plásmidos conjugativos, bacteriófagos, fagemídios y nanocomplejos también arrojaron resultados variables según el patógeno y el modelo experimental. La evidencia respalda la viabilidad experimental de CRISPR-Cas9 como estrategia antimicrobiana de precisión; no obstante, los resultados siguen siendo predominantemente preclínicos, con desafíos relacionados con la administración, los mecanismos de escape, la seguridad ecológica y la validación en modelos biológicos complejos.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana. Genes de resistencia. Plásmidos. Resensibilización. Antimicrobianos de precisión.

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos representa um importante desafio para o tratamento das infecções, sobretudo diante da diversidade de mecanismos envolvidos e da capacidade de disseminação dos determinantes genéticos de resistência. Nesse cenário, a identificação desses determinantes, especialmente daqueles associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, assume relevância, uma vez que esses elementos podem favorecer a transferência horizontal de genes entre bactérias e contribuir para a disseminação da resistência aos antimicrobianos (Murray et al., 2022; Vivekanandan et al., 2025).

A relevância desse cenário também é evidenciada pelo impacto da resistência bacteriana sobre a mortalidade global. Uma análise publicada em 2022 estimou que, em 2019, a resistência bacteriana aos antimicrobianos esteve associada a aproximadamente 4,95 milhões de mortes em todo o mundo, das quais 1,27 milhão foram diretamente atribuídas a esse fenômeno (Murray et al., 2022).

A diversidade de patógenos bacterianos e dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência aos antimicrobianos evidencia a complexidade desse fenômeno e reforça a importância de estratégias capazes de identificar determinantes genéticos específicos. Nesse contexto, em 2024, a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou sua Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários, contemplando 24 patógenos distribuídos em 15 famílias, classificados de acordo com sua relevância para a saúde pública e a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento, com destaque para aqueles que apresentam resistência aos antimicrobianos (WHO, 2024).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A primeira decorre de características inerentes à espécie bacteriana, enquanto a segunda pode resultar de alterações genéticas ou da aquisição de genes de resistência por transferência horizontal, inclusive por meio de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis. Entre os principais mecanismos de resistência estão a inativação enzimática dos antimicrobianos, a modificação ou proteção do alvo, a redução da permeabilidade celular e o aumento do efluxo (Vivekanandan et al., 2025).

Nesse contexto, o sistema CRISPR-Cas9 tem sido investigado como uma ferramenta de edição genética capaz de reconhecer e clivar sequências específicas de DNA. Em bactérias, sua aplicação experimental tem demonstrado potencial para inativar genes de resistência ou eliminar plasmídeos que os carregam, podendo, consequentemente, reduzir a resistência aos antimicrobianos (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014).

Estratégias de intervenção genética direcionada têm sido investigadas como possíveis abordagens complementares aos antimicrobianos convencionais, especialmente por sua capacidade de reconhecer sequências específicas de DNA associadas à resistência bacteriana. Entre essas estratégias, destaca-se o sistema CRISPR-Cas9, que utiliza um RNA-guia para direcionar a nuclease Cas9 a sequências específicas do DNA. Estudos experimentais demonstraram o potencial dessa abordagem para atingir determinantes genéticos de resistência, incluindo genes como blaNDM-1 e blaSHV-18, associados à resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como β-lactâmicos, carbapenêmicos, colistina, vancomicina e fosfomicina (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Kim et al., 2016; Wang et al., 2019; Walflor et al., 2022; Tao et al., 2023a).

O direcionamento pelo CRISPR-Cas9 ocorre por meio da complementaridade entre o RNA-guia e a sequência de DNA-alvo, desde que esta esteja associada a um motivo adjacente ao protoespaçador (protospacer adjacent motif — PAM) compatível com a variante de Cas9 utilizada. Após o reconhecimento da sequência-alvo, a atividade de nuclease da Cas9 promove a clivagem da dupla fita de DNA. Esse mecanismo permite direcionar o sistema a sequências localizadas em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano, incluindo genes associados à resistência aos antimicrobianos (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Mayorga-Ramos et al., 2023).

Os efeitos dessa intervenção dependem da localização do alvo e das características do sistema empregado. Quando o direcionamento ocorre contra sequências plasmidiais, pode haver perda do plasmídeo e, consequentemente, dos genes de resistência nele presentes, sem que isso

implique necessariamente a morte bacteriana. Por outro lado, a clivagem de sequências cromossômicas pode comprometer a viabilidade celular, especialmente quando a quebra do DNA não é reparada de maneira eficaz. Assim, o CRISPR-Cas9 apresenta potencial para interferir tanto na manutenção de elementos genéticos móveis quanto na integridade do material genético bacteriano, embora os resultados dependem das condições experimentais e do contexto biológico (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014).

No âmbito da microbiologia clínica, essa abordagem suscita a possibilidade de integrar a caracterização molecular dos isolados bacterianos ao desenvolvimento de intervenções geneticamente direcionadas. A identificação do patógeno e dos determinantes de resistência poderia subsidiar a seleção de sequências-alvo e o desenho de RNA-guias compatíveis com os genes identificados. Entretanto, é necessário distinguir essa perspectiva terapêutica das aplicações diagnósticas das tecnologias CRISPR (Quan et al., 2019).

Apesar dos resultados experimentais promissores, os estudos sobre o uso do CRISPR-Cas9 contra a resistência bacteriana apresentam diferenças quanto aos alvos genéticos, às espécies bacterianas investigadas, às estratégias de entrega e aos desfechos avaliados. Essa heterogeneidade, somada às limitações para extrapolar os resultados experimentais para contextos biológicos mais complexos, dificulta a comparação dos achados e a avaliação do potencial de aplicação clínica dessas estratégias (Uribe et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

Diante desse cenário, torna-se relevante sistematizar e analisar criticamente as evidências experimentais disponíveis, considerando os determinantes genéticos investigados, as estratégias de entrega, os efeitos observados e as limitações relatadas. Assim, esta revisão tem como objetivo analisar criticamente as aplicações experimentais do CRISPR-Cas9 no combate à resistência bacteriana, discutindo seu potencial, suas limitações e suas perspectivas de aplicação futura na microbiologia clínica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência bacteriana corresponde à capacidade de uma população bacteriana crescer na presença de concentrações de um antimicrobiano que inibiriam uma população suscetível. Entre os mecanismos mais relevantes estão a produção de enzimas inativadoras, alterações do alvo, diminuição da entrada do fármaco e aumento do efluxo. Plasmídeos e outros elementos

móveis têm importância especial porque podem transportar múltiplos determinantes e favorecer sua transferência horizontal (Vivekanandan et al., 2025).

Essa organização genética ajuda a compreender por que o direcionamento de genes de resistência pelo CRISPR-Cas9 constitui uma estratégia experimental promissora, uma vez que permite atuar de forma programada sobre determinantes moleculares associados ao fenótipo resistente. Entretanto, a presença de múltiplos genes e mecanismos de resistência em um mesmo isolado pode limitar os efeitos do direcionamento de um único alvo. Esse aspecto foi observado em um isolado clínico de Klebsiella michiganensis, no qual o direcionamento do gene blaKPC reduziu a resistência, mas não promoveu ressensibilização completa em todos os transformantes analisados (Tagliaferri et al., 2025).

2.2 Resistência, tolerância, persistência e biofilme

Resistência, tolerância e persistência não são conceitos equivalentes. Resistência envolve crescimento em concentrações de antimicrobianos que inibiriam bactérias suscetíveis. Tolerância refere-se à capacidade de sobreviver à exposição sem necessariamente aumentar a concentração necessária para inibir o crescimento. Persistência corresponde à sobrevivência de uma subpopulação fenotipicamente tolerante durante a exposição. Biofilme, por sua vez, é uma forma organizada de crescimento bacteriano associada à produção de uma matriz extracelular polimérica, que contribui para a organização da comunidade e pode modificar a resposta das bactérias aos antimicrobianos (Saffari Natanzi et al., 2025).

A distinção é essencial para esta revisão porque a maior parte dos estudos selecionados avalia determinantes genéticos de resistência ou atividade antimicrobiana direcionada, e não tolerância ou persistência como desfechos primários. Estudos relacionados a biofilmes podem demonstrar redução de carga bacteriana ou atividade contra comunidades estruturadas, mas esse resultado não deve ser automaticamente interpretado como reversão da resistência antimicrobiana sem demonstração de alteração mensurável da suscetibilidade (Cobb et al., 2019; Saffari Natanzi et al., 2025).

2.3 Mecanismo de ação do CRISPR-Cas9

Na aplicação antimicrobiana, o sistema CRISPR-Cas9 utiliza uma molécula de RNA-guia para direcionar a nuclease Cas9 a uma sequência complementar de DNA. O reconhecimento exige, além da complementaridade com o RNA-guia, a presença de um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM) compatível com a Cas9 empregada. Após o reconhecimento

do alvo, a nuclease promove uma quebra de dupla fita de DNA (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014).

A consequência dessa quebra depende da localização do alvo. Quando ele está no cromossomo bacteriano, o dano ao DNA pode comprometer a viabilidade celular. Quando está em um plasmídeo, a clivagem pode favorecer a perda desse elemento genético ou alterar a função do determinante de resistência, podendo resultar na redução ou perda do fenótipo resistente sem necessariamente eliminar toda a bactéria. Estudos experimentais sustentam essa distinção entre o direcionamento cromossômico e o plasmidial (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Palacios Araya; Palmer; Duerkop, 2021).

Dessa forma, o CRISPR-Cas9 apresenta potencial para interferir tanto na manutenção de elementos genéticos móveis quanto na integridade do material genético bacteriano. No entanto, os resultados dependem das condições experimentais, da localização do alvo e das características do sistema utilizado, sendo necessário considerar essas variáveis ao interpretar os efeitos observados.

2.4 Aplicações diagnósticas e terapêuticas do CRISPR

Além das aplicações terapêuticas, as tecnologias baseadas em CRISPR também têm sido investigadas para fins diagnósticos. O método FLASH, por exemplo, demonstrou a possibilidade de detectar sequências específicas de DNA por meio de uma plataforma baseada em CRISPR. Entretanto, a detecção molecular não equivale à eliminação do agente infeccioso ou à reversão da resistência bacteriana, sendo necessário distinguir o potencial diagnóstico dessas tecnologias de sua aplicação como estratégia antimicrobiana (Quan et al., 2019).

Apesar de compartilharem a utilização de tecnologias relacionadas ao CRISPR, as aplicações diagnósticas e terapêuticas apresentam objetivos distintos. Enquanto as primeiras buscam identificar sequências genéticas específicas, as estratégias antimicrobianas procuram atuar sobre determinantes associados à resistência bacteriana ou interferir na viabilidade das bactérias-alvo. Portanto, a detecção molecular de um gene de resistência não equivale à sua eliminação nem demonstra, por si só, a reversão do fenótipo resistente.

3 MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo e fontes de informação

Foi realizada uma revisão narrativa da literatura com busca estruturada, direcionada às aplicações experimentais do CRISPR-Cas9 no combate à resistência bacteriana. Foram

consultadas as bases PubMed/MEDLINE, ScienceDirect, SciELO e Google Scholar. Para os estudos selecionados, também foram verificadas as páginas dos periódicos e os textos completos disponibilizados pelos autores ou pelas plataformas editoriais, com o objetivo de conferir os dados bibliográficos, os métodos e os resultados apresentados.

A busca da versão revisada foi realizada em setembro de 2026, considerando publicações compreendidas entre 2014 e setembro de 2026. O ano inicial foi definido em razão da publicação dos primeiros estudos experimentais que demonstraram o emprego de nucleases guiadas por RNA como estratégia antimicrobiana de sequência específica.

3.2 Estratégia de busca

Foram utilizados os termos “CRISPR-Cas9”, “CRISPR Cas9”, “Cas9”, “antibiotic resistance”, “antimicrobial resistance”, “multidrug resistance”, “antibiotic-resistant bacteria”, “plasmid curing”, “resensitization”, “phage delivery”, “conjugative delivery”, “blaKPC”, “blaNDM”, “mcr-1”, “blaTEM-1”, “vanA” e “blaCTX-M”.

Os termos foram combinados por meio dos operadores booleanos AND e OR, utilizando-se AND para restringir os resultados pela combinação de diferentes conceitos e OR para reunir termos equivalentes ou relacionados. Como estratégia geral, empregou-se a combinação:

(“CRISPR-Cas9” OR “CRISPR Cas9” OR Cas9) AND (“antibiotic resistance” OR “antimicrobial resistance”) AND (bacteria OR bacterial).

Para estudos relacionados à eliminação de elementos plasmidiais e à ressensibilização bacteriana, utilizou-se também a combinação:

(“CRISPR-Cas9” OR Cas9) AND (“antibiotic resistance”) AND (plasmid OR “plasmid curing” OR resensitization).

Complementarmente, foram utilizados termos relacionados a determinantes específicos de resistência, incluindo blaKPC, blaNDM, mcr-1, blaTEM-1, vanA e blaCTX-M.

3.3 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos estudos experimentais primários publicados entre 2014 e setembro de 2026, em português, inglês ou espanhol, que envolvessem bactérias e utilizassem CRISPR-Cas9 com atividade de nuclease, direcionado a determinantes genéticos associados à resistência bacteriana, localizados no cromossomo ou em elementos plasmidiais. Os estudos deveriam avaliar a eliminação, a inativação ou a alteração funcional desses determinantes ou dos

elementos genéticos que os carregassem, apresentando resultados experimentais relacionados à resposta bacteriana ou à suscetibilidade aos antimicrobianos.

Foram considerados estudos realizados em modelos in vitro, ex vivo e in vivo pré-clínicos. Estratégias de desenvolvimento ou entrega do CRISPR-Cas9 foram consideradas diretamente vinculadas ao direcionamento de um determinante de resistência e acompanhadas de resultados experimentais relacionados ao desfecho bacteriano. Revisões da literatura foram utilizadas como fontes complementares para contextualização e discussão, sem serem contabilizadas como estudos experimentais primários da síntese principal.

Foram excluídos estudos exclusivamente relacionados a Cas12, Cas13, dCas9/CRISPRi ou outros efetores sem análise específica de Cas9 com atividade de nuclease; estudos de edição genética sem relação direta com resistência bacteriana; trabalhos que utilizaram CRISPR-Cas9 exclusivamente para diagnóstico ou detecção de genes de resistência, sem intervenção sobre o determinante ou avaliação de seu efeito sobre a resistência; estudos sem informações suficientes sobre o alvo, a estratégia de entrega ou o desfecho experimental; duplicatas; e revisões, editoriais e cartas quando utilizadas como evidência experimental.

Nos estudos que combinaram Cas9 com CRISPRi foram considerados apenas quando os resultados específicos da Cas9 com atividade de nuclease puderam ser diferenciados daqueles obtidos por CRISPRi.

3.4 Seleção dos estudos e extração dos dados

A seleção ocorreu em quatro etapas: identificação dos registros recuperados nas bases consultadas, triagem dos títulos e resumos, leitura dos textos completos potencialmente elegíveis e inclusão dos estudos que atenderam aos critérios estabelecidos.

Além dos registros recuperados nas bases consultadas, artigos experimentais previamente disponibilizados pelas autoras foram avaliados segundo os mesmos critérios de elegibilidade e incorporados à síntese quando apresentaram evidência direta do uso de CRISPR-Cas9 com atividade de nuclease contra determinantes associados à resistência bacteriana.

Os estudos selecionados foram organizados em uma matriz contendo autor e ano, bactéria avaliada, alvo ou determinante de resistência, sistema CRISPR-Cas9, estratégia de entrega, modelo experimental, principal resultado e contexto experimental.

Ao final do processo de seleção, foram identificados 33 registros, dos quais 18 estudos experimentais primários atenderam aos critérios de elegibilidade e foram incluídos na síntese principal. Adicionalmente, foram utilizados 25 artigos complementares para fundamentação

teórica, contextualização dos mecanismos de resistência bacteriana, biofilmes e sistemas CRISPR-Cas, bem como para discussão das limitações e perspectivas da abordagem. Esses artigos não foram contabilizados como estudos experimentais da síntese principal.

3.5 Síntese dos dados

Os resultados foram sintetizados qualitativamente, considerando as diferenças entre as bactérias avaliadas, os alvos genéticos, as estratégias de entrega, os modelos experimentais e os principais desfechos observados.

O contexto experimental foi descrito de forma qualitativa, distinguindo os estudos realizados exclusivamente in vitro daqueles que também utilizaram modelos animais pré-clínicos. Essa classificação teve caráter descritivo, não correspondendo a uma escala de qualidade metodológica ou de evidência clínica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das evidências experimentais

A literatura experimental analisada demonstra que o CRISPR-Cas9 pode atuar contra a resistência bacteriana por diferentes mecanismos, incluindo a eliminação ou inativação de genes de resistência, a cura ou alteração funcional de plasmídeos, a ressensibilização aos antimicrobianos e a redução seletiva de populações bacterianas resistentes. Entretanto, os resultados variam conforme a espécie bacteriana, o alvo genético, a arquitetura dos elementos genéticos envolvidos, a estratégia de entrega e o modelo experimental utilizado (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Hao et al., 2020; Li et al., 2022).

Os estudos pioneiros de Citorik, Mimee e Lu (2014) e Bikard et al. (2014) estabeleceram as bases experimentais para o emprego de nucleases guiadas por RNA como estratégia antimicrobiana de sequência específica. Citorik, Mimee e Lu (2014) demonstraram o direcionamento de sequências associadas à resistência bacteriana, utilizando diferentes estratégias de entrega, incluindo bacteriófagos e plasmídeos transmissíveis por conjugação. Bikard et al. (2014), por sua vez, demonstraram a atividade de sistemas baseados em Cas9 contra sequências específicas em Staphylococcus aureus, incluindo avaliações em modelo murino.

Estudos posteriores ampliaram a diversidade de bactérias e determinantes genéticos investigados. Rodrigues et al. (2019) utilizaram um plasmídeo conjugativo para entregar CRISPR-Cas9 a Enterococcus faecalis, direcionando os genes ermB e tetM, associados, respectivamente, à resistência à eritromicina e à tetraciclina. Tagliaferri et al. (2020)

investigaram o direcionamento de blaTEM-1 em enterobactérias clínicas, enquanto Wang et al. (2019) e Wan et al. (2020) estudaram o gene mcr-1, associado à resistência à colistina, em Escherichia coli.

Hao et al. (2020) empregaram o sistema pCasCure para direcionar genes associados à produção de carbapenemases, incluindo blaKPC, blaNDM e blaOXA-48. Li et al. (2022) investigaram o direcionamento de blaNDM-5, enquanto Tao et al. (2023a, 2023b) avaliaram, respectivamente, blaKPC-2 e vanA. Nittayasut et al. (2024) investigaram partículas fágicas não replicativas para a entrega de CRISPR-Cas9 direcionado a variantes de blaCTX-M. Mais recentemente, Tagliaferri et al. (2025) avaliaram o direcionamento de blaKPC em um isolado clínico de Klebsiella michiganensis, observando redução da resistência em parte dos transformantes analisados.

Em conjunto, esses estudos mostram que a abordagem foi investigada contra diferentes determinantes genéticos e em distintas espécies bacterianas. Contudo, a diversidade de alvos, estratégias de entrega e desfechos dificulta a comparação direta entre os trabalhos, tornando necessário analisar separadamente a eliminação dos determinantes, a recuperação da suscetibilidade aos antimicrobianos e a atividade antimicrobiana observada nos diferentes modelos.

4.2 Direcionamento de genes e eliminação de determinantes plasmidiais

O direcionamento de elementos plasmidiais constitui uma das aplicações mais diretamente relacionadas ao combate à resistência bacteriana, uma vez que plasmídeos podem carregar genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos. No estudo de Hao et al. (2020), o sistema pCasCure foi utilizado contra determinantes associados à resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias. Os resultados demonstraram a possibilidade de eliminar elementos plasmidiais e reduzir a resistência em condições experimentais específicas. Entretanto, a intervenção também evidenciou limitações relacionadas ao surgimento de variantes de escape, indicando que o direcionamento de um determinante não garante a eliminação de todos os elementos genéticos envolvidos na resistência.

Wang et al. (2019) ampliaram essa discussão ao investigar isolados clínicos de E. coli portadores de múltiplos plasmídeos e do gene mcr-1. O sistema pMBLcas9 permitiu o direcionamento de plasmídeos e do determinante de resistência, com diferentes resultados genéticos, incluindo perda plasmidial, deleção do gene e eventos de recombinação. Esses

achados demonstram que a intervenção pode modificar o material genético bacteriano sem necessariamente promover a cura completa do plasmídeo.

Li et al. (2022) relataram mais de 94% de eliminação de blaNDM-5 nas condições experimentais avaliadas. Além disso, a concentração inibitória mínima (CIM) de meropenem foi reduzida de 16 para 0,06 μg/mL, e o número de transconjugantes foi reduzido em 26 vezes no ensaio de transferência plasmidial. Esses resultados indicam efeitos tanto sobre a suscetibilidade ao antimicrobiano quanto sobre a disseminação horizontal do determinante investigado.

Tao et al. (2023) direcionaram blaKPC-2 em E. coli e observaram a eliminação do plasmídeo portador do gene, acompanhada de redução da resistência ao imipenem. Em outro estudo, Tao et al. (2023) investigaram o direcionamento de vanA, associado à resistência à vancomicina, e relataram a eliminação de plasmídeos portadores do determinante. A interpretação desses resultados deve considerar o modelo experimental e os desfechos efetivamente mensurados, pois a eliminação de um elemento genético não demonstra, isoladamente, a recuperação completa da suscetibilidade bacteriana.

Assim, as evidências indicam que o CRISPR-Cas9 pode interferir na manutenção e na função de elementos plasmidiais associados à resistência. A magnitude do efeito, porém, depende das características do alvo e do contexto genético, sendo importante diferenciar a perda do plasmídeo, a eliminação de um gene específico e a alteração fenotípica da suscetibilidade.

4.3 Ressensibilização bacteriana aos antimicrobianos

A ressensibilização bacteriana representa uma aplicação relevante do CRISPR-Cas9 porque busca recuperar a atividade de antimicrobianos disponíveis por meio da eliminação ou inativação de determinantes genéticos de resistência. Diferentemente de estratégias que visam exclusivamente reduzir a população bacteriana, essa abordagem procura modificar a resposta da bactéria ao tratamento antimicrobiano.

Tagliaferri et al. (2020) investigaram o direcionamento de blaTEM-1, associado à produção da β-lactamase TEM-1. Em um isolado clínico de E. coli, os autores observaram eliminação plasmidial e ressensibilização a cinco β-lactâmicos. Entretanto, a resposta foi menor em Enterobacter hormaechei e Klebsiella variicola, nas quais a presença de outros determinantes de resistência pode ter contribuído para limitar o efeito da intervenção.

Wan et al. (2020) demonstraram a reversão da resistência à colistina após o direcionamento de mcr-1 em isolados clínicos de E. coli. Contudo, os eventos de recombinação

observados indicam que a intervenção pode produzir alterações genéticas complexas e que a resposta obtida deve ser avaliada considerando a possibilidade de surgimento de variantes capazes de manter ou recuperar o fenótipo resistente.

Tagliaferri et al. (2025) evidenciaram limitações semelhantes ao investigar o direcionamento de blaKPC em um isolado clínico de K. michiganensis. Enquanto a linhagem laboratorial utilizada apresentou ressensibilização completa nas condições estudadas, apenas 63% dos transformantes do isolado clínico apresentaram redução da resistência. Os autores também observaram alterações relacionadas ao número de cópias plasmidiais, à expressão de blaKPC e a outros determinantes genéticos, incluindo alterações em ompK36 e mutações em acrB. Esses resultados reforçam que a resistência bacteriana pode depender de múltiplos mecanismos e que a intervenção sobre um único gene pode ser insuficiente para recuperar plenamente a suscetibilidade.

Em conjunto, os estudos demonstram que a ressensibilização é experimentalmente possível, mas não constitui uma consequência automática da edição genética. Para demonstrá-la, são necessários desfechos fenotípicos, como a determinação da CIM e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. A confirmação da eliminação ou alteração de um gene, isoladamente, não comprova que a bactéria voltou a apresentar um perfil suscetível (Tagliaferri et al., 2020; Wan et al., 2020; Tagliaferri et al., 2025).

4.4 Estratégias de entrega: plasmídeos conjugativos

Os plasmídeos conjugativos têm sido investigados como veículos para introduzir sistemas CRISPR-Cas9 em populações bacterianas. Rodrigues et al. (2019) utilizaram um plasmídeo conjugativo responsivo a feromônio para entregar o sistema a E. faecalis, direcionando genes associados à resistência e promovendo a redução seletiva de populações resistentes em ensaios de competição. Em modelo murino de colonização intestinal, a estratégia reduziu a ocorrência de E. faecalis resistente à eritromicina. O estudo demonstra a relevância da entrega conjugativa em um contexto biológico, embora a eficiência da estratégia também dependa da frequência de transferência do sistema para as bactérias-alvo.

Li et al. (2022) também utilizaram elementos de transferência conjugativa para entregar CRISPR-Cas9 direcionado a blaNDM-5. Além de promover alterações no determinante investigado, a estratégia reduziu a transferência plasmidial nas condições experimentais avaliadas. Esse resultado evidencia que a abordagem pode interferir tanto na bactéria portadora do gene quanto na disseminação horizontal do elemento genético associado à resistência.

Apesar desse potencial, a utilização de plasmídeos conjugativos exige atenção à distribuição e à persistência do vetor. A capacidade de transferência para diferentes células bacterianas pode representar uma limitação quando a entrega não ocorre exclusivamente na população pretendida. Por isso, a avaliação dessa estratégia deve considerar, além da eficiência de transferência, a especificidade de hospedeiro, a estabilidade do sistema e os mecanismos de contenção (Rodrigues et al., 2019; Sünderhauf et al., 2023; Mayorga-Ramos et al., 2023).

4.5 Estratégias de entrega: bacteriófagos e fagemídeos

Bacteriófagos e fagemídeos foram investigados como veículos para a entrega de sistemas CRISPR-Cas9 devido à sua capacidade de interagir com hospedeiros bacterianos específicos. Citorik, Mimee e Lu (2014) demonstraram a utilização de diferentes estratégias de entrega, incluindo bacteriófagos e plasmídeos transmissíveis. Bikard et al. (2014) também demonstraram atividade de sistemas baseados em Cas9 contra sequências específicas em S. aureus, incluindo avaliações em modelo murino.

Huan et al. (2023) utilizaram um fagemídeo derivado do bacteriófago P1 para entregar CRISPR-Cas9 direcionado a sequências cromossômicas de Shigella flexneri. Em um modelo de infecção em larvas de zebrafish, a intervenção reduziu a carga bacteriana e aumentou a sobrevivência dos animais. Entretanto, como o estudo não teve como objetivo principal a eliminação de um determinante genético específico de resistência, seus resultados devem ser interpretados como evidência de entrega e atividade antimicrobiana direcionada, e não como demonstração direta de ressensibilização aos antimicrobianos.

Cobb et al. (2019) avaliaram um bacteriófago modificado com CRISPR-Cas9 contra S. aureus em modelos relacionados à formação de biofilme, infecção de tecido mole e osteomielite. O sistema apresentou atividade contra biofilme e reduziu a infecção de tecido mole, mas não reduziu a infecção óssea nas condições experimentais avaliadas. Esse resultado evidencia que a atividade observada em um modelo específico não pode ser automaticamente extrapolada para outros sítios de infecção.

As estratégias baseadas em fagos também apresentam limitações relacionadas ao espectro de hospedeiros, ao acesso às populações bacterianas, à neutralização do vetor e à possibilidade de resistência ao próprio bacteriófago. Portanto, o veículo de entrega deve ser considerado parte integrante da intervenção, pois suas características podem influenciar diretamente a distribuição e a efetividade do sistema CRISPR-Cas9 (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Huan et al., 2023; Mayorga-Ramos et al., 2023).

4.6 Estratégias de entrega: nanocomplexos

Kang et al. (2017) desenvolveram um nanocomplexo não viral constituído por Cas9 modificada com um polímero catiônico e RNA-guia, direcionado ao gene mecA, associado à resistência à meticilina em Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA). Os autores avaliaram a formação do nanocomplexo, a manutenção da atividade endonuclease e a eficiência de edição, apresentando resultados favoráveis em comparação com formulações utilizadas como referência no estudo.

Esses achados fornecem evidência experimental para o desenvolvimento de estratégias não virais de entrega do CRISPR-Cas9. Entretanto, os resultados permanecem no âmbito da demonstração laboratorial e não estabelecem, por si só, a viabilidade clínica da plataforma.

A aplicação de nanocomplexos ainda exige investigação sobre toxicidade, estabilidade, biodistribuição, penetração nos tecidos e eficiência de entrega em ambientes biologicamente complexos. Esses fatores podem modificar o desempenho observado em condições laboratoriais e precisam ser considerados antes de qualquer extrapolação para aplicações terapêuticas (Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

4.7 CRISPR-Cas9, biofilmes e infecções complexas

Biofilmes podem dificultar o tratamento por alterações metabólicas, matriz extracelular e heterogeneidade espacial. Entretanto, o fato de uma bactéria formar biofilme não significa necessariamente que ela seja geneticamente resistente ao antimicrobiano. (Cobb et al. 2019) fornecem uma evidência específica de atividade de um bacteriófago modificado com CRISPR-Cas9 contra biofilme de S. aureus, mas a ausência de efeito sobre a infecção óssea impede uma generalização para todas as infecções profundas.

Portanto, para aplicações clínicas em cateteres, próteses, feridas ou outros sítios com biofilme, o desfecho deve incluir penetração do vetor, redução de carga bacteriana e recuperação do tecido, e não apenas atividade de clivagem ou redução de células em condições laboratoriais.

4.8 Mecanismos de escape e resistência ao próprio CRISPR-Cas9

A utilização do CRISPR-Cas9 pode exercer pressão seletiva sobre as populações bacterianas e favorecer a sobrevivência de variantes capazes de escapar à intervenção. Entre os mecanismos possíveis estão alterações na sequência-alvo, modificações no motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), perda ou alteração de componentes do sistema e recombinação do elemento genético direcionado.

Wang et al. (2019) observaram eventos de recombinação durante o direcionamento de mcr-1. Uribe et al. (2021) investigaram experimentalmente a resistência bacteriana a antimicrobianos baseados em CRISPR-Cas, demonstrando que o escape constitui uma limitação relevante dessa abordagem. Tagliaferri et al. (2025), por sua vez, identificaram alterações genéticas em um isolado clínico de K. michiganensis após o direcionamento de blaKPC, reforçando a complexidade das respostas observadas em contextos genéticos clínicos.

Além das alterações no alvo, proteínas anti-CRISPR podem interferir na atividade de sistemas CRISPR-Cas. Revisões especializadas discutem esses mecanismos entre as barreiras que devem ser consideradas no desenvolvimento de antimicrobianos baseados nessa tecnologia (Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026). O direcionamento simultâneo de mais de uma sequência pode aumentar a barreira genética ao escape, mas também eleva a complexidade do sistema e de sua entrega.

Dessa forma, a resistência ao próprio CRISPR-Cas9 deve ser considerada um desfecho relevante nos estudos experimentais. A investigação de clones sobreviventes, de alterações nas sequências-alvo e no PAM, da integridade do sistema Cas9/RNA-guia e da eventual recuperação do fenótipo resistente pode contribuir para compreender a estabilidade da resposta à intervenção (Uribe et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2023).

4.9 Evidência em modelos animais e limites de extrapolação

Os modelos animais acrescentam informações sobre a entrega do CRISPR-Cas9, sua interação com o ambiente biológico e seus efeitos antimicrobianos em condições que não podem ser reproduzidas integralmente em culturas bacterianas. Contudo, resultados pré-clínicos não estabelecem, isoladamente, a eficácia ou a segurança da estratégia em seres humanos.

Rodrigues et al. (2019) avaliaram a entrega conjugativa de CRISPR-Cas9 em um modelo murino de colonização intestinal por E. faecalis, direcionando os genes ermB e tetM. No modelo intestinal, a estratégia direcionada a ermB reduziu a ocorrência de enterococos resistentes à eritromicina. Entretanto, a eficiência global também dependeu da frequência de transferência conjugativa, demonstrando que a entrega constitui um fator determinante para o resultado.

Cobb et al. (2019) avaliaram um bacteriófago modificado com CRISPR-Cas9 em modelos de infecção por S. aureus. No modelo animal, o tratamento com o bacteriófago, isoladamente ou associado à fosfomicina, reduziu a infecção de tecido mole, mas não promoveu redução da infecção óssea nas condições testadas. O estudo fornece evidência pré-clínica sobre a utilização de bacteriófagos como veículos de entrega e sobre a atividade antimicrobiana em

determinados contextos, mas não demonstra diretamente a reversão de um determinante específico de resistência.

Huan et al. (2023) utilizaram um fagemídeo derivado do bacteriófago P1 para direcionar CRISPR-Cas9 a sequências cromossômicas de Shigella flexneri. Em larvas de zebrafish infectadas, a estratégia reduziu a carga bacteriana e aumentou a sobrevivência dos animais. Entretanto, como o estudo avaliou o direcionamento de uma sequência cromossômica para obter atividade antimicrobiana, seus resultados não devem ser interpretados como demonstração direta de eliminação de um determinante de resistência ou de ressensibilização aos antimicrobianos.

Em conjunto, esses estudos mostram que os modelos animais podem ampliar a compreensão sobre o comportamento das estratégias de entrega e seus efeitos em organismos vivos. Ainda assim, os modelos utilizados são heterogêneos e os desfechos não são equivalentes. A redução da carga bacteriana, a sobrevivência dos animais e a recuperação da suscetibilidade aos antimicrobianos representam resultados distintos e devem ser interpretados separadamente.

4.10 Síntese crítica das evidências

Considerados em conjunto, os estudos experimentais analisados demonstram que o CRISPR-Cas9 apresenta potencial para interferir diretamente em determinantes genéticos associados à resistência bacteriana. As estratégias avaliadas incluíram o direcionamento de genes de resistência localizados em plasmídeos ou no cromossomo, a eliminação ou alteração funcional de elementos genéticos que carregam esses determinantes e, consequentemente, a redução da resistência ou a recuperação parcial da suscetibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, os resultados não foram uniformes entre os estudos, indicando que a atividade do sistema não depende apenas da presença do alvo, mas também de suas características genéticas e da capacidade de entregar o CRISPR-Cas9 à bactéria-alvo (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Tagliaferri et al., 2020; Hao et al., 2020).

A variabilidade dos resultados torna-se particularmente evidente nos estudos realizados com diferentes espécies bacterianas e isolados clínicos. A eliminação de um determinante de resistência pode resultar em ressensibilização quando esse determinante representa um componente importante do fenótipo resistente; entretanto, a presença de outros mecanismos pode limitar ou modificar o efeito obtido. Além disso, alterações no alvo, escape genético e diferenças na eficiência de entrega podem reduzir a resposta ao sistema CRISPR-Cas9 (Wang et al., 2019; Uribe et al., 2021; Tagliaferri et al., 2025).

Outro aspecto importante é a predominância de evidências obtidas em modelos experimentais, especialmente in vitro. Embora alguns estudos tenham avançado para modelos animais, as estratégias de entrega, os organismos avaliados e os desfechos utilizados são heterogêneos. Além disso, nem todos os trabalhos demonstram diretamente a reversão da resistência: alguns contribuem principalmente para compreender a entrega do sistema, sua atividade antimicrobiana ou sua ação contra biofilmes.

Portanto, as evidências disponíveis sustentam a viabilidade experimental do CRISPR-Cas9 como estratégia de direcionamento específico contra bactérias resistentes, mas ainda não permitem estabelecer sua eficácia clínica ou definir uma estratégia generalizável para diferentes espécies e contextos de resistência. A interpretação dos resultados deve considerar não apenas a confirmação molecular da intervenção, mas também a suscetibilidade fenotípica, a frequência de escape, a eficiência de entrega e os efeitos observados em modelos biologicamente complexos.

Tabela 1 – Principais evidências experimentais do CRISPR-Cas9 no combate à resistência bacteriana

Estudo / bactéria	Alvo ou determinante	Sistema / modelo	Principais resultados
Citorik; Mimee; Lu (2014) E. coli e outras bactérias-alvo	blaNDM-1; blaSHV-18 e outros alvos	Nucleases guiadas por RNA; bacteriófagos e bactérias com plasmídeos conjugativos; In vitro	Nucleases guiadas por RNA; bacteriófagos e bactérias com plasmídeos conjugativos
Bikard D, et al. (2014) S. aureus	Genes de resistência e plasmídeos de resistência	Cas9/RNA-guia; fagemídeo; In vitro + modelo murino	Direcionamento seletivo de sequências de resistência e atividade in vivo em modelo murino
Kim JS, et al. (2016) E. coli produtora de ESBL	Genes TEM/SHV associados a ESBL	CRISPR-Cas9; entrega do sistema conforme o modelo experimental; In vitro	Direcionamento dos determinantes de ESBL e ressensibilização de bactérias resistentes a β-lactâmicos
Kang YK, et al. (2017) S. aureus resistente à meticilina (MRSA)	mecA	Nanocomplexo Cas9-polímero + RNA-guia; In vitro	Entrega não viral de Cas9 e edição direcionada de mecA em MRSA
Rodrigues M, et al. (2019) Enterococcus faecalis	ermB; tetM	Cas9; plasmídeo conjugativo responsivo a feromônio; In vitro + colonização intestinal murina	Redução seletiva de enterococos resistentes e perda do determinante direcionado
Wang P, et al. (2019) E. coli clínico	mcr-1 e múltiplos plasmídeos	pMBLcas9; conjugação; Isolados clínicos in vitro	Direcionamento de plasmídeos, com perda plasmidial, deleção de mcr-1 e eventos de recombinação
Tagliaferri TL, et al. (2020) E. coli; E. hormaechei; K. variicola	blaTEM-1	Cas9; direcionamento plasmidial; In vitro + Galleria mellonella	Eliminação/alteração funcional do determinante e ressensibilização, com resposta variável
Wan P, et al. (2020) E. coli clínico	mcr-1	Cas9; plasmídeo pMBLcas9; In vitro	Eliminação de plasmídeos portadores de mcr-1, ressensibilização à colistina e identificação de variantes de escape
Hao M, et al. (2020) Enterobacteriaceae clínicas	blaKPC; blaNDM; blaOXA-48	pCasCure; Isolados clínicos in vitro	Cura de plasmídeos/determinantes e redução da resistência aos

Estudo / bactéria	Alvo ou determinante	Sistema / modelo	Principais resultados
			carbapenêmicos; ocorrência de escape
Uribe RV, et al. (2021) E. coli	Alvos de antimicrobianos CRISPR-Cas	CRISPR-Cas9; In vitro	Caracterização experimental de mecanismos de resistência/escape ao CRISPR-Cas9
Li P, et al. (2022) E. coli	blaNDM-5	Cas9; plasmídeos com oriT/conjugação; In vitro	>94% de eliminação nas condições avaliadas; redução da CIM de meropenem e da transferência plasmidial
Walflor HSM, et al. (2022) E. coli	fosA3	CRISPR-Cas9; pRE-FOSA3; In vitro	Ressensibilização à fosfomicina; gRNA_195 apresentou 100% de eficiência no modelo estudado
Tao S, et al. (2023a) E. coli modelo	blaKPC-2	Cas9; plasmídeo pCas9; In vitro	Eliminação do plasmídeo e redução da resistência ao imipenem
Tao S, et al. (2023b) E. coli; isolado clínico de E. faecium	vanA	Cas9; transformação/conjugação; In vitro	Eliminação do plasmídeo e redução da resistência associada a vanA; limitações do modelo para demonstrar ressensibilização completa
Sünderhauf D, et al. (2023) E. coli, coliformes e Pseudomonas spp.	Plasmídeo AMR/aacC1	CRISPR-Cas9 móvel de amplo espectro; conjugação; In vitro	Remoção direcionada de plasmídeos de resistência e interferência na aquisição de plasmídeos
Nittayasut N, et al. (2024) E. coli K-12	blaCTX-M-15/-55 e -14/-27/-65/-90	Cas9; partículas de fago não replicativas; In vitro	Redução da fração de células resistentes e ressensibilização dependente das condições de entrega
Tagliaferri TL, et al. (2025) K. michiganensis clínico + E. coli laboratorial	blaKPC	Cas9; plasmídeo de edição; In vitro; isolado clínico	Ressensibilização completa no modelo laboratorial e redução da resistência em parte dos transformantes clínicos
Zhao R, et al. (2026) E. coli clínica multirresistente	acrB	CRISPR-Cas9 + CRISPRi; In vitro	A deleção de acrB por Cas9 apresentou efeito sobre a suscetibilidade; resultados exclusivos de CRISPRi não foram tratados como evidência de Cas9

Fonte: DINIZ ES, et al., 2026.

4.11 Diagnóstico e seleção do alvo

Uma possível trajetória translacional é integrar diagnóstico molecular e terapia dirigida. A identificação do patógeno e de seus determinantes de resistência pode orientar a escolha do alvo do RNA-guia e reduzir o risco de direcionamento inadequado. O método FLASH, baseado em Cas9, demonstra que a plataforma também pode ser utilizada para enriquecimento e detecção de sequências relacionadas à resistência (Quan et al., 2019). Entretanto, diagnóstico e tratamento são aplicações distintas e devem ser avaliados separadamente.

4.12 Isolados clínicos e medicina de precisão

Os resultados de (Wang et al. 2019; Tagliaferri et al. 2020; Tagliaferri et al. 2025) mostram que a resposta ao CRISPR-Cas9 pode variar entre cepas laboratoriais e isolados clínicos. A presença de múltiplos plasmídeos e de mecanismos adicionais de resistência pode reduzir o efeito de um único RNA-guia. Por isso, a microbiologia clínica pode ter papel central na caracterização genotípica e fenotípica do isolado antes da seleção do alvo.

4.13 Combinação com antibióticos

Uma possibilidade particularmente relevante é utilizar o CRISPR-Cas9 para remover ou inativar determinantes genéticos de resistência e, posteriormente, avaliar a recuperação da atividade de antimicrobianos já disponíveis. Estudos direcionados a blaNDM-5, blaTEM-1, blaKPC-2 e mcr-1 demonstraram alterações na suscetibilidade bacteriana após a intervenção, incluindo redução de valores de concentração mínima inibitória e ressensibilização aos antimicrobianos correspondentes (Li et al., 2022; Tagliaferri et al., 2020; Tao et al., 2023; Wan et al., 2020). A avaliação dessa estratégia deve considerar desfechos fenotípicos e microbiológicos, como concentração mínima inibitória, resposta ao antimicrobiano, frequência de escape e estabilidade da ressensibilização, uma vez que a confirmação molecular da edição não demonstra, isoladamente, a recuperação da suscetibilidade bacteriana.

4.14 Segurança ecológica e microbiota

A especificidade de sequência do CRISPR-Cas9 constitui uma característica potencialmente favorável para o desenvolvimento de antimicrobianos de precisão, mas não é suficiente, isoladamente, para estabelecer segurança ecológica. A efetividade e a seletividade da intervenção dependem da escolha do RNA-guia, da especificidade do alvo e da estratégia empregada para a entrega do sistema. Essa questão é particularmente relevante quando são utilizados veículos capazes de alcançar diferentes populações bacterianas, como plasmídeos conjugativos e bacteriófagos, cuja distribuição e capacidade de disseminação devem ser consideradas durante o desenvolvimento da estratégia (Sünderhauf et al., 2023).

Nesse contexto, estudos translacionais devem ampliar a avaliação para além da bactéria-alvo, considerando a especificidade do sistema, a persistência e a distribuição do vetor e possíveis efeitos sobre comunidades microbianas. A avaliação em ambientes biologicamente mais complexos é necessária antes de extrapolar resultados obtidos em culturas bacterianas para aplicações terapêuticas (Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

4.15 Regulamentação e padronização

Uma futura aplicação clínica exigirá critérios de qualidade e potência do produto, estabilidade do sistema, controle de impurezas, rastreabilidade e avaliação de segurança. Também será necessário estabelecer se as mudanças no alvo ou no RNA-guia serão validadas. A literatura recente destaca que a heterogeneidade dos sistemas dificulta a comparação direta entre estudos e que ainda são necessários modelos translacionais padronizados (Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

4.16 Limitações, riscos e barreiras à tradução

Apesar dos resultados experimentais promissores, a aplicação do CRISPR-Cas9 no combate à resistência bacteriana ainda enfrenta limitações que dificultam sua transição para a prática clínica. Uma das principais barreiras é a entrega do sistema, que precisa alcançar o foco infeccioso, atingir a bactéria de interesse e introduzir os componentes necessários para reconhecer e clivar a sequência-alvo. A eficiência dessa etapa pode variar conforme a espécie bacteriana, a cepa, o tipo de vetor utilizado e as condições do ambiente biológico, de modo que resultados obtidos em culturas laboratoriais não garantem o mesmo desempenho em organismos vivos (Mayorga-Ramos et al., 2023).

Outra limitação está relacionada à heterogeneidade genética dos isolados clínicos. Uma mesma espécie pode apresentar diferentes genes de resistência, múltiplos plasmídeos e mecanismos adicionais, como alterações de permeabilidade e aumento do efluxo. Dessa forma, o direcionamento de um único determinante pode não ser suficiente para recuperar completamente a suscetibilidade aos antimicrobianos. Os resultados obtidos em isolados clínicos reforçam a importância de avaliar a resposta de cada modelo bacteriano e de evitar a generalização de resultados observados em cepas laboratoriais (Tagliaferri et al., 2020; Tagliaferri et al., 2025).

A evolução bacteriana também representa uma barreira relevante. Alterações na sequência-alvo ou no motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), recombinações genéticas e modificações em elementos plasmidiais podem reduzir o reconhecimento pelo sistema ou favorecer o surgimento de variantes capazes de escapar à intervenção. Além disso, proteínas anti-CRISPR podem interferir na atividade de determinados sistemas CRISPR-Cas. Por isso, a frequência de escape, a estabilidade do efeito e a possível recuperação do fenótipo resistente devem ser considerados nos estudos experimentais, especialmente quando se avalia a

possibilidade de intervenções repetidas (Wang et al., 2019; Uribe et al., 2021; Mayorga-Ramos et al., 2023).

A segurança constitui outra questão fundamental. Embora a especificidade do RNA-guia favoreça o direcionamento de sequências definidas, ela não garante, isoladamente, ausência de efeitos não intencionais ou de impactos sobre a microbiota. A distribuição do vetor, sua persistência e a possibilidade de alcançar bactérias não alvo precisam ser avaliadas de acordo com a estratégia de entrega utilizada. Também são necessários estudos sobre a resposta do hospedeiro, a toxicidade dos sistemas de entrega e os possíveis efeitos decorrentes da exposição em ambientes biológicos complexos (Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

Por fim, permanece uma distância importante entre a demonstração de atividade experimental e a comprovação de eficácia terapêutica em pacientes. Os estudos analisados apresentam resultados principalmente em culturas bacterianas e modelos pré-clínicos, que não reproduzem integralmente a complexidade das infecções humanas. A confirmação da edição ou da perda de um plasmídeo também não demonstra, por si só, a recuperação da suscetibilidade antimicrobiana nem a resolução da infecção. A progressão para aplicações clínicas dependerá, portanto, de estudos que avaliem simultaneamente a eficiência da entrega, a resposta fenotípica, a segurança, a estabilidade dos resultados e a eficácia em modelos biológicos progressivamente mais complexos (Cobb et al., 2019; Rodrigues et al., 2019; Mayorga-Ramos et al., 2023; Wizrah, 2026).

Diante dessas limitações, o CRISPR-Cas9 deve ser considerado, no estágio atual das evidências analisadas, uma estratégia experimental promissora e potencialmente complementar aos antimicrobianos convencionais. Sua incorporação à prática clínica dependerá da superação das barreiras de entrega, da avaliação sistemática dos mecanismos de escape e da demonstração de segurança e benefício terapêutico em estudos translacionais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As evidências experimentais analisadas nesta revisão demonstram que o CRISPR-Cas9 apresenta potencial como estratégia antimicrobiana direcionada para o combate à resistência bacteriana. Os estudos investigados demonstraram a possibilidade de atingir determinantes genéticos específicos, promover a eliminação ou alteração funcional de plasmídeos e, em determinadas condições, reduzir a resistência e restaurar a suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos (Citorik; Mimee; Lu, 2014; Bikard et al., 2014; Li et al., 2022; Wan et al., 2020).

Os resultados também evidenciam que a eficiência da estratégia não é uniforme, pois depende de fatores como a espécie bacteriana, o determinante selecionado, a organização dos elementos genéticos, a estratégia de entrega e a presença de mecanismos adicionais de resistência. Os estudos com isolados clínicos reforçam essa variabilidade e demonstram que os resultados obtidos em modelos laboratoriais simplificados não devem ser generalizados para contextos clínicos sem validação específica (Tagliaferri et al., 2020; Tagliaferri et al., 2025).

Entre as principais limitações identificadas estão a dificuldade de entrega do sistema às bactérias-alvo, a possibilidade de emergência de mecanismos de escape, os riscos relacionados à segurança e à microbiota e a necessidade de padronização dos métodos de avaliação. Além disso, a eliminação ou modificação de um determinante genético não garante, isoladamente, a recuperação completa da suscetibilidade antimicrobiana ou a resolução da infecção. Esses aspectos reforçam a importância de avaliar os resultados moleculares em conjunto com desfechos fenotípicos e microbiológicos.

No âmbito da microbiologia clínica, o CRISPR-Cas9 representa uma possibilidade de desenvolvimento de intervenções de precisão, potencialmente complementares à antibioticoterapia convencional. Entretanto, sua aplicação terapêutica ainda depende do avanço dos estudos translacionais, da demonstração de segurança e eficácia em modelos biológicos mais complexos e, posteriormente, de validação clínica adequada.

Conclui-se que o CRISPR-Cas9 constitui uma abordagem experimental promissora para o enfrentamento da resistência bacteriana, mas as evidências disponíveis ainda não permitem considerá-lo um substituto estabelecido dos antimicrobianos convencionais. O avanço dessa tecnologia dependerá da superação das limitações identificadas e da produção de evidências consistentes que sustentem sua futura aplicação na prática clínica.

REFERÊNCIAS

BIKARD D, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nature Biotechnology, New York, v. 32, n. 11, p. 1146-1150, nov. 2014.

CITORIK RJ, MIMEE M, LU TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nature Biotechnology, New York, v. 32, n. 11, p. 1141-1145, nov. 2014.

COBB LH, et al. CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of Staphylococcus aureus induced osteomyelitis and soft tissue infection. PLoS ONE, San Francisco, v. 14, n. 11, e0220421, 2019.

HAO M, et al. CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, v. 64, n. 9, e00843-20, 2020.

HUAN YW, et al. P1 bacteriophage-enabled delivery of CRISPR-Cas9 antimicrobial activity against Shigella flexneri. ACS Synthetic Biology, Washington, DC, v. 12, n. 3, p. 709-721, mar. 2023.

KANG YK, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. Bioconjugate Chemistry, Washington, DC, v. 28, n. 4, p. 957-967, abr. 2017.

KIM JS, et al. CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant Escherichia coli harboring extended-spectrum β-lactamases. Journal of Microbiology and Biotechnology, Seoul, v. 26, n. 2, p. 394-401, fev. 2016.

LI P, et al. Targeted elimination of blaNDM-5 gene in Escherichia coli by conjugative CRISPR-Cas9 system. Infection and Drug Resistance, Auckland, v. 15, p. 1707-1716, 2022.

MAYORGA-RAMOS A, et al. CRISPR-Cas-based antimicrobials: design, challenges, and bacterial mechanisms of resistance. ACS Infectious Diseases, Washington, DC, v. 9, n. 7, p. 1283-1302, jul. 2023.

MURRAY CJL, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, London, v. 399, n. 10325, p. 629-655, fev. 2022.

NITTAYASUT N, et al. Non-replicative phage particles delivering CRISPR-Cas9 to target major blaCTX-M variants. PLoS ONE, San Francisco, v. 19, n. 5, e0303555, maio 2024.

PALACIOS ARAYA D, PALMER KL, DUERKOP BA. CRISPR-based antimicrobials to obstruct antibiotic-resistant and pathogenic bacteria. PLoS Pathogens, San Francisco, v. 17, n. 7, e1009672, jul. 2021.

QUAN J, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 47, n. 14, e83, ago. 2019.

RODRIGUES M, et al. Conjugative delivery of CRISPR-Cas9 for the selective depletion of antibiotic-resistant enterococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, v. 63, n. 11, e01454-19, nov. 2019.

SAFFARI NATANZI A, et al. Innovative approaches to combat antibiotic resistance: integrating CRISPR/Cas9 and nanoparticles against biofilm-driven infections. BMC Medicine, London, v. 23, n. 1, art. 486, ago. 2025.

SÜNDERHAUF D, et al. Removal of AMR plasmids using a mobile, broad host-range CRISPR-Cas9 delivery tool. Microbiology, Reading, v. 169, n. 5, art. 001334, maio 2023.

TAGLIAFERRI TL, et al. Exploring the potential of CRISPR-Cas9 under challenging conditions: facing high-copy plasmids and counteracting beta-lactam resistance in clinical strains of Enterobacteriaceae. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 11, art. 578, abr. 2020.

TAGLIAFERRI TL, et al. CRISPR-Cas9 targeting the blaKPC gene in a clinical isolate of Klebsiella michiganensis: reduction of imipenem resistance and changes in genomic carbapenem resistance determinants. PLoS ONE, San Francisco, v. 20, n. 8, e0328521, ago. 2025.

TAO S, et al. Elimination of blaKPC-2-mediated carbapenem resistance in Escherichia coli by CRISPR-Cas9 system. BMC Microbiology, London, v. 23, art. 310, 2023a.

TAO S, et al. Targeted elimination of vancomycin resistance gene vanA by CRISPR-Cas9 system. BMC Microbiology, London, v. 23, art. 380, 2023b.

URIBE RV, et al. Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials. Scientific Reports, London, v. 11, art. 17267, ago. 2021.

VIVEKANANDAN KE, KUMAR PV, JAYSREE RC, RAJESHWARI T. Exploring molecular mechanisms of drug resistance in bacteria and progressions in CRISPR/Cas9-based genome expurgation solutions. Global Medical Genetics, Amsterdam, v. 12, n. 2, art. 100042, fev. 2025.

WALFLOR HSM, et al. Resensitization of fosfomycin-resistant Escherichia coli using the CRISPR system. International Journal of Molecular Sciences, Basel, v. 23, n. 16, art. 9175, ago. 2022.

WAN P, et al. Reversal of mcr-1-mediated colistin resistance in Escherichia coli by CRISPR-Cas9 system. Infection and Drug Resistance, Auckland, v. 13, p. 1171-1178, 2020.

WANG P, et al. Eliminating mcr-1-harbouring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/Cas9 system. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford, v. 74, n. 9, p. 2559-2565, set. 2019.

WIZRAH MSI. CRISPR-Cas systems as next-generation antimicrobials: a systemic review of mechanisms, delivery strategies, and translational challenges. Frontiers in Microbiology, Lausanne, v. 17, art. 1747931, 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2024.

ZHAO R, et al. Harnessing CRISPR-Cas9 and CRISPRi systems to reverse antibiotic resistance in a clinical multidrug-resistant Escherichia coli isolate. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Oxford, 2026.