**Alunos: Cintia Naomi Kohatsu e Gabriel Queiroz Arnaut**

**Tema: CRISPR-Cas contra resistência bacteriana**

**Assunto escolhido: Resistência bacteriana a antibióticos**

**Introdução**

CRISPR-Cas, do inglês, significa “Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à proteína Cas”. CRISPR-Cas é um mecanismo de defesa imune de bactérias e arqueas contra invasores. Sequências curtas de DNA ou RNA de organismos invasores, como bacteriófagos ou plasmídeos, são clivadas em uma região específica do CRISPR no genoma bacteriano e em seguida a proteína Cas identifica e corta os ácidos nucleicos invasores que transportam essa mesma sequência. Sistema de CRISPR-Cas são diferenciadas em duas classes com três tipos em cada uma, sendo a de classe 1 e tipos (I, III e IV) mais complexa, envolvendo diversas proteínas Cas no processo de reconhecimento e clivagem de DNA, por outro lado a classe 2 e tipos (II, V e VI) contém estruturas mais simples, contendo apenas uma enzima com múltiplos sítios para reconhecimento e clivagem. A última classe inclui CRISPR-Cas9 tipo II, com mecanismos simples e versáteis, levando a uma revolução na edição do genoma. Essa poderosa ferramenta pode ser usada para localizar e erradicar genes que conferem resistência a antibióticos em bactérias.

**Descrição do Problema**

A resistência bacteriana a antibióticos tem causado preocupação mundial, principalmente com o surgimento de bactérias ultra resistentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência a antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global, segurança alimentar e desenvolvimento. Atualmente, está surgindo um número crescente de infecções por pneumonia, tuberculose, gonorreia e salmonelose que estão sendo cada vez mais difíceis de tratar e em alguns casos são intratáveis, devido a diminuição ou perda da eficácia do medicamento. A resistência aos antibióticos também afeta a economia, devido a internações mais prolongadas, custos médicos mais elevados e maiores taxas de mortalidade. Mesmo com o surgimento de novos antibióticos, de nada adiantará se a humanidade não mudar os hábitos de prescrição e uso de antibióticos de maneira indiscriminada.

A mutação espontânea é um processo natural e de rara ocorrência, com frequência de 108 a 109. No entanto, não demora muito para que novas cepas desenvolvam um gene com mutação, já que possui uma alta taxa de crescimento em condições favoráveis.

Quando um indivíduo interrompe o tratamento antes do tempo determinado pelo médico, as cepas sobreviventes e mais resistentes passam a se multiplicar, passando para as próximas gerações os genes com a mutação. Uma bactéria pode ser resistente a múltiplos fármacos.

 **Ferramentas da Biologia Molecular para a solução do problema**

Em se tratando do uso do sistema CRISPR-cas no combate à resistência bacteriana, uma abordagem científica no âmbito da biologia molecular é a possível futura substituição dos antibióticos tradicionais por bacteriófagos modificados capazes de voltar os sistemas CRISPR-cas das bactérias contra si mesmas, levando à morte celular.

Como se sabe, os fagos são tipos de vírus que infectam bactérias com especificidade, utilizando-se de sua maquinaria para se replicar, podendo ou não levar à rápida destruição da célula infectada. O sistema CRISPR-cas, presentes em bactérias, comporta-se como um sistema imune, sendo capaz de gerar resistência a certos tipos de fagos ao longo do tempo, o que torna-se um fator dificultante em se tratando da já conhecida terapia contra bactérias patogênicas baseada no uso de bacteriófagos virulentos.

Entretanto, para contornar este problema, pesquisadores vêm desenvolvendo métodos para converter o bacteriófago em uma “arma infalível” contra bactérias patogênicas, através de um método de direcionamento do sistema CRISPR-Cas3 de bactérias contra o próprio genoma bacteriano, levando à degradação do material genético e morte celular. Para isso, o genoma de um fago capaz de infectar um patógeno de interesse é modificado, havendo a inserção de uma sequência específica codificadora de uma CRISPR RNA (crRNA) consenso, direcionada para agir sobre um pedaço do genoma bacteriano, e que se associaria ao complexo Cascade/Cas3. Ao infectar a célula, o genoma é expresso, levando tanto à produção de genes que provocam a lise quanto à expressão de crRNA, gerando um pre-crRNA. O pre-crRNA é processado e direcionado a um locus no genoma da bactéria, onde associa-se com a nuclease Cas3 que, tendo como alvo o DNA cromossomal da bactéria, resulta num processo degradativo irreversível deste.

Desta forma, pode-se dizer que a morte da célula se dá por dois mecanismos independentes: (1) o dano irreparável ao genoma causado pela expressão nativa do complexo Cascade/Cas3 dirigidas para agirem sobre o próprio genoma através do crRNA oriundo do bacteriófago e (2) a lise celular intrínseca ao fago em caso deste ser virulento. Os processos, mesmo diferentes, possuem a mesma finalidade, entretanto, a utilização do sistema CRISPR contra a própria bactéria apresenta-se como uma ferramenta a mais em se tratando de terapias envolvendo bacteriófagos, e apesar de as pesquisas serem bem recentes, o primeiro teste clínico já está sendo realizado nos Estados Unidos pela empresa Locus Biosciences, e os resultados da terapia com “crFagos”, como eles chamam, mostram-se bastante promissores.

**Referências**

GUPTA, Pooja D.; BIRDI, Tannaz J. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 8, n. 4, p. 266-275, 2017.

PURSEY, Elizabeth et al. CRISPR-Cas antimicrobials: challenges and future prospects. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1006990, 2018.

Reardon, S. (2017). Modified viruses deliver death to antibiotic-resistant bacteria. **Nature**, 546(7660), 586–587.

SELLE, Kurt et al. In Vivo Targeting of Clostridioides difficile Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. **Mbio**, v. 11, n. 2, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey. 2015.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane MP. **Biologia Molecular Básica-5**. Artmed Editora, 2014.