TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

EFEITOS E IMPACTOS DA EDIÇÃO GÊNICA MEDIADA PELA TÉCNICA DE CRISPR/Cas9 NO MECANISMO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA BACTÉRIA *Klebsiella pneumoniae*: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Gabriela Montenegro Ayres Gil Lemos[1]
Fernanda Nomiyama Figueiredo[2]

RESUMO

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é considerada como um microrganismo altamente oportunista, virulento e multirresistente, comumente atrelado a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo um dos principais causadores de infecções secundárias dentro de ambientes hospitalares. Devido à capacidade da *K. pneumoniae* de adquirir e transmitir genes de resistência a antimicrobianos (RAM), o desenvolvimento de cepas multirresistentes, como a *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, é altamente favorecido, característica que torna esse microrganismo uma preocupação crescente para a saúde pública. Tendo em vista a necessidade eminente de combater a RAM, atrelada à ineficácia de inúmeros antimicrobianos no tratamento de cepas multirresistentes, o presente trabalho visa elucidar, através de uma revisão de literatura, os efeitos e impactos da edição gênica mediada pela técnica de CRISPR/Cas9 na diminuição da RAM da *Klebsiella pneumoniae*, de forma a contribuir para a redução de infecções de cunho hospitalar. Como resultado, observou-se que a utilização da CRISPR/Cas9 na mitigação da RAM de outros microrganismos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, obteve êxito. Entretanto, estudos específicos que relatam a aplicação desta técnica voltada para a redução da RAM da *Klebsiella pneumoniae* ainda estão em estágio inicial de desenvolvimento, com exceção de algumas pesquisas que já apresentam resultados promissores para tal finalidade. Diante desse cenário, conclui-se que o desenvolvimento de mais pesquisas que explorem a aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 na redução da RAM da *K. pneumoniae* poderão contribuir substancialmente para a diminuição da resistência a antimicrobianos, bem como do índice de infecções hospitalares associadas, mitigando a elevada prevalência e letalidade do microrganismo em questão.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, sistema CRISPR/Cas9, Resistência a Antimicrobianos (RAM) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC.

[1]Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - CEUB.
[2]Professora do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - CEUB.

ABSTRACT

The bacterium *Klebsiella pneumoniae* is considered to be a highly opportunistic, virulent and multidrug-resistant microorganism that is commonly associated with healthcare-associated infections (HAIs) and is a major cause of secondary infections in hospitals. The ability of *K. pneumoniae* to acquire and transfer antimicrobial resistance (AMR) genes strongly favors the development of multidrug-resistant strains, such as KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, making this microorganism a growing public health concern. Given the urgent need to combat AMR, coupled with the ineffectiveness of numerous antimicrobial agents in the treatment of multidrug-resistant strains, this study aims to elucidate, through a literature review, the effects and impact of gene editing mediated by the CRISPR/Cas9 technique in reducing AMR of *Klebsiella pneumoniae*, in order to contribute to the reduction of hospital-acquired infections. As a result, the use of CRISPR/Cas9 to mitigate AMR in other microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, has been observed to be successful. However, specific studies reporting on the application of this technique to reduce the AMR of *Klebsiella pneumoniae* are still at an early stage of development, with the exception of a few studies that already show promising results for this purpose. Given this scenario, it can be concluded that the development of further research exploring the application of the CRISPR/Cas9 technique to reduce AMR of *K. pneumoniae* could significantly contribute to reducing antimicrobial resistance and the rate of associated hospital-acquired infections, thereby mitigating the high prevalence and lethality of the microorganism in question.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, CRISPR/Cas9 system, Antimicrobial Resistance (AMR) and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é definida como um bacilo do tipo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, amplamente distribuída na natureza e no trato gastrointestinal de seres humanos e animais. *K. pneumoniae* é um microrganismo considerado altamente oportunista, virulento e multirresistente, diretamente atrelado às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo um dos principais causadores de infecções secundárias dentro de ambientes hospitalares. Pacientes imunossuprimidos ou debilitados são especialmente suscetíveis a infecções adquiridas no hospital, seja devido à colonização por cepas do ambiente ou após procedimentos invasivos, característica que possibilita a invasão do microrganismo em questão (PROCOP et. al, 2018). A capacidade desta bactéria de adquirir e transmitir genes de resistência a antimicrobianos (RAM) contribui para a emergência de cepas multirresistentes, como é o caso da *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC. Devido à síntese de um tipo enzimático específico, denominado KPC, esta classe de *Klebsiella* apresenta rápida disseminação e elevada letalidade (KAMRUZZAMAN; IREDELL, 2020; ALVIM; COUTO; GAZZIELLI, 2019). Tais fatores evidenciam que a *K. pneumoniae* representa uma ameaça significativa à saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares, onde a taxa de infecções por cepas resistentes aumenta substancialmente (MEHDI et. al, 2023).

A resistência a antimicrobianos (RAM) é considerada um dos maiores desafios enfrentados por parte da saúde pública atualmente, representando uma séria ameaça à vida humana em escala global. Embora o desenvolvimento da RAM seja um fenômeno natural entre os microrganismos, o uso indevido de antimicrobianos, juntamente a práticas ineficientes de prevenção de infecções, são considerados como os principais causadores do desenvolvimento de patógenos resistentes, responsáveis por promover infecções de difícil tratamento, especialmente em ambientes hospitalares (BRASIL, 2019; SAVARD; PERL, 2012). Em 2022, um estudo realizado pela *Antimicrobial Resistance Collaborators* (ARC) estimou que a RAM foi responsável por 1.27 milhões de mortes em todo o mundo, além de contribuir para outras 4.95 milhões de mortes em 2019. Notavelmente, a *Klebsiella pneumoniae* foi identificada como o terceiro patógeno mais letal, estando a *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC relacionada à morte de até 100.000 indivíduos naquele ano (MURRAY et. al, 2022).

Com o avanço da resistência a antimicrobianos, tornou-se essencial ampliar os estudos voltados para combater essa ameaça global. Dentre as diversas estratégias investigadas, o sistema CRISPR/Cas (Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Intercaladas / Associadas a proteínas do tipo Cas) emergiu como uma ferramenta promissora, caracterizado como uma técnica de Edição Genômica (EG) que ganhou considerável notoriedade devido ao fato de apresentar elevada eficiência, precisão e facilidade de uso (MANGHWAR et. al, 2019).

A CRISPR/Cas é definida como um sistema imunológico presente principalmente em cromossomos bacterianos, responsável por promover a defesa da bactéria contra agentes externos, que é estudada, entre outras aplicações, com intuito de elucidar sua aplicabilidade no ramo da diminuição da RAM (LIMA, 2023; SHENG et. al, 2023; KAMRUZZAMAN; IREDELL, 2020; BARRANGOU; HORVATH, 2017). Embora o sistema CRISPR/Cas ainda esteja em estágio inicial de desenvolvimento em bactérias, quando comparado aos organismos eucariotos, estudos demonstram que essa técnica é uma ferramenta altamente eficaz. Um exemplo disso é a aplicação da CRISPR/Cas com intuito de otimizar a funcionalidade da bactéria

Escherichia coli dentro do ramo da produção industrial, estudo esse que apresentou resultados promissores (DONG; CUI; ZHANG, 2021). No caso da *Klebsiella pneumoniae*, um microrganismo que carrega e compartilha um enorme conjunto de genes de resistência, principalmente via plasmídeos, foi identificada a presença do sistema CRISPR/Cas em seus cromossomos. Essa descoberta corrobora para a abertura de novas possibilidades no que se diz respeito ao combate da resistência da *K. pneumoniae*, embora este aspecto ainda necessite de maior investigação por parte da comunidade científica (KAMRUZZAMAN; IREDELL, 2020; TAGLIAFERRI, 2020).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho é elucidar quais são os efeitos da edição gênica mediada pelo sistema CRISPR/Cas9 nos mecanismos de resistência antimicrobiana da *Klebsiella pneumoniae,* bem como de qual forma tais efeitos podem contribuir para a redução de infecções de cunho hospitalar causadas pelo microrganismo em questão.

2 MÉTODO

O presente trabalho constitui-se de uma revisão narrativa de literatura, sendo a coleta de dados realizada por meio de fontes eletrônicas provenientes de bases de dados científicos. Foram utilizadas plataformas de pesquisa como Google Acadêmico, PubMed (*National Library of Medicine*), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *World Health Organization* (WHO), com intuito de obter informações acerca do microrganismo *Klebsiella pneumoniae*, bem como de seus mecanismos de resistência, realizando a correlação de ambos ao sistema CRISPR/Cas9.

O método para a seleção dos artigos consistiu na busca por algumas palavras-chave, como: *Klebsiella pneumoniae*, sistema CRISPR/Cas, Resistência a Antimicrobianos (RAM) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC. Foram escolhidos artigos científicos publicados em língua portuguesa, inglesa e espanhola no período de 2017 a 2024, com exceção de um livro acadêmico e três artigos publicados em anos anteriores a este período, tendo em vista sua importante contribuição para a composição deste artigo. Todas as publicações selecionadas foram devidamente estruturadas, abordadas e referenciadas ao longo do presente trabalho.

Com intuito de promover a melhor organização e compreensão do desenvolvimento deste artigo, o tópico “Desenvolvimento” foi dividido nos seguintes subtópicos: “*Klebsiella pneumoniae,*” “Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Intercaladas / Associadas a proteínas do tipo Cas (CRISPR/Cas)” e “Redução da resistência bacteriana, voltada para *Klebsiella pneumoniae*, através da técnica de CRISPR/Cas9.”

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 *Klebsiella pneumoniae*

3.1.1 Características Gerais da *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo anaeróbio facultativo do tipo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, amplamente reconhecido como um microrganismo oportunista, virulento e multirresistente, capaz de desenvolver resistência significativa a diversas classes de antimicrobianos, como é o caso da *Klebsiella pneumoniae*

produtora de KPC (ALVIM; COUTO; GAZZIELLI, 2019). Os membros da família *Enterobacteriaceae* podem estar presentes em quase todos os tipos de doenças infecciosas, bem como serem isolados de qualquer amostra recebida por parte do laboratório (PROCOP et. al, 2018). Em adição, *K. pneumoniae* pode causar uma variedade de infecções, com destaque para o trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário, além de patologias como bacteremia, pneumonia e abscessos hepáticos, sendo esta última condição mais comum em pacientes diabéticos (SILVA, 2022; WANG et. al, 2020; SAVARD; PERL, 2012).

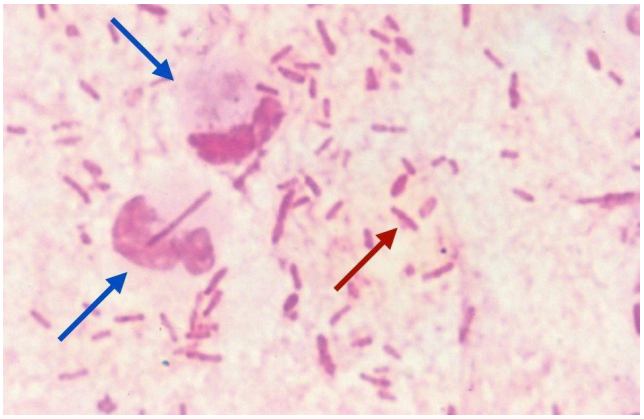
A *Klebsiella pneumoniae* é considerada um microrganismo ubíquo, podendo ser encontrada principalmente na mucosa de animais e no ambiente, incluindo água e solo. Como o nome *Enterobacteriaceae* indica, em condições normais, as bactérias dessa família são encontradas principalmente no trato gastrointestinal, integrando a microbiota de indivíduos saudáveis (SILVA, 2022). No entanto, a *K. pneumoniae* também pode colonizar a nasofaringe, forma pela qual é capaz de invadir a circulação sanguínea, resultando em diversas infecções graves (WANG et. al, 2020).

3.1.2 Identificação laboratorial da *Klebsiella pneumoniae*

Para a identificação de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, utiliza-se a combinação de três metodologias: Coloração de Gram (bacterioscopia), cultura bacteriana e provas bioquímicas. Dentre essas, a coloração de Gram é considerada a técnica com menor capacidade de diferenciação entre as espécies, enquanto a cultura e as provas bioquímicas possuem o maior grau de especificidade para essa finalidade. Entretanto, a diferenciação dos microrganismos pertencentes a essa família baseia-se na presença ou na ausência de enzimas codificadas por parte do material genético do cromossomo bacteriano, onde, com a seleção de meios que avaliem as características metabólicas, é possível definir o perfil bioquímico que indica a identificação da tal espécie (PROCOP et. al, 2018).

A coloração de Gram é amplamente utilizada como um teste de triagem, possibilitando a análise das características morfológicas, como o formato e arranjo das bactérias, e das propriedades tintoriais, como a classificação dos microrganismos em Gram-positivos ou Gram-negativos. Entretanto, essa técnica é considerada limitada, devido ao fato de não oferecer a possibilidade de diferenciação entre as espécies bacterianas (PROCOP et. al, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). No caso de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, a coloração de Gram pode revelar bactérias em forma de bacilo ou cocobacilo, Gram-negativas, curtas e agrupadas, com dimensões variando entre 0,5 a 2,0 µm de largura e 2,0 a 4,0 µm de comprimento, conforme ilustrado na figura 1 (PROCOP et. al, 2018):

Figura 1: Coloração de amostra de escarro por Gram. A posterior realização de cultura da amostra confirmou que o microrganismo isolado era *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: Adaptado (PROCOP et. al, 2018)

Legenda: Coloração de amostra de escarro por meio da metodologia de Gram, demonstrando a presença de bastonetes roliços e curtos de caráter Gram-negativo (representados pela seta vermelha), típicos da Família *Enterobacteriaceae*, acompanhados de leucócitos polimorfonucleares (representados pelas setas azuis), indicativos de processo infeccioso. A cultura da amostra em questão confirmou que o microrganismo isolado era *Klebsiella pneumoniae*.

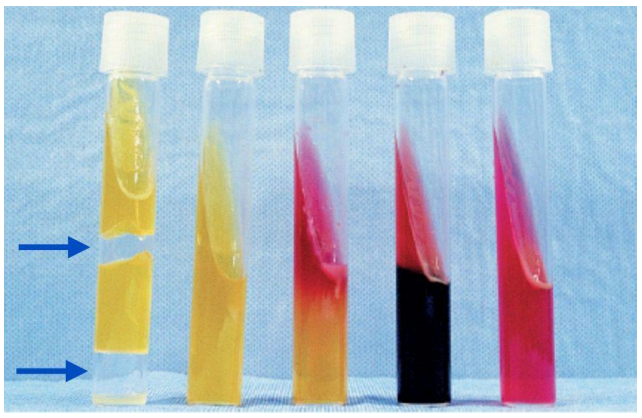
Os meios de cultura são definidos como um tipo de material nutriente previamente preparado e utilizado com intuito de promover o crescimento microbiano em ambiente laboratorial. Estes meios devem preencher alguns critérios para possibilitar com que haja o crescimento microbiano, como, por exemplo, ter determinados tipos de nutrientes, apresentar um percentual de água adequado, bem como conter níveis de pH (Potencial Hidrogeniônico) específicos. Além disso, os meios de cultura devem ser submetidos a atmosferas de oxigênio específicas, determinadas conforme o microrganismo que objetiva-se detectar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). No caso dos microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, a cultura bacteriana revela a formação de colônias relativamente grandes, de coloração cinza-opaca, secas ou mucoides no ágar sangue de carneiro, sendo as colônias mucoides indicativas de cepas encapsuladas de *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, visualiza-se a produção de ácidos mistos, nos quais conferem um odor fétido pungente ao meio de cultura (PROCOP et. al, 2018). Por outro lado, no ágar MacConkey, a cultura de bactérias do gênero *Klebsiella ssp*. demonstra a formação de colônias grandes, cor-de-rosa e de aspecto mucoide, conforme ilustrado na figura 2 (LAB AeV MICROBIOLOGIA, 2024):

Figura 2: Cultura da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em ágar MacConkey (lactose positiva).

Fonte: Próprio autor

A identificação definitiva dos membros da família *Enterobacteriaceae* necessita, na maioria dos casos, da realização de testes bioquímicos, caracterizados como um teste confirmatório capaz de diferenciar bactérias por meio das características do seu metabolismo (PROCOP et. al, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Com poucas exceções, todos os membros dessa família são fermentadores de glicose, apresentam citocromo-oxidase negativo e são capazes de reduzir nitrato a nitrito, conforme ilustrado nas figuras 3, 4 e 5 respectivamente (SILVA, 2022; PROCOP et. al, 2018):

Figura 3: Fermentação de glicose e lactose, juntamente a produção de gás carbônico (CO_2), localizado no tubo da extrema esquerda, feita por microrganismos do gênero *Klebsiella*.



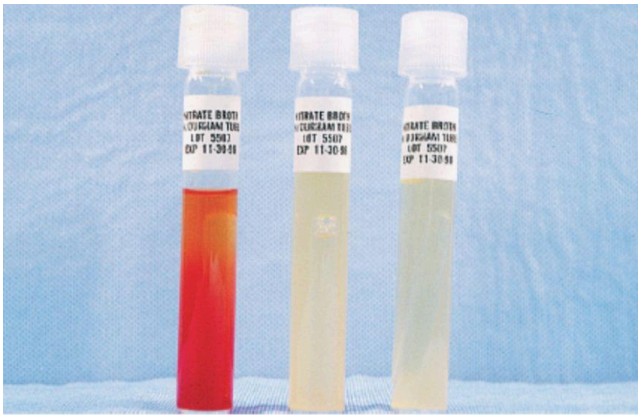
Fonte: Adaptado (PROCOP et. al, 2018)

Legenda: A produção de gás carbônico (CO_2) é identificada exclusivamente no tubo da extrema esquerda, podendo ser vista em duas porções, sendo ambas sinalizadas por meio das setas azuis. Os outros quatro tubos demonstrados na imagem não estão relacionados a microrganismos do gênero *Klebsiella*.

Figura 4: Teste de citocromo-oxidase com resultado negativo, representado à direita, indicativo de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*.

Fonte: (PROCOP et. al, 2018)

Figura 5: Teste do nitrato com tubo de Durham com resultado positivo, apresentado à extrema esquerda, indicativo de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*.



Fonte: (PROCOP et. al, 2018)

3.1.3 Resistência antimicrobiana da *Klebsiella pneumoniae*

Por definição, uma bactéria é considerada resistente à ação de um antimicrobiano quando o seu crescimento não é inibido pela maior concentração *in vivo* do fármaco tolerada por parte do hospedeiro, sendo essa resistência disseminada via DNA extracromossômico por conjugação bacteriana (WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016). No caso da família *Enterobacteriaceae*, observa-se uma elevada resistência principalmente aos medicamentos da classe dos beta-lactâmicos, decorrente da expressão fenotípica das Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), responsáveis por promover a hidrólise dos antimicrobianos pertencentes à classe medicamentosa em questão (SAVARD; PERL, 2012; RAWAT; NAIR, 2010). Dentro do grupo dos beta-lactâmicos, destacam-se os medicamentos da subclasse dos carbapenêmicos, caracterizados como antimicrobianos de espectro estendido que apresentam estabilidade maior frente a ação de enzimas de resistência. Entretanto, devido ao crescente estabelecimento de microrganismos multirresistentes, como é o caso da cepa *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, a eficácia desses fármacos apresenta uma redução substancial. Esse quadro de resistência, por sua vez, está associado a vários mecanismos

adaptativos da *K. pneumoniae*, que incluem a alteração de enzimas transportadoras (PBP's), produção de betalactamases e redução da quantidade de porinas, definidas como proteínas transmembranares (SILVA, 2022; SAVARD; PERL, 2012).

O termo *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC refere-se a uma enzima da classe das carbapenemases, produzida por algumas espécies bacterianas, especialmente nos bacilos Gram-negativos (BGN). Essa enzima apresenta a capacidade de hidrolisar diversos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, com destaque para os carbapenêmicos, que já foi identificada em todos os membros clinicamente importantes da família *Enterobacteriaceae*, embora com maior prevalência na *Klebsiella pneumoniae* (DA SIVA et. al, 2019). Em relação ao gene codificador da KPC, denominado *blaKPC*, pode-se afirmar que por estar localizado nos plasmídeos bacterianos, considerados como a principal forma de disseminação de resistência, a sua transmissão horizontal para outras bactérias é favorecida, aspecto esse que amplia o risco para a saúde pública (MEHDI et. al, 2023; HALL; HARRISON, 2016). A primeira descrição de uma enterobactéria produtora de carbapenemase do tipo KPC ocorreu em 1996 através de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae,* isolada em um hospital da Carolina do Norte, Estados Unidos (EUA). Após o primeiro relato de KPC oriundo dos EUA, este microrganismo resistente foi frequentemente relatado em casos de surto ao redor do mundo, em países como França, Israel, Colômbia, Brasil, Argentina e China (FIGUEIREDO, 2018). A KPC está ligada a infecções graves, muitas vezes acompanhadas de baixas opções de tratamento terapêutico e elevadas taxas de mortalidade, sendo o maior risco associado à não-detecção da bactéria no paciente. Estima-se que até 2050, microrganismos resistentes a antimicrobianos poderão causar 10 milhões de mortes anuais, gerando um custo de US$ 100 trilhões, um cenário alarmante exacerbado devido ao uso inadequado da classe de medicamentos em questão (DA SIVA et. al, 2019).

3.2 Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Intercaladas / Associadas a proteínas do tipo Cas (CRISPR/Cas)

3.2.1 CRISPR/Cas como mecanismo imunológico bacteriano

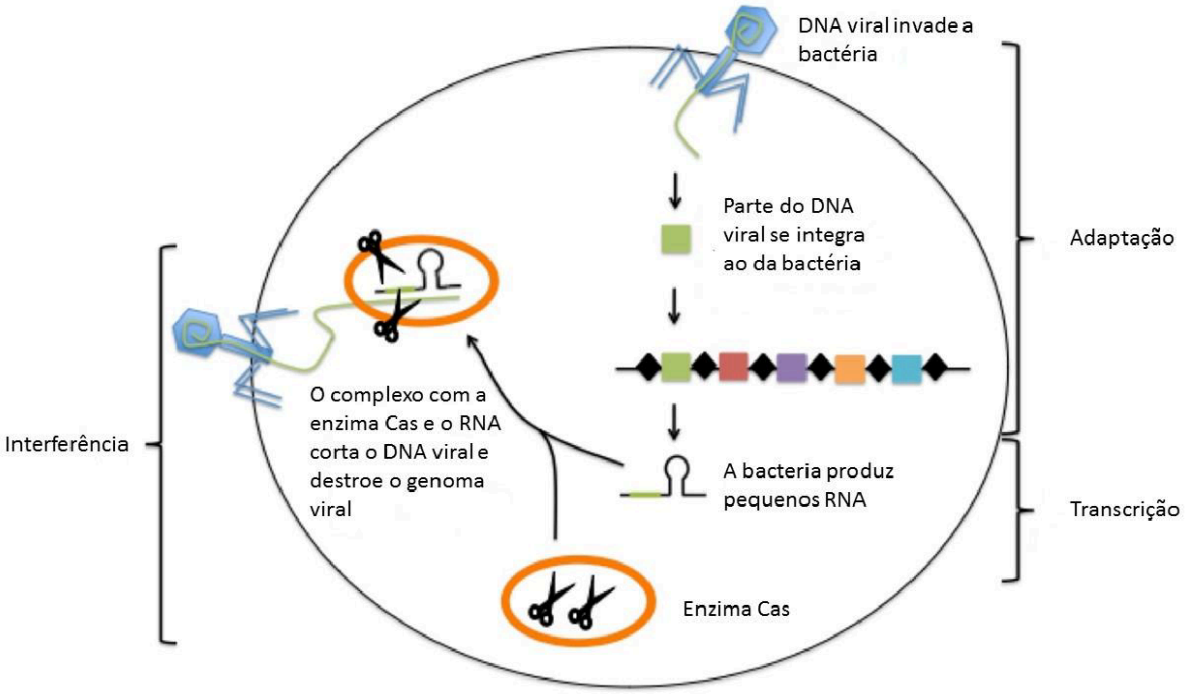
O sistema CRISPR/Cas, do inglês "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"*, (Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Intercaladas / Associadas a proteínas do tipo Cas) foi descoberto em meados de 1987, quando uma sequência de DNA incomum, mais tarde denominada CRISPR, foi descoberta acidentalmente no genoma da *Escherichia coli* durante a análise do seu metabolismo. Ademais, foi através de pesquisas realizadas por Mojica e Jansen, no ano de 2002, que foi descoberta a funcionalidade do sistema em questão, aspecto que abriu espaço para inúmeros avanços subsequentes (MEHDI et. al, 2023; ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018; BARRANGOU; HORVATH, 2017).

CRISPR/Cas é definido como um mecanismo imunológico vital, exclusivo dos domínios de vida *Archaea* e Bactéria, que atua na invasão de elementos genéticos externos, provenientes principalmente de bacteriófagos e plasmídeos (SHENG et. al, 2023; KAMRUZZAMAN; IREDELL, 2020; MAIDANA et. al, 2020). Composto por genes codificadores de proteínas Cas e por sequências CRISPR, este sistema apresenta inúmeras repetições dispersas no genoma, que, por sua vez, estruturam palíndromos agrupados de forma intercalada e sequencial, condição que confere o nome CRISPR/Cas ao sistema em questão

(LIMA, 2023). Este mecanismo imunológico é classificado em duas classes (I e II) e seis tipos distintos (I, II, III, IV, V e VI), sendo as classes definidas com base no módulo efetor, ou seja, através dos genes responsáveis pelas proteínas envolvidas no pré-processamento de RNAs CRISPR curtos (crRNA), aspecto que será elucidado a seguir (TAGLIAFERRI, 2020; BARRANGOU; HORVATH, 2017).

A imunidade mediada por CRISPR é dividida em três fases distintas, sendo elas: adaptação, transcrição e reconhecimento. Na fase de adaptação, há a identificação da presença do ácido nucleico exógeno, com posterior incorporação dos seus fragmentos na extremidade proximal de um dos *locus* CRISPR; Na fase de transcrição, ocorre a transcrição do *locus* CRISPR que está integrado ao fragmento de material genético estranho, gerando um produto denominado RNA CRISPR precursor (pré-crRNA). O pré-crRNA, por sua vez, sofre clivagem enzimática, formando RNAs CRISPR curtos (crRNA), que tem como função direcionar nucleases Cas específicas, através do complexo crRNA-Cas, ao local exato de reconhecimento; Por último, na fase de reconhecimento, tem-se a identificação e posterior clivagem do material genético exógeno por meio da complementaridade de bases entre o crRNA e o ácido nucleico estranho em questão. As três fases citadas estão esquematizadas a seguir, conforme ilustrado na figura 6 (MEHDI et. al, 2023; SHENG et. al, 2023; KAMRUZZAMAN; IREDELL, 2020; MAIDANA et. al, 2020):

Figura 6: Esquematização da imunidade mediada por parte do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: (LIMA, 2023)

Legenda: A figura 6 esquematiza as três fases da imunidade mediada por CRISPR/Cas, sendo elas: Adaptação (fase 1), transcrição (fase 2) e interferência (fase 3). Tendo isso em vista, pode-se afirmar que diversas literaturas nomeiam as fases descritas de formas distintas. Portanto, no presente trabalho, como forma de facilitar a compreensão do assunto, adotou-se a seguinte nomenclatura para as fases em questão: Adaptação (fase 1), transcrição (fase 2) e reconhecimento (fase 3).

É notório que o sistema CRISPR/Cas representa uma forma de defesa importante para seres do domínio *Archaea* e Bactéria, devido a sua capacidade de identificar e eliminar fragmentos de material genético externo de forma específica e precisa. Um aspecto intrigante deste mecanismo está na sua capacidade de fornecer imunidade adaptativa a bactérias, característica que chamou atenção da comunidade científica. Esta descoberta abriu espaço para utilização do sistema CRISPR/Cas como uma potente ferramenta de edição genômica a partir de meados de 2012, ampliando suas aplicações para além do âmbito microbiológico, de forma a revolucionar o ramo da engenharia genética (LIMA, 2023; SHENG et. al, 2023; BARRANGOU; HORVATH, 2017; CEASAR et. al, 2016).

3.2.2 Tecnologia de CRISPR/Cas como ferramenta de edição genômica

CRISPR/Cas é caracterizada como a técnica de edição genômica mais recente e promissora, que superou outros métodos não tão eficazes, como TALEN (*Transcriptional Activator-Like Effector Nucleases*) e ZFN (*Zinc Finger Nucleases*), devido ao fato de ainda apresentarem limitações que dificultam seu uso efetivo. A técnica CRISPR/Cas ganhou atenção da comunidade científica desde meados de 2012, devido ao fato de apresentar elevada eficiência e precisão, bem como facilidade no uso, aspecto que justifica sua emergência significativa ao longo dos anos (MANGHWAR et. al, 2019; CEASAR et. al, 2016). Além disso, CRISPR/Cas abriu portas no que diz respeito à possibilidade de ser capaz de editar praticamente qualquer genoma existente, algo que, em contrapartida, levanta questionamentos éticos e reflexões acerca do impacto dessa técnica em âmbitos econômicos, políticos, sociais e ambientais. Contudo, por mais que seja uma técnica altamente promissora no âmbito da edição genômica, CRISPR/Cas ainda apresenta algumas limitações, como é o caso, por exemplo, da dificuldade de entrega de seus componentes para células vivas, aspecto ainda não totalmente elucidado (SHENG et. al, 2023; MAIDANA et. al, 2020).

Dentre as classes e tipos de CRISPR/Cas já citadas anteriormente, a técnica de CRISPR/Cas9, pertencente à categoria CRISPR/Cas tipo II, é definida como uma das mais promissoras dentro do ramo da edição genômica. Esse aspecto é oriundo do fato de que CRISPR/Cas9 é um método simples e altamente específico, capaz de clivar sítios que não são totalmente complementares a sequência de RNA guia (MAIDANA et. al, 2020; CEASAR et. al, 2016). Este sistema é composto, basicamente, por três componentes, sendo eles: crRNA, tracrRNA (*trans-activating* crRNA) e nuclease Cas9, onde, a formação de um complexo entre os três componentes principais da CRISPR/Cas9 possibilita a realização de clivagens específicas em regiões de interesse. Nesse contexto, as descobertas em questão possibilitaram com que os pesquisadores da área visassem regiões gênicas de interesse e fossem capazes de manipular sequências de genes direcionadas para diversos fins, como é o caso, por exemplo, da edição genômica com finalidade de promover a redução da resistência e virulência de microrganismos, ramo que já apresenta resultados promissores (SHENG et. al, 2023; TAGLIAFERRI, 2020).

3.3 Redução da resistência bacteriana, voltada para *Klebsiella pneumoniae*, através da técnica de CRISPR/Cas9

Conforme já abordado, a proliferação em larga escala de bactérias multirresistentes, impulsionada principalmente devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos e por práticas ineficazes de prevenção de infecções, representa um elevado risco para a saúde pública, especialmente para indivíduos imunossuprimidos e hospitalizados (BRASIL, 2019; SAVARD; PERL, 2012). Os genes de resistência antimicrobiana (RAM) permitem que as bactérias desenvolvam estratégias variadas para superar a ação dos fármacos existentes, condição que compromete as opções terapêuticas disponíveis atualmente, contribuindo para uma crise iminente no tratamento de infecções. De acordo com uma pesquisa publicada pela *Centers for Disease Control and Prevention* em 2013, mais de 2 milhões de pessoas são infectadas anualmente por patógenos resistentes a antimicrobianos, resultando em aproximadamente 23 mil óbitos provenientes de infecções causadas por esses microrganismos. Além disso, estima-se que até o ano de 2050, patógenos multirresistentes poderão ser responsáveis por até 10 milhões de mortes por ano, superando o número de óbitos causados por doenças como câncer e diabetes (MEHDI et al, 2023). Nesse contexto, a busca por alternativas eficazes para combater a RAM tornou-se prioritária dentro da comunidade científica, sendo a técnica de CRISPR/Cas9 identificada como a ferramenta mais promissora para essa finalidade no panorama atual (MANGHWAR et. al, 2019).

A técnica de CRISPR/Cas9 está ganhando elevada notoriedade com o passar dos anos por ser, entre outros aspectos, uma ferramenta promissora no combate da RAM de patógenos internos e externos (MEHDI et al, 2023; SHENG et. al, 2023; CEASAR et. al, 2016). Entretanto, apesar dos avanços, estudos focados na utilização da CRISPR/Cas9 com intuito de reduzir a resistência e virulência de microrganismos multirresistentes ainda são relativamente limitados. Nesse contexto, a maioria das literaturas relatam resultados efetivos em pesquisas realizadas em microrganismos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (SHENG et. al, 2023). Já em relação ao potencial da CRISPR/Cas9 direcionada para a redução da RAM da *Klebsiella pneumoniae*, tem-se que, apesar da escassez de literaturas específicas que retratam o tema em questão, alguns estudos já apresentam resultados promissores (WANG; WANG; JI, 2022; WANG et al., 2018).

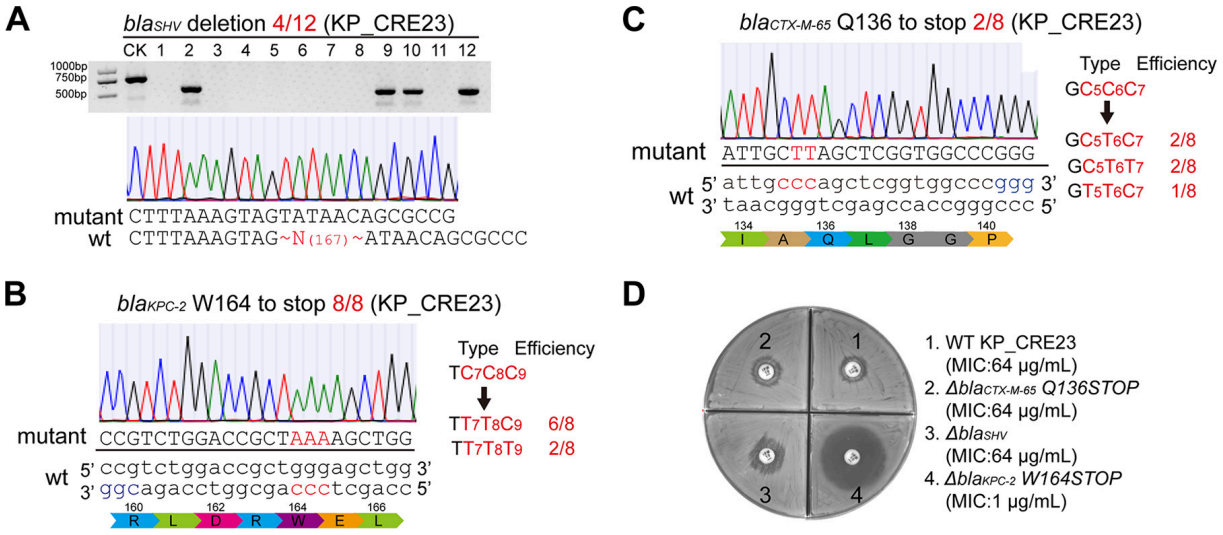
No caso dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, estudos demonstram a cura dos seus plasmídeos bacterianos, bem como a indução de uma citotoxicidade mediada por CRISPR/Cas9 após editar os genes de RAM pertencentes aos microrganismos em questão. Já em relação ao *Streptococcus pneumoniae*, experimentos *in vivo* realizados em roedores demonstraram a eficácia do sistema CRISPR/Cas9 na inibição da síntese da cápsula deste microrganismo, caracterizada como um fator de virulência essencial. Dessa forma, conclui-se que os resultados obtidos demonstram a efetividade da aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 na redução da RAM dos patógenos citados, aspecto este considerado altamente promissor (TAGLIAFERRI, 2020).

Em relação à *Klebsiella pneumoniae*, a presença de múltiplos mecanismos de resistência representa um desafio significativo para a eficácia da técnica de CRISPR/Cas9 na ressensibilização dessa bactéria, o que explica a escassez de estudos que demonstram efetividade nesta área (TAGLIAFERRI, 2020). No entanto, algumas pesquisas apresentaram resultados promissores, destacando-se a que desenvolveu um método de edição genômica altamente preciso através da utilização de um sistema de dois plasmídeos específicos,

isolados de *Streptococcus pyogenes*, denominados pCasKP e pSGKP. Nos quais, quando inseridos no genoma da bactéria, habilitam uma edição genômica altamente eficiente. O estudo, realizado em cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, demonstrou a capacidade de excluir e inserir genes cromossômicos no genoma da *K. pneumoniae* ao combinar os plasmídeos pCasKP e pSGKP com a técnica CRISPR/Cas9 e o sistema de recombinação genômica *Lambda Red*, baseada em bacteriófagos. Além disso, o estudo também explorou um sistema de edição de bases de citidina (pBECKP), que possibilita a conversão de bases citosina em bases de timina em genes cromossômicos transmitidos por plasmídeos (WANG et al., 2018).

Devido a sua alta capacidade de mutagenicidade e apresentação de diversos mecanismos de resistência bacteriana, os estudos acerca de *K. pneumoniae* permanecem inconclusivos e escassos. No estudo citado, porém, alguns resultados promissores foram observados. Wang et al. (2018), por meio de utilização dos sistemas plasmidiais pCasKP-pSGKP concomitante ao sistema plasmidial pBECKP, obtiveram resultados satisfatórios de deleções e inativações em genes de multirresistência para os mecanismos de ESBL (Beta-Lactamase de Espectro Estendido - genes bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}65}$) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - gene $bla_{KPC\text{-}2}$) em cepas clínicas e industriais de *K. pneumoniae.* Para o gene $bla_{SHV,}$ utilizando o sistema pCasKP-pSGKP, observaram eficácia em 4/12 testes; Já para os genes $bla_{CTX\text{-}M\text{-}65}$ e $bla_{KPC\text{-}2,}$ utilizando o sistema pBECKP, obtiveram eficácia em 2/8 e 8/8 testes, respectivamente. Outro teste realizado por este estudo, que enfatiza ainda mais a eficiência do método, é o teste de suscetibilidade antimicrobiana realizado posteriormente às deleções, utilizando o carbapenêmico Imipenem (antimicrobiano de amplo espectro bastante utilizado na prática clínica), demonstrando aumento de suscetibilidade a esse antimicrobiano na cepa com o gene $bla_{KPC\text{-}2}$ deletado. Os resultados podem ser vistos na Figura 7 (WANG et al., 2018):

Figura 7: Resultados dos estudos realizados utilizando a técnica CRISPR/Cas9 com os sistemas plasmidiais pCasKP-pSGKP e pBECKP, na cepa industrial de *K. pneumoniae* KP_CRE23. Essa cepa apresentava mecanismos de resistência para EBSL e KPC simultaneamente, sendo expressados através dos genes bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}65}$ (EBSL) e $bla_{KPC\text{-}2}$ (KPC).



Fonte: (WANG et. al, 2018)

Legenda: (A) Demonstra a deleção do gene cromossômico bla_{SHV} em KP_CRE23 mediada pelo sistema plasmidial pCasKP-pSGKP, apresentando eficácia em 4/12 testes; (B) Demonstra a transformação altamente eficiente do *locus* W164 do gene bla_{KPC-2} em códons de paragem, com eficácia em 8/8 testes; (C) Demonstra a transformação do *locus* Q136 do gene $bla_{CTX-M-65}$ em códons de paragem, com eficácia em 2/8 testes; (D) Demonstra um teste de suscetibilidade antimicrobiana para Imipenem, realizado posteriormente às deleções dos genes de resistência. Podemos verificar um aumento significativo da suscetibilidade ao antimicrobiano na cepa devido a deleção do gene bla_{KPC-2}.

Nesse panorama, concluiu-se que o desenvolvimento das ferramentas citadas apresenta potencial para impulsionar pesquisas voltadas para a redução da RAM em cepas de *K. pneumoniae* e outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, além de contribuir significativamente para o progresso da engenharia genética (WANG; WANG; JI, 2022; WANG et al., 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo elucidar quais são os efeitos e impactos da edição gênica mediada pela técnica de CRISPR/Cas9 nos mecanismos de resistência antimicrobiana (RAM) da *Klebsiella pneumoniae,* caracterizada como uma bactéria multirresistente de elevada importância clínica. Observou-se que a técnica de CRISPR/Cas9 mostrou-se promissora no combate da RAM de alguns microrganismos, com capacidade de editar genes de resistência em várias bactérias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. No caso da *Klebsiella pneumoniae*, embora haja um déficit de pesquisas focadas na elucidação da diminuição da RAM por meio da CRISPR/Cas9, alguns estudos já trazem resultados promissores quanto à capacidade de editar o genoma dessa bactéria através da técnica de CRISPR/Cas9. Aspecto esse que, quando mais aprofundado, é capaz de promover a diminuição significativa da RAM em *K. pneumoniae,* tornando-a mais suscetível a tratamentos terapêuticos anteriormente ineficazes. Panorama que impacta diretamente na diminuição de infecções hospitalares, bem como na redução do número de óbitos associados.

Diante da elevada incidência de infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae*, a aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 para promover a redução substancial de infecções hospitalares é uma estratégia promissora, especialmente considerando a dificuldade no tratamento de cepas multirresistentes. Ao reverter a resistência da *K. pneumoniae* a antimicrobianos cruciais, como os beta-lactâmicos, a técnica de CRISPR/Cas9 permite um controle mais eficaz de infecções em pacientes imunossuprimidos ou em estado crítico, contribuindo para a mitigação de infecções hospitalares, bem como da elevada taxa de mortalidade associada a esse patógeno.

Apesar do promissor potencial da CRISPR/Cas9 no combate à RAM, é essencial que outras estratégias sejam desenvolvidas e aplicadas em paralelo, como forma de otimizar o combate da resistência a antimicrobianos em escala global. Entre essas, destaca-se a implementação de políticas de saúde pública que envolvam vigilância nacional, regional e hospitalar, assim como programas de conscientização sobre o uso correto de antimicrobianos. Além disso, medidas de controle de infecções devem ser rigorosamente seguidas por profissionais de saúde nos hospitais, incluindo a adesão de precauções de contato através do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), higiene das mãos, limpeza ambiental e o isolamento de pacientes infectados, visando impedir a propagação de

microrganismos multirresistentes.

Embora exista uma carência de literaturas científicas que abordam a redução da RAM da *Klebsiella pneumoniae* através da técnica de CRISPR/Cas9, com exceção de alguns estudos efetivos anteriormente citados, este microrganismo foi escolhido como foco de estudo devido ao fato de ser o mais relacionado às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Entre as enterobactérias, a *K. pneumoniae* é o microrganismo mais comumente encontrado em infecções hospitalares graves e de difícil tratamento, em grande parte devido à sua capacidade de desenvolver e transmitir genes de resistência. A combinação de alta prevalência, gravidade das infecções e elevado perfil de RAM, torna imperativa a busca por novas alternativas terapêuticas, como é o caso da CRISPR/Cas9, com intuito de promover a redução da resistência e virulência dessa bactéria, mitigando seu impacto na saúde pública.

No contexto da atuação do biomédico, esses profissionais desempenham um papel crucial no desenvolvimento de novas tecnologias que inibem microrganismos resistentes, como é o caso da técnica de CRISPR/Cas9. Além disso, cabe ao profissional biomédico não apenas realizar o diagnóstico microbiológico, mas também promover a vigilância e controle de infecções, auxiliar no desenvolvimento de políticas públicas de conscientização sobre o uso racional de antimicrobianos e contribuir em pesquisas que visam desenvolver novos medicamentos que combatam com êxito microrganismos resistentes. Essas funções tornam o biomédico uma peça-chave na mitigação do avanço da RAM em escala global, contribuindo para a implementação de tratamentos mais eficazes e, consequentemente, na redução do número de óbitos causados por microrganismos resistentes.

Em resumo, conclui-se que o presente trabalho destacou o potencial promissor da técnica de CRISPR/Cas9 como ferramenta de combate à RAM da *Klebsiella pneumoniae*, um patógeno de elevada importância clínica. Embora ainda existam poucos estudos focados especificamente na elucidação desse assunto, o avanço de novas pesquisas, junto ao aprofundamento daquelas já desenvolvidas, contribuirá significativamente para a redução da resistência antimicrobiana da *K. pneumoniae*. Tal avanço terá um impacto positivo no combate a esse patógeno em ambientes hospitalares, mitigando, dessa forma, sua elevada prevalência e letalidade.

REFERÊNCIAS

ALVIM, A. L. S; COUTO, B. R. G. M; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, Brasil, v. 53, n. 03474, 2019. Disponível em: https://www.revistas.usp.br/reeusp/article/view/182377. Acesso em: 25 aug. 2024

BARRANGOU, R; HORVATH, P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. **Nature microbiology**, v. 2, n. 7, jun. 2017. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201792. Acesso em: 04 nov. 2024.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única**. Brasília, 2019. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-isbn.pdf/view. Acesso em: 23 ago. 2024.

CEASAR, S. A. et al. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 9, jun. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916301781. Acesso em: 04 nov. 2024.

DA SIVA, E. L. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC): Bactéria multirresistente a antibióticos. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde - ReBIS**, 2019. Disponível em: https://revistateste2.rebis.com.br/index.php/revistarebis/article/download/13/12. Acesso em: 05 set. 2024.

DONG, H; CUI, Y; ZHANG, D. CRISPR/Cas technologies and their applications in *Escherichia coli*. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, China, v. 9, n. 1, nov. 2021. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.762676/full. Acesso em: 26 ago. 2024.

FIGUEIREDO, F. N. **Avaliação De Mutações Associadas a Resistência à Tigeciclina em Isolados Clínicos de *Klebsiella pneumoniae* Produtoras de Carbapenemase do Tipo KPC**. 2018. Tese (Mestrado em ciências genômicas e biotecnologia) - Escola de Saúde e Medicina, Universidade Católica de Brasília, 2018. Disponível em: https://bdtd.ucb.br:8443/jspui/handle/tede/2389. Acesso em: 04 nov. 2024.

HALL, J. P. J; HARRISON, E. Bacterial evolution: Resistance is a numbers game. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 12, nov. 2016. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016235. Acesso em: 04 nov. 2024.

HIGASHINO, H. R. **Análise de características clínicas e microbiológicas em coorte retrospectiva de pacientes com colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas**. 2020. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-21092021-115624/en.php. Acesso em: 05 set. 2024.

ISHINO, Y; KRUPOVIC, M; FORTERRE, P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 7, abr. 2018. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jb.00580-17. Acesso em: 29 out. 2024.

KAMRUZZAMAN M; IREDELL J. R. CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**. Austrália, v. 10, n. 1, jan. 2020. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02934/full#h7. Acesso em: 25 ago. 2024.

LAB AeV MICROBIOLOGIA. **Uso, aplicacíon y nombre del producto: Ágar MacConkey**. 2024. Disponível em: https://avlabmicrobiologia.com/_content/portfolio/adjuntos/doc_32.pdf. Acesso em: 28 out. 2024.

LIMA, W. C. D. S. **Produção de vídeo sobre o sistema CRISPR-Cas para divulgação científica em ambiente digital**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023. Disponível em: https://www.repositorio.ufal.br/handle/123456789/13870. Acesso em: 22 out. 2024.

MAIDANA, R. R. et al. Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 18, n. 1, Abr. 2020. Disponível em: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282020000100097. Acesso em: 22 out. 2024.

MANGHWAR. H et. al. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Trends in Plant Science**, China, v. 24, n. 12, dez. 2019. Disponível em: https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385(19)30243-2. Acesso em: 25 ago. 2024.

MEHDI, M. M. et al. The CRISPR-Cas System: how it works in Bacteria and how it can be used to encounter Antimicrobial resistant pathogens. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 14, n. 3, abr. 2023. Disponível em: https://www.pnrjournal.com/index.php/home/article/view/9796. Acesso em: 22 out. 2024.

MURRAY, C. J. L. et. al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, Reino Unido, v. 399, n. 10325, fev. 2022. Disponível em: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext. Acesso em: 23 ago. 2024.

PROCOP, G. W et. al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RAWAT, D; NAIR, D. Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 3, jan. 2010. Disponível em: https://journals.lww.com/jgid/fulltext/2010/02030/Extended_spectrum___lactamases_in_Gram_Negative.13.aspx. Acesso em: 04 nov. 2024.

SAVARD, P; PERL, T. M. A call for action: managing the emergence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in the acute care settings. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 4, ago. 2012. Disponível em: https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/abstract/2012/08000/a_call_for_action__managing_the_emergence_of.3.aspx. Acesso em: 04 nov. 2024.

SHENG, H. et al. Engineering conjugative CRISPR-Cas9 systems for the targeted control of enteric pathogens and antibiotic resistance. **Plos one**, v. 18, n. 9, set. 2023. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37699034/. Acesso em: 03 nov. 2024.

SILVA, V. S. **Multirresistência de *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus* em hemoculturas em UTIs: uma revisão de literatura**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022. https://www.repositorio.ufal.br/bitstream/123456789/11614/3/Multirresist%C3%AAncia%20de%20Klebsiella%20pneumoniae%2C%20Pseudomonas%20aeruginosas%20e%20Staphyloc

occus%20aureus%20em%20hemoculturas%20em%20UTIs%3A%20uma%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf. Acesso em: 8 ago. 2024.

TAGLIAFERRI, T. L. **Exploring the CRISPR-Cas9 potential to revert beta-lactam resistance in clinically relevant gram-negative bacteria**. 2020. Tese (Doutorado em microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/32958. Acesso em: 22 out. 2024.

TAVARES, C. P. M. ***Klebsiella pneumoniae*** **e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/43230. Acesso em: 8 ago. 2024.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed. São Paulo: Artmed editora, 2017.

WANG, G. et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of environmental research and public health**, China, v. 17, n. 17, ago. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1660-4601/17/17/6278. Acesso em: 30 jul. 2024.

WHALEN, K; FINKEL, R; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia ilustrada**. 6 Ed. Porto Alegre: **Artimed,** 2016.

WANG, Y et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 23, Dez. 2018. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.01834-18. Acesso em: 19 nov. 2024.

WANG, Z; WANG, Y; JI, Q. Genome editing in *Klebsiella pneumoniae* using CRISPR/Cas9 technology. **Recombineering: Methods in molecular Biology**, v. 2479, Mai. 2022. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2233-9_8. Acesso em: 19 nov. 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a dádiva mais preciosa que possuo: A minha vida. Expresso gratidão profunda aos meus pais pelo amor incondicional fornecido a mim, com um adendo especial para minha mãe que, mesmo nas adversidades, sempre me ensinou a ser uma mulher forte e resiliente, me mostrando que o conhecimento é um dos bens mais preciosos que um ser humano pode ter. Agradeço ao meu namorado por sempre estar ao meu lado, me fornecendo todo o suporte e amor em todos os momentos da minha vida desde que nos conhecemos e a minha amiga Isabela por ser a melhor amiga e companheira que eu poderia ter. Agradeço a minha professora orientadora Fefa por me apoiar e auxiliar eximiamente com todo o carinho e cuidado durante a confecção deste trabalho. E, por último, gostaria agradecer profundamente a minha vovó Neli por tudo que já fez por mim, sem ela nada seria possível.