



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

HIRISLEIDE BEZERRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO ESTRUTURAL E EPIDEMIOLÓGICA DO SISTEMA
CRISPR/CAS EM GENOMAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER
BAUMANNII***

Recife
2019

HIRISLEIDE BEZERRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO ESTRUTURAL E EPIDEMIOLÓGICA DO SISTEMA
CRISPR/CAS EM GENOMAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER
BAUMANNII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Àrea de concentração: Biologia Molecular e Bioinformática

Orientador: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientador: Dr. Felipe Lira de Sá Cavalcanti

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Alves, Hirisleide Bezerra

Investigação estrutural e epidemiológica do sistema CRISPR/Cas em genomas de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* / Hirisleide Bezerra Alves - 2019.

87 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientador: Felipe Lira de Sá Cavalcanti

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. *Acinetobacter baumannii* 2. Infecção hospitalar 3. CRISPR
I. Balbino, Tereza Cristina Leal (orient.) II. Cavalcanti, Felipe Lira de Sá (coorient.) III. Título

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-314

HIRISLEIDE BEZERRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO ESTRUTURAL E EPIDEMIOLÓGICA DO SISTEMA
CRISPR/CAS EM GENOMAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER
BAUMANNII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 28/06/2019

Banca Examinadora:

Orientadora - Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Maria Betania Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tem realizado na minha vida, cada sonho, cada conquista, cada desafio superado.

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Tereza Cristina Leal Albino, pela oportunidade, orientação, paciência e conhecimentos compartilhados, os quais foram essenciais à realização deste trabalho, e contribuíram significativamente para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus amados pais, Dilza e Geovane, e minha irmã, Diane, os quais têm sido meu suporte durante toda a minha trajetória, sempre me apoiando e incentivando a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço em especial a Carol e Adrianne, por toda a contribuição na realização deste trabalho, e por todos os ensinamentos compartilhados.

Agradeço aos demais membros do grupo de pesquisa pelo acolhimento, apoio, opiniões, ensinamentos, muito obrigada.

A Júnior Freire pela companhia, paciência, conselhos e apoio nas minhas decisões.

Aos meus amigos de pós-graduação, Dalila, Renata, Isaura, Elton, Bárbara, Rayssa e Jackeline, que me ajudaram bastante, compartilhando os momentos difíceis do curso, e com descontração tornando-o mais leve.

As instituições que possibilitaram a execução deste trabalho, o PPGG pelo suporte acadêmico, o IAM FIOCRUZ-PE pela infraestrutura e o CNPq pelo suporte financeiro.

Por fim agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e o mais ele fará.” (BIBLIA, A. T., Salmos 37:5)

RESUMO

O sistema CRISPR/Cas constitui uma maquinaria de defesa contra elementos genéticos móveis, composto por proteínas Cas e pelo *locus* CRISPR. Este *locus* é formado por Repetições Diretas intercaladas por sequências únicas (espaçadores), cuja origem são principalmente bacteriófagos, plasmídeos e transposons. Além de fornecer proteção contra fagos, este sistema limita o processo de transferência horizontal de genes. *Acinetobacter baumannii* é um microrganismo oportunista frequentemente observado em infecções hospitalares. Poucos estudos foram realizados visando caracterizar o sistema CRISPR/Cas nesta espécie, e nenhum estudo com isolados brasileiros. O objetivo do presente trabalho foi determinar a presença do sistema CRISPR/Cas; caracterizar as sequências dos elementos que o compõem; identificar origem dos espaçadores, bem como realizar um estudo epidemiológico dos 47 isolados clínicos de *A. baumannii* através do perfil MLST e CRISPR. Os resultados demonstraram que 30% dos isolados possuíam o sistema CRISPR/Cas Tipo I-F, de acordo com o arsenal de genes *cas*. Os *loci* CRISPR identificados apresentaram Repetições Diretas, Repetições Degeneradas e sequência líder semelhantes. Foram verificados 150 espaçadores distintos, sendo estes oriundos de bacteriófagos, plasmídeos, genomas de outros organismos e regiões cromossômicas de *A. baumannii*. Descrevemos 89 espaçadores novos. O sistema foi identificado apenas entre isolados pertencentes ao ST113 e ST25, ambos relacionados ao CC25. Isolados do ST113 foram distribuídos entre quatro genótipos CRISPR (G1-G4). G5 compreendeu o único isolado pertencente ao ST25. A presença de pelo menos um dos genótipos associados ao ST113 em todos os hospitais investigados, revela a distribuição de *A. baumannii* ST113 entre as unidades hospitalares da cidade do Recife, caracterizando um sério problema de saúde pública.

Palavras-chave: CRISPR. Espaçadores. Repetições diretas. MLST.

ABSTRACT

The CRISPR/Cas system is a defense machinery against mobile genetic elements composed of Cas proteins and the CRISPR locus. This locus is formed by Direct Repeats interspersed by unique sequences (spacers), whose origin is mainly bacteriophages, plasmids and transposons. In addition to providing protection against phages, this system limits the horizontal gene transfer process. *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic microorganism often observed in nosocomial infections. Few studies have been conducted to characterize the CRISPR/Cas system in this species, and no studies with Brazilian isolates. The objective of the present work was to determine the presence of the CRISPR/Cas system; characterize the sequences of the elements that compose it; to identify origin of the spacers, as well as to carry out an epidemiological study of the 47 *A. baumannii* clinical isolates through MLST and CRISPR profile. The results showed that 30% of the isolates had the CRISPR/Cas Type I-F system according to the cas gene arsenal. The identified CRISPR loci had similar Direct Repeats, Degenerate Repeats and leader sequence. One hundred and fifty distinct spacers were verified, coming from bacteriophages, plasmids, genomes of other organisms and chromosomal regions of *A. baumannii*. We describe 89 new spacers. The system was identified only among isolates belonging to ST113 and ST25, both related to CC25. ST113 isolates were distributed among four CRISPR (G1-G4) genotypes. G5 comprised the only isolate belonging to the ST25. The presence of at least one of the ST113 associated genotypes in all the investigated hospitals reveals the distribution of *A. baumannii* ST113 among hospitals in the city of Recife, characterizing a serious public health problem.

Keywords: CRISPR. Spacers. Direct repetitions. MLST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas genéticas que compõem o sistema CRISPR/Cas.....	21
Figura 2 - Representação do mecanismo básico de ação do sistema CRISPR/Cas.....	27
Figura 3 - Classificação atualizada dos sistemas CRISPR/Cas	
3. a) Classe 1.....	30
3. b) Classe 2.....	31
Figura 4 - Montagem esquemática do <i>locus</i> CRISPR no isolado Acb1.....	42
Figura 5 - Esquema representativo dos espaçadores em cada isolado de <i>Acinetobacter baumannii</i> CRISPR/Cas subtipo I-F.....	46
Figura 6 - Disposição representativa dos 50 espaçadores iniciais no <i>locus</i> CRISPR dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	48
Figura 7 - <i>Sequence Types</i> (STs) identificados entre os isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	55
Figura 8 - Alinhamento estrutural dos genótipos CRISPR determinados a partir das matrizes de espaçadores, contendo os 50 primeiros espaçadores dos <i>loci</i>	56
Figura 9 - Representação esquemática da distribuição dos genótipos CRISPR entre os hospitais.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização estrutural do <i>locus</i> CRISPR de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	43
Quadro 2 - Componentes do locus CRISPR conservados entre os genomas de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> em estudo.	43
Quadro 3 - Repetições diretas com mutações.....	44
Quadro 4 - Sequência líder dos loci CRISPR e porcentagem do conteúdo AT.....	45
Quadro 5 - Sequência e origem dos espaçadores identificados análogos a sequências de elementos genéticos móveis.....	50
Quadro 6 - Informações epidemiológicas dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> , associadas ao genótipo CRISPR e MLST.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acb	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo do comprimento de fragmento amplificado
AT	Adenina e Timina
BLASTn	<i>Nucleotide-nucleotide BLAST</i> – BLAST Nucleotídeo-nucleotídeo
BLASTp	<i>Protein-protein BLAST</i> – BLAST Proteína-proteína
Cas	<i>CRISPR-associated</i> – Associada ao CRISPR
Cascade	<i>CRISPR-associated complex of antiviral defence</i> – Complexo de defesa antiviral associado ao CRISPR
CC	Complexo Clonal
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas
CRISPRdb	Ferramenta online de pesquisa CRISPR <i>database</i>
CRISPRFinder	Ferramenta online de identificação do <i>locus</i> CRISPR
CRISPRone	Ferramenta online de predição do sistema CRISPR/Cas
CRISPRTarget	Ferramenta online de predição de alvos de crRNA
crRNA	RNA CRISPR
crRNP	Complexo efetor de uma ou mais proteínas Cas juntamente com crRNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Repetição Direta
DG	Repetição Degenerada
G	Genótipo
GenBank	Banco de dados de sequências de nucleotídeos
HEPN	Domínio proteico
HGT	Transferência horizontal gênica
HNH	Domínio catalítico
MGE	Elemento genético móvel
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i> – Tipo de Sequência Multilocos

MLVA	<i>Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis</i> – Análise de Repetição em Tandem de Número Variável de Locos Múltiplos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NUC	Lóbulo de atividade nucleásica
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Quadro de Leitura Aberto
P	Padrão de similaridade dos espaçadores
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i> – Motivo Adjacente ao Protoespaçador
Pb	Pares de bases
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
REC	Lóbulo de reconhecimento
R-M	Modificação e restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RuvC-like	Domínio catalítico
ST	<i>Sequence Type</i> – Tipo de Sequência
tracrRNA	Transativador RNA CRISPR
Uniprot	Banco de dados de sequências de proteínas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA CONTRA FAGOS.....	17
2.2	SISTEMA CRISPR/CAS.....	18
2.2.1	Mecanismo geral de ação do sistema CRISPR/Cas.....	26
2.2.2	Tipos de sistema CRISPR/Cas.....	29
2.3	<i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	34
2.3.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> e o sistema CRISPR/Cas.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	GENOMAS DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	38
3.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO SISTEMA CRISPR/CAS.....	38
3.3	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	IDENTIFICAÇÃO DO <i>LOCUS</i> CRISPR E GENES CAS NOS GENOMAS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>ACINETOBACTER</i> <i>BAUMANNII</i>	41
4.2	ANÁLISE ESTRUTURAL DO <i>LOCUS</i> CRISPR.....	41
4.3	ANÁLISE DA ORIGEM DOS ESPAÇADORES.....	49
4.4	TIPAGEM MOLECULAR PELO MLST E CRISPR.....	54
4.5	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE	

	<i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	57
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A – CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO	80
	ANEXO A – DESCRIÇÃO DOS ESPAÇADORES ENCONTRADOS NESTE ESTUDO	82

1 INTRODUÇÃO

O CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) constitui uma família de DNA repetitivo presente no genoma de bactérias e arqueas. Esta região é composta por sequências repetidas, denominadas Repetições Diretas (DR), separadas por sequências variáveis nomeadas espaçadores, que são provenientes de fagos, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (MGE). Esses *loci* são tipicamente flanqueados pelos genes das proteínas Cas (*CRISPR-associated*), os quais codificam uma variedade de proteínas com funções distintas.

O sistema CRISPR/Cas é, primariamente, uma maquinaria adaptativa de defesa que permite aos procariotos protegerem-se contra a invasão de elementos genéticos móveis indesejados, tais como bacteriófagos, plasmídeos e transposons. Seu funcionamento depende da aquisição de pequenos fragmentos de DNA de origem viral e plasmidial, e posterior degradação de sequências exógenas correspondentes ao espaçador adquirido, em um mecanismo semelhante ao RNA de interferência em células eucarióticas.

Este sistema e seus elementos são, em geral, altamente variáveis entre os diferentes genomas em termos de ocorrência, composição gênica, sequências, número e tamanho. Embora o funcionamento do sistema CRISPR/Cas ainda não seja compreendido em sua totalidade, pesquisas têm revelado a importância deste sistema para inúmeras aplicações, como tipagem molecular baseada na hipervariabilidade dos espaçadores, experimentos de modulação de resistência ao fago, controle da disseminação de elementos genéticos móveis, e principalmente no uso deste sistema como ferramenta de engenharia genética na edição de genoma e controle transcricional.

O sistema CRISPR/Cas já foi identificado em genomas de vários patógenos bacterianos (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp e outras). Dentre estes patógenos, *Acinetobacter baumannii* destaca-se dentro do seu gênero, constituindo-se como um dos mais preocupantes para as instituições de saúde, devido à existência de cepas resistentes a todos os antimicrobianos usualmente disponíveis para o tratamento, sendo sensíveis apenas à polimixina B. Atualmente na cidade do Recife-PE, *A. baumannii* é uma das espécies bacterianas mais

prevalentes, responsável por casos de infecções hospitalares em vários centros de saúde.

Acinetobacter baumannii possui elevada plasticidade gênica, permitindo a incorporação de diversos MGEs do ambiente, o que resulta em isolados bastante dinâmicos. O seu repertório genético inclui ilhas de resistência, plasmídeos e outros MGEs. Tal fato reflete-se na versatilidade metabólica e ampla resistência aos antimicrobianos, proporcionando a seleção desta espécie no ambiente hospitalar. No genoma de algumas cepas de *A. baumannii* já foram reportados dois tipos de sistemas CRISPR/Cas. No entanto, pouquíssimos estudos foram realizados sobre o sistema CRISPR/Cas nesta espécie bacteriana, e nenhum trabalho ainda realizado no Brasil.

Partindo-se da premissa de que o sistema CRISPR/Cas pode interferir em processos de transferência horizontal de genes, influenciando na vantagem seletiva, sua presença pode consistir em saldo positivo ou negativo à bactéria. Desta forma, identificar o sistema CRISPR/Cas, bem como, determinar sua estrutura em isolados multirresistentes, é o ponto inicial para sugerir possíveis vantagens ou desvantagens intrínsecas à presença deste sistema, assim como, a presença de sistemas potencialmente ativos ou inativos nestes isolados. Logo, os resultados obtidos poderão ser promissores à comunidade científica para, posteriormente, compreender a real interferência da maquinaria CRISPR/Cas na bactéria e os benefícios intrínsecos à manutenção ou perda deste sistema entre patógenos multirresistentes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar e caracterizar o sistema CRISPR/Cas em genomas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes isolados de hospitais públicos da cidade do Recife-PE.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a)** Identificar a presença do *locus* CRISPR e genes *cas* em isolados clínicos de *A. baumannii*;
- b)** Analisar a organização estrutural dos *loci* CRISPR nos isolados estudados;
- c)** Identificar o tipo de sistema CRISPR/Cas presente no genoma de cada isolado;
- d)** Estabelecer a possível origem e diversidade dos espaçadores CRISPR encontrados nos isolados;
- e)** Realizar um estudo epidemiológico molecular pelo CRISPR e MLST nos isolados de *A. baumannii*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA CONTRA FAGOS

A transferência horizontal de genes (HGT) impulsiona a evolução e diversidade genética das bactérias, conferindo-lhes capacidade de adaptação em diversos ambientes e resposta a novas pressões seletivas (Delavat et al., 2017). Este mecanismo produz genomas extremamente dinâmicos, resultando em novas combinações de sequências de genes, interferindo na fisiologia, virulência, patogenicidade e resistência bacteriana (Soucy; Huang; Gogarten, 2015). Elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) desempenham papel crucial neste processo (Johnson; Grossman, 2015).

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, infectam especificamente bactérias, sendo abundantes no planeta, estimando-se em mais de 10^{30} partículas virais no ambiente (superando em 10 vezes o número de células bacterianas). Considera-se que estas partículas são bastante diversificadas, em virtude de sua adaptação genética dinâmica diante de pressão seletiva (Díaz-Muñoz; Koskella, 2014; Blower et al., 2017).

Apesar de consistirem em uma importante ferramenta para HGT, fagos também representam uma ameaça à sobrevivência e multiplicação bacteriana. Deste modo, bactérias e seus predadores virais estão em competição constante (Samson et al., 2013; Chaudhary; Chattopadhyay; Pratap, 2017). A exposição permanente à infecção por fagos impõe às bactérias a necessidade de desenvolver métodos de resistência viral visando sua sobrevivência e proliferação (Samson et al., 2013; Dy et al., 2014).

Nesse contexto, as bactérias desenvolveram um impressionante arsenal de mecanismos de defesa, os quais, em geral, atuam sobre o bloqueio da infecção e propagação dos fagos de forma inata e inespecífica (Burmistrz; Pyrc, 2015). Tais métodos incluem a inibição da adsorção e injeção de DNA, modificação e restrição de moléculas de DNA exógenas e sistemas de infecção abortiva (Samson et al., 2013; Dy et al., 2014; Burmistrz; Pyrc, 2015; Pawluk; Davidson; Maxwell, 2018).

A evidenciação, relativamente recente, de outro sistema imune bacteriano capaz de reconhecer, direcionar e degradar sequências de ácidos nucleicos exógenos de forma específica representou um avanço importante na área da

Microbiologia e Engenharia Genética (Hatoum-Aslan; Marraffini, 2014; Zhang; Ye, 2017; Modell; Jiang; Marraffini, 2017). Este sistema, denominado CRISPR/Cas funciona como memória imunológica hereditária de exposições passadas a fagos e plasmídeos (Koonin; Makarova; Zhang, 2017; Rodic et al., 2017). O crescimento exponencial de estudos relacionados a este sistema demonstra o ativo interesse em elucidar inúmeras questões a ele intrínsecas: estrutura, mecanismo de ação, vias regulatórias, funções, entre outras. No entanto, o conhecimento acerca das interfaces tangentes a este complexo mecanismo está apenas começando a ser desvendado (Patterson; Yevstigneyeva; Fineran, 2017).

2.2 SISTEMA CRISPR/CAS

O sistema CRISPR/Cas está presente em cerca de 90% dos genomas de arqueas e aproximadamente 48% dos genomas bacterianos até então sequenciados (CRISPRs web server, 2017; Chaudhary; Chattopadhyay; Pratap, 2017; Maikova et al., 2018).

Este sistema corresponde a um mecanismo adaptativo de defesa contra elementos genéticos móveis (MGEs), como fagos, plasmídeos conjugativos, transposons e ilhas de patogenicidade (Westra; Buckling; Fineran, 2014; Sontheimer; Davidson, 2017), cuja função é semelhante aos sistemas de interferência de RNA eucariótico (RNA de interferência), onde ocorre silenciamento de elementos transponíveis utilizando-se uma molécula de RNA como guia. O sistema CRISPR/Cas é constituído por dois elementos: um *locus* para armazenamento de memória (*locus* CRISPR) e genes *cas* que codificam os elementos efetores deste sistema (proteínas *Cas*) (Hatoum-Aslan; Marraffini, 2014; Rodic et al., 2017).

O *locus* CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) consiste em um elemento genético organizado em repetições, em sua maioria idênticas, separadas por sequências variáveis, de tamanho similar, denominadas espaçadores (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Leal-Balbino et al., 2016; Maikova et al., 2018). Apresenta uma sequência líder flanqueando as repetições em uma extremidade, e nenhuma ORF (*Open Reading Frame* – quadro de leitura aberto) funcional inclusa (Deveau; Garneau; Moineau, 2010). Foi primeiramente descrito por Ishino e colaboradores em 1987, como uma sequência

parcialmente repetitiva a jusante do gene *iap* no cromossomo de *Escherichia coli* cepa K12, compreendendo cinco repetições diretas idênticas com 29 pares de bases (pb) interespaçadas por regiões variáveis de 32 pb (Ishino et al., 1987; Al-Attar et al., 2011; Chaudhary; Chattopadhyay; Pratap, 2017). A função biológica destes motivos repetitivos, todavia, permanecia indefinida (Labrie; Samson; Moineau, 2010).

Posteriormente, um estudo realizado por Groenen et al. (1993) revelou sequências repetitivas com 36 pb separadas por regiões distintas de 35 a 41 pb em *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993). Mojica et al. (1995), avaliaram o mesmo tipo de repetições em *Haloferax volcanii* e *Haloferax mediterranei*. Em 2000, investigando várias bactérias e arqueas, Mojica et al. relataram tais sequências como famílias de DNA repetitivo equivalentes (Mojica et al., 1995; Mojica et al., 2000; Al-Attar et al., 2011). Considerando estes estudos, Jansen et al., em 2002, introduziram o acrônimo CRISPR, descrevendo inclusive os primeiros genes *cas* (Jansen et al., 2002), fornecendo o suporte para o reconhecimento atual deste *locus*. Desde então, estudos revelaram a presença de *loci* únicos na maioria dos genomas analisados. Existem vários exemplos de espécies bacterianas ou arqueas que abrigam múltiplos *loci* CRISPR no cromossomo (Bhaya; Davison; Barrangou, 2011; Barrangou; Marraffini, 2014).

As regiões conservadas dentro do *locus* são denominadas Repetições Diretas (DR), cujo comprimento é em torno de 21 a 48 pb (Barrangou; Marraffini, 2014). Em virtude de sua natureza parcialmente palíndroma (sequência GTTTg/c e GAAAC nas porções 5' e 3', respectivamente), foi criada a hipótese de que os transcritos dessas regiões possam formar estruturas de RNA secundária estáveis, as quais favoreceriam interações específicas com as proteínas Cas (Al-Attar et al., 2011). A DR no final do *locus* é comumente truncada ou difere da sequência de consenso, sendo então nomeada Repetição Degenerada (DG), pois apresenta mutações (Richter; Chang; Fineran, 2012).

O número de DRs presentes em um *locus* não é constante, alterando-se em função do processo adaptativo intrínseco do sistema, podendo variar em diferentes organismos ou mesmo em linhagens da mesma espécie. A sequência da DR define cada *locus* CRISPR, de modo que, *loci* distintos, embora em um mesmo genoma, possam apresentar DRs diferentes (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Burmistrz; Pyrc, 2015).

As sequências não-repetitivas do *locus*, os espaçadores, caracterizam-se como constituintes altamente variáveis, possuindo entre 26 e 42 pb (Burmistrz; Pyrc, 2015). Consistem em fragmentos únicos adquiridos de sequências de ácido nucleico exógenas, mediante exposições a MGEs. São cruciais à imunidade adaptativa, pois funcionam como “memória” genética de um organismo a infecções anteriores sem sucesso (Sternberg et al., 2016). Em geral, cada espaçador do *locus* é diferente, salvo à exceção de duplicações (Al-Attar et al., 2011). Estudos também abordaram uma grande fração de espaçadores com origem desconhecida, isentos de similaridade com outros organismos (Sternberg et al., 2016). Tal fato pode decorrer do número limitado de microrganismos sequenciados e depositados em bancos de dados do genoma inviabilizando a análise de homologias e, conseqüentemente, condicionando à perda de informações sobre o espaçador (Al-Attar et al., 2011; Chaudhary; Chattopadhyay; Pratap, 2017).

À montante do *locus* CRISPR verifica-se uma sequência rica em adenina e timina, denominada Sequência Líder. Pode estender-se de 47 pb em algumas bactérias para centenas de pb em arqueas termófilas, apresentando-se similares dentro da mesma espécie (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Alkhnbashi et al., 2016). Esta região contém elementos promotores responsáveis pela transcrição do *locus* CRISPR e sítios de ligação para proteínas reguladoras (Burmistrz; Pyrc, 2015). Estas sequências também apresentam motivos conservados, cuja função não está definida, contudo, estudos sugerem seu possível envolvimento na integração do complexo transcricional ao promotor e/ou na montagem das proteínas Cas (Alkhnbashi et al., 2016). A sequência líder possui influência no processo adaptativo do sistema CRISPR/Cas (Diez-Villasenor et al., 2013), de modo que, sua exclusão diminui a aquisição de novos espaçadores (Gudbergdottir et al., 2011).

Finalmente, adjacentes ao *locus* estão os genes *cas* (*CRISPR-associated*), responsáveis pela codificação das proteínas efetoras no mecanismo, em números que variam de 4 a 20 (genes *cas* diferentes) (Burmistrz; Pyrc, 2015; Hille et al., 2018). Geralmente, genomas que apresentam múltiplos *loci* CRISPR possuem apenas um conjunto de genes *cas*; todavia, se cada *locus* compreender DRs distintas verifica-se a presença de genes *cas* intrínsecos a cada *locus*, visto que, as DRs e os genes *cas* são *locus*-específicos (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Bhaya; Davison; Barrangou, 2011). CRISPRs isolados, sem genes *cas* adjacentes, foram reportados em algumas espécies, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*

(Mandim et al., 2007), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Jorth; Whiteley, 2012) e *Enterococcus faecalis* (Hullahalli et al., 2018), onde observou-se que, apesar da expressão do *locus* a atividade do sistema quanto a adaptação e interferência era ausente. Este achado conduziu à hipótese de que estes *loci* correspondiam a remanescentes de sistemas CRISPR/Cas funcionais, e, sobretudo, enfatizou a importância dos genes *cas* neste mecanismo adaptativo (Zhang; Ye, 2017).

Uma representação esquemática do *locus* CRISPR e seus componentes adjacentes encontra-se na Figura 1.

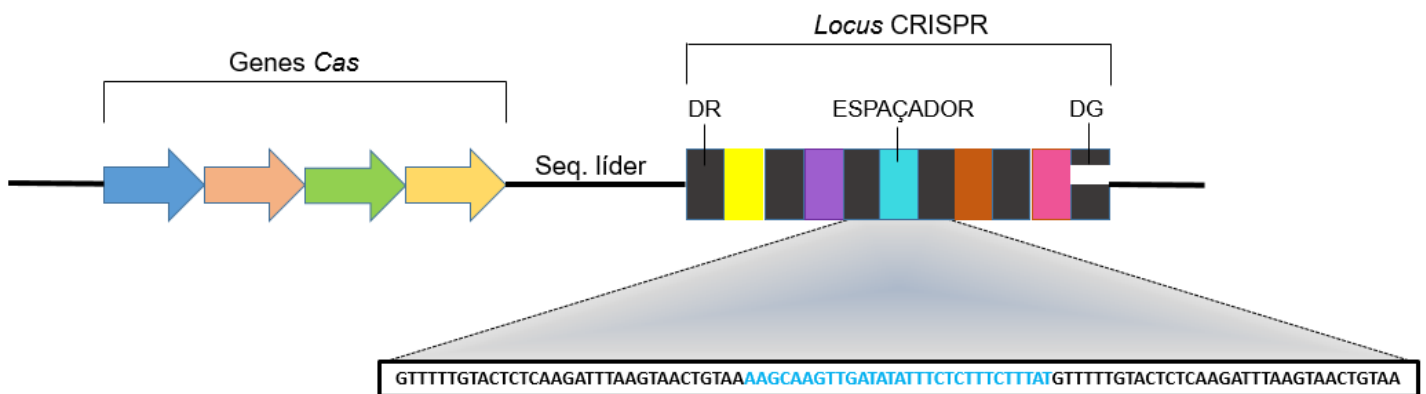


Figura 1. Representação esquemática das estruturas genéticas que compõem o sistema CRISPR/Cas. A sigla DR corresponde a Repetição Direta e a sigla DG corresponde a Repetição Degenerada.

As proteínas Cas constituem o maquinário enzimático do sistema CRISPR/Cas e apresentam domínios característicos de helicases, nucleases, polimerases e proteínas de ligação a RNA e DNA (Burmistrz; Pirc, 2015). De acordo com sua função, distribuem-se em quatro categorias: nucleases e/ ou recombinases, atuantes na aquisição de espaçadores (Cas1 e Cas2); ribonucleases, relacionadas ao processamento de crRNA (RNA CRISPR) (Cas6); proteínas que se associam ao crRNA para formar os complexos efetores (por exemplo, Cas5, Cas7 e Cas8); e nucleases responsáveis pela degradação dos alvos de DNA ou RNA (por exemplo, Cas3 e Cas9) (Van der Oost et al., 2014). O número e tipos de proteínas Cas são distintos em cada tipo e subtipo de sistema CRISPR/Cas, de modo que, cada subtipo possui uma proteína de assinatura que determina o tipo principal e um conjunto de proteínas específicas que o caracterizam (Burmistrz; Pirc, 2015). As proteínas Cas1 e Cas2 são encontradas na maioria dos sistemas CRISPR/Cas (Makarova et al., 2015).

A identificação dos genes *cas* e, conseqüentemente, dos possíveis papéis das proteínas Cas constituiu um passo importante para a compreensão da função do *locus* CRISPR, a qual permanecia desconhecida desde sua descoberta em 1987 (Makarova et al., 2002). Até então, estas proteínas eram relacionadas apenas ao reparo de DNA em bactérias e arqueas. Entretanto, seu papel na proteção de procariotos contra ácidos nucleicos invasores só foi elucidada a partir de 2005, quando três grupos reconheceram independentemente que as sequências de alguns espaçadores CRISPR eram homólogas às de MGEs (Mojica et al., 2005; Bolotin et al., 2005; Pourcel; Salvignol; Vergnaud, 2005). A correlação entre a posse de espaçadores oriundos de vírus e a resistência bacteriana ao vírus correspondente conduziu à hipótese de que os *loci* CRISPR associados às proteínas Cas constituiriam um sistema de proteção bacteriana contra elementos invasores (Mojica et al., 2005; Bolotin et al., 2005). Esse papel foi então confirmado por Barrangou et al. (2007), a partir de estudo com *Streptococcus thermophilus*, no qual demonstraram que cepas se tornaram resistentes ao fago mediante incorporação de espaçadores equivalentes ao genoma viral, evidenciando que a ausência ou presença de espaçadores homólogos aos fagos proporcionava, respectivamente, sensibilidade ou resistência a estes (Barrangou et al., 2007; Richter; Chang; Fineran, 2012; Westra; Buckling; Fineran, 2014).

O sistema CRISPR/Cas caracteriza-se principalmente por sua atividade na imunidade adaptativa de bactérias e arqueas, contudo, sua arquitetura versátil propicia-lhe outras funções, já descritas em vários estudos. Além de consistir em um mecanismo de defesa contra fagos, também limita a aquisição de plasmídeos por conjugação e transformação (Watson; Staals; Fineran, 2018). Marraffini e Sontheimer (2008) reportaram esse evento em estudo com isolados de *Staphylococcus epidermidis*, no qual demonstraram que o sistema CRISPR/Cas, através de homologia entre um espaçador e um plasmídeo sequência-alvo, é capaz de interferir no processo de HGT (Marraffini; Sontheimer, 2008). A instabilidade plasmidial em decorrência deste mecanismo também foi referida por Garneau e colaboradores (2010) (Garneau et al., 2010). Embora, o sistema CRISPR/Cas contribua à manutenção da estabilidade do genoma, evitando uma sobrecarga ao metabolismo procariótico para manter e expressar diversos genes adquiridos via HGT, ele também pode privar a aquisição de genes vantajosos à adaptação e

evolução bacteriana (como, por exemplo, genes de resistência a antibióticos e de virulência) (Hatoum-Aslan; Marraffini, 2014).

Os sistemas CRISPR/Cas também podem atuar na regulação da expressão de genes de virulência importantes em determinadas bactérias (Hatoum-Aslan; Marraffini, 2014). Os crRNAs podem regular a expressão de genes mediante complementariedade parcial com o alvo, como descrito, por exemplo, em estudos com *Pseudomonas aeruginosa*, nos quais evidenciaram a capacidade dos transcritos CRISPR de reverter efeitos decorrentes da infecção lisogênica com o fago DMS3, a partir da inativação de genes virais que inibiam a formação de biofilme e motilidade (Zegans et al., 2009; Westra; Buckling; Fineran, 2014).

As proteínas Cas já foram relacionadas à regulação de processos diversos, como, por exemplo, esporulação e formação de corpos frutíferos em *Myxococcus xanthus* (Viswanathan et al., 2007), e expressão da lipoproteína bacteriana (BLP), essencial à virulência, em *Francisella novicida* (Sampson et al., 2013). Em *Campylobacter jejuni* foi demonstrado o papel da Cas9 na regulação da expressão de proteínas de superfície, a partir de estudo realizado por Louwen et al. (2013), no qual relataram em cepas mutantes de *C. jejuni* (desprovidas de Cas9) um aumento da ligação de anticorpos a receptores de superfície, devido a modificações estruturais (Louwen et al., 2013; Westra; Buckling; Fineran, 2014). Outra habilidade concernente às proteínas Cas consiste no reparo do DNA, reportada em estudo por Babu et al. (2011), através de interação da proteína Cas1 (purificada de *Escherichia coli*) com enzimas de reparo (por exemplo, RecB, RecC, RuvB e UvrC) (Babu et al., 2011). A Cas1 foi caracterizada como uma nuclease multifuncional capaz de clivar as Junções Holliday (HJs) e outros substratos de DNA ramificados (Hille; Charpentier, 2016), e incorporar tais fragmentos ao locus (Babu et al., 2011).

De acordo com Briner e Barrangou (2016), a presença de sequências espaçadoras homólogas ao cromossomo hospedeiro é comum em arranjos CRISPR (Briner; Barrangou, 2016; Hille; Charpentier, 2016). Todavia, partindo-se da premissa que, o espaçador é transcrito em uma molécula de RNA-guia, a qual especifica a sequência-alvo de clivagem das proteínas Cas, esta homologia ao cromossomo hospedeiro, ou a um plasmídeo que contém genes vantajosos, condiciona a um evento citotóxico (Vercoe et al., 2013). Diante disso, a célula dispõe de algumas possíveis opções: mutação dos genes *cas* (visando a codificação de proteínas de interferência não funcionais) (Briner; Barrangou, 2016), deleção do

espaçador no *locus* CRISPR (Selle; Klaenhammer; Barrangou, 2015), alteração na sequência genômica alvo (de modo a suprimir a complementariedade com o espaçador), modificações nas sequências responsáveis pelo reconhecimento do alvo, reorganização do genoma (objetivando a deleção de sequências genômicas não essenciais complementares aos espaçadores) (Briner; Barrangou, 2016). Estas alternativas, embora proporcionem escape à maquinaria CRISPR, requerem vários custos energéticos (Jiang et al., 2013; Briner; Barrangou, 2016).

Apesar de constituir um risco letal ao hospedeiro, a autossegmentação cromossômica representaria um fator promissor à evolução do genoma. Vários estudos demonstraram que estas modificações genéticas influenciam no processo evolutivo (Hille; Charpentier, 2016). Vercoe et al. (2013) comprovaram em *Pectobacterium atrosepticum* grandes rearranjos cromossômicos a partir de homologia entre espaçador e sequência de uma ilha genômica adquirida horizontalmente (HAI2) (100 kb) (Vercoe et al., 2013; Hille; Charpentier, 2016). Tal correspondência pode conduzir à excisão precisa e perda de ilhas de patogenicidade pré-existentes, à modificação destas ou exclusão de outras regiões do cromossomo (Vercoe et al., 2013). Embora, o auto-direcionamento relacionado ao CRISPR promova a remodelação genômica como um efeito colateral, viabilizando a constituição de novos genótipos, o mesmo caracteriza-se como um evento indesejável, porque transmite a autoimunidade. Como resultado, os sistemas CRISPR/Cas podem tornar-se degenerados, mediante mutações nos genes cas e nos locais-alvo, bem como, pela inativação ou exclusão de sistemas inteiros, conduzindo à perda de aptidão em relação à defesa antiviral (Stern et al., 2010; Hille; Charpentier, 2016).

Fatores como pressão seletiva, existência de outros sistemas de defesa antiviral e custo energético influenciam na perda do sistema CRISPR/Cas em determinadas linhagens, ou mesmo na espécie como um todo (Hille; Charpentier, 2016). Manter um sistema CRISPR/Cas sem qualquer pressão predatória pode resultar na diminuição do *fitness* bacteriano. Bactérias podem perder ou inativar seus sistemas CRISPR/Cas quando enfrentam um grande número de vírus predatórios, pois devido às altas taxas de mutação viral, os custos intrínsecos à adaptação podem exceder os benefícios imunológicos (Weinberger et al., 2012; Hille; Charpentier, 2016). Em tais situações, como reportado por Westra et al. (2015), em estudo com *Pseudomonas aeruginosa*, o mecanismo adaptativo do

sistema CRISPR/Cas torna-se dispendioso de maneira, que o método de resistência a fagos mais viável corresponde a modificações dos receptores de superfície celular, a depender do meio e da pressão seletiva em que o microrganismo está inserido (Westra et al., 2015; Vale et al., 2015).

Embora a presença dos sistemas CRISPR/Cas entre espécies bacterianas (até então sequenciadas) represente um quantitativo relativamente baixo, quando comparado em arqueas (aproximadamente 48% e 90%, respectivamente), a análise destes tem contribuído expressivamente para a genotipagem de cepas patogênicas ou ambientalmente relevantes (Grissa; Vergnaud; Pourcel, 2007; Briner; Barrangou, 2016).

A tipagem molecular de linhagens bacterianas é realizada através de técnicas como PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), MLVA (*Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*). O MLST é o padrão-ouro para investigar a estrutura populacional e a epidemiologia global de diferentes linhagens bacterianas, utilizando sequências de fragmentos internos de genes *housekeeping* (sete genes normalmente) (Zarrilli et al., 2013). Para cada gene *housekeeping*, diferentes sequências presentes em linhagens bacterianas distintas, são classificados como alelos diferentes. Para cada isolado, o conjunto dos alelos de cada um dos sete *loci* define o perfil alélico ou tipo de sequência, também chamado de sequence type (ST). Cada isolado da espécie é posteriormente caracterizado pela série dos sete integrantes de alelos dos genes *housekeeping* escolhidos (Hamouda et al., 2010).

A análise do *locus* CRISPR tem sido uma importante ferramenta para tipagem de linhagens bacterianas que possuem o sistema CRISPR/Cas, apresentando maior poder discriminatório do que o MLST (Tomida et al., 2017). De acordo com Shariat e Dudley (2014), os *loci* CRISPR constituem alvos genéticos para a tipagem de alta resolução e estudos microevolutivos entre as bactérias que os possuem (Shariat; Dudley, 2014). A avaliação de arranjos CRISPR, baseada no conteúdo de espaçadores e sua ordem de incorporação no *locus*, fornece informações acerca da taxa de rotatividade de MGEs em um ambiente e sobre o contato destes com linhagens bacterianas específicas seguindo uma linha temporal (Horvath et al., 2009). Considerando que uma sequência do DNA invasor é adicionada como espaçador na extremidade do *locus* próxima à sequência líder, de

forma polarizada, é possível distinguir entre as sequências mais antigas e aquelas recentemente inseridas (Briner; Barrangou, 2016). Isso pode ser explorado para observar as séries temporais de exposições de uma cepa a elementos invasivos, estabelecer relações filogenéticas entre cepas que compartilham agrupamentos de espaçadores comuns, e exibir caminhos evolutivos divergentes ao longo do tempo mediante aquisição de espaçadores distintos (Andersen et al., 2016).

A tipagem fundamentada no *locus* CRISPR mostrou-se especialmente eficiente para investigações de surtos de patógenos bacterianos, permitindo a diferenciação de isolados clonais, frente a outros métodos de tipagem (Andersen et al., 2016) em espécies bacterianas como *Yersinia pestis* (Cui et al., 2008; Barros et al., 2014), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Timme et al., 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993), *Lactobacillus buchneri* (Briner; Barrangou, 2014), *Clostridium difficile* (Andersen et al., 2016) e *Helicobacter cinaedi* (Tomida et al., 2017).

2.2.1 Mecanismo geral de ação do Sistema CRISPR/Cas

O funcionamento do sistema CRISPR/Cas compreende três etapas principais: (I) adaptação, aquisição ou imunização; (II) expressão ou biogênese do crRNA; (III) interferência ou ação contra a molécula alvo (Dy et al., 2014) (Figura 2).

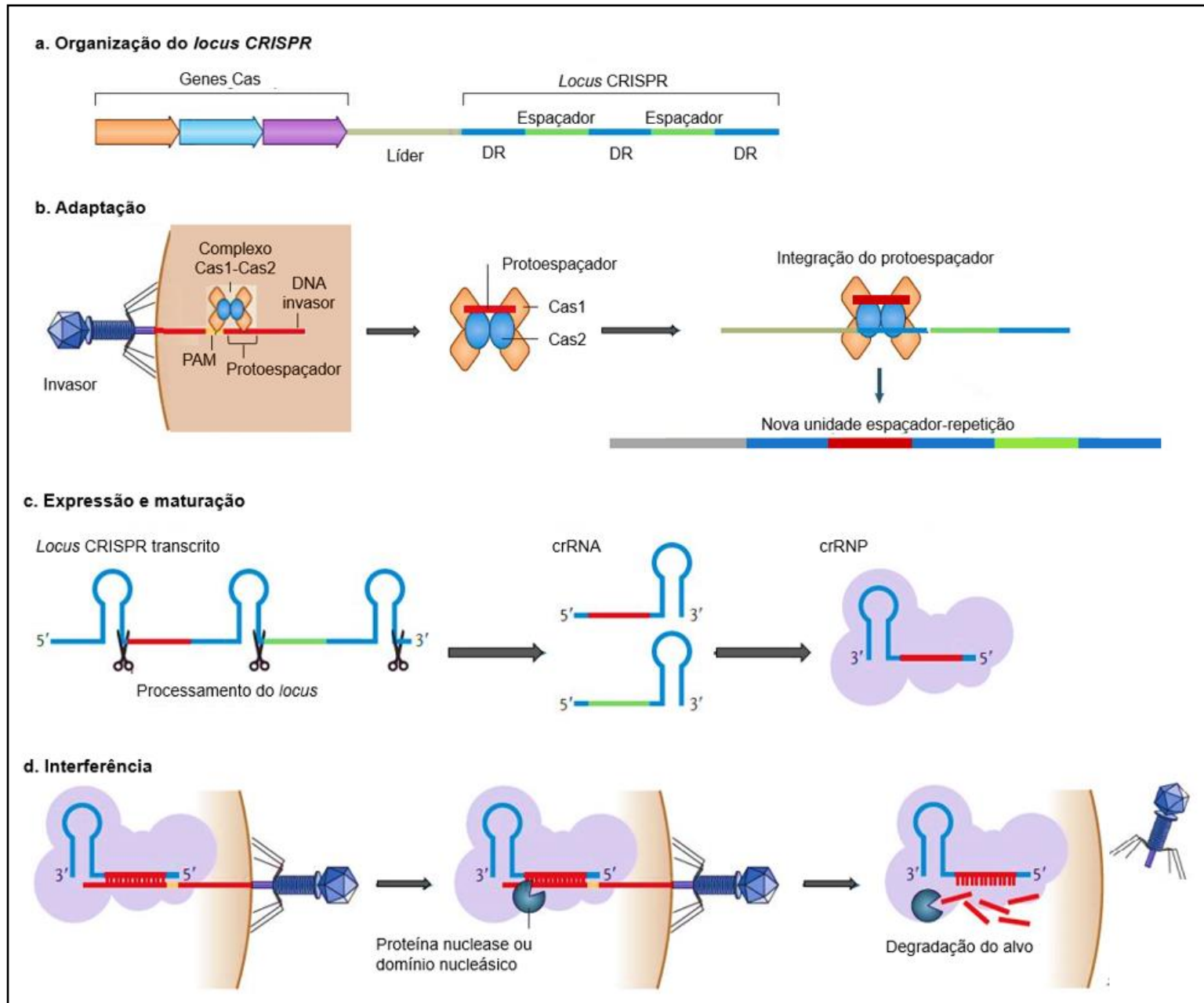


Figura 2. Representação do mecanismo básico de ação do sistema CRISPR/Cas. DR = Repetição Direta. PAM = Motivo Adjacente ao Protoespaçador. crRNA = RNA CRISPR. crRNP = Complexo Ribonucleoproteico Efetor. Fonte: Adaptado de Amitai e Sorek (2016).

A adaptação ocorre mediante o primeiro contato com o fago ou outro MGE. Durante esta etapa, acontece a fragmentação do DNA exógeno por sistemas R-M (Restrição-Modificação) naturais da célula bacteriana; o reconhecimento de protoespaçadores (potenciais espaçadores); e incorporação do novo espaçador no início do *locus* CRISPR, próximo à sequência líder (Van der Oost et al., 2014; Burmistrz; Pyrc, 2015). Os fragmentos resultantes da clivagem via sistema R-M são reconhecidos como protoespaçadores através do reconhecimento de PAM (Motivo adjacente ao protoespaçador), uma sequência nucleotídica curta (2 a 5 pb) e específica, que flanqueia o protoespaçador (Van der Oost et al., 2014). As proteínas Cas envolvidas no processo de adaptação possuem domínios específicos para detecção de PAM (Jackson et al., 2017). Nesta etapa, Cas1 e Cas2 atuam formando um complexo proteico estruturalmente estável (Cas1-Cas2), que reconhece PAM e captura o protoespaçador. Após a captura do protoespaçador, o complexo proteico reconhece e interage com a sequência líder do *locus* CRISPR, mediante domínios de interação específicos, propiciando a integração do protoespaçador (Jackson et al., 2017). A integração do protoespaçador é acompanhada pela duplicação da DR terminal-líder, podendo envolver polimerases e maquinário de reparo de DNA (Westra; Buckling; Fineran, 2014).

A etapa de expressão, ou biogênese do crRNA, consiste na transcrição do *locus* CRISPR em uma grande molécula de RNA conhecida como pré-crRNA (pré-RNA CRISPR). Posteriormente, este pré-crRNA é processado por clivagem endonucleotídica, resultando em pequenos crRNAs, contendo um espaçador específico e partes da DR (Van der Oost et al., 2014; Burmistrz; Pyrc, 2015). Esta clivagem ocorre na base do *hairpin* formado pelo palíndromo das repetições CRISPR, produzindo um crRNA com uma sequência de oito nucleotídeos derivada da DR na região 5', e outra com o limite menos definido na região 3' (Amitai; Sorek, 2016). Os crRNAs maduros se associam com proteínas Cas, formando um complexo ribonucleoproteico efetor (crRNP) estável (Westra; Buckling; Fineran, 2014).

Na etapa de interferência, o crRNP identifica a molécula de DNA alvo através do pareamento de bases entre o crRNA e o fragmento invasor correspondente. O crRNA funciona como um guia às proteínas do crRNP, permitindo, através do pareamento de bases, o reconhecimento e, subsequente,

degradação do material genético exógeno (Westra; Buckling; Fineran, 2014). Nesta fase, a identificação específica de PAM nos fragmentos invasores é crucial para a discriminação de alvo, impedindo o reconhecimento dos próprios espaçadores CRISPR pelo crRNP e, conseqüentemente, a autodestruição do *locus* (Van der Oost et al., 2014; Hille; Charpentier, 2016). A partir do pareamento de bases entre o crRNA e fragmento invasor, ocorre uma mudança conformacional no crRNP, cuja estrutura pode expor um domínio de nuclease ou recrutar uma Cas (com atividade de nuclease), visando a clivagem do material genético invasor (Van der Oost et al., 2014).

2.2.2 Tipos de Sistema CRISPR/Cas

Embora as etapas principais do mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas sejam comuns entre diferentes organismos, divergências quanto a arquitetura genômica do *locus* e do *operon* Cas conduziram à classificação destes sistemas em tipos e subtipos distintos (Van der Oost et al., 2014). Esta classificação, baseada em análises filogenéticas, genômica comparativa e estrutural, aborda como critérios: genes *cas* de assinatura, específicos para tipos e subtipos individuais de sistemas CRISPR/Cas; similaridade de sequência entre múltiplas proteínas Cas compartilhadas; filogenia de Cas1 (proteína Cas mais conservada); organização dos genes *cas* e estrutura do *locus* CRISPR (Makarova et al., 2015; Koonin; Makarova; Zhang, 2017). De acordo com tais parâmetros, os sistemas CRISPR/Cas são divididos em duas classes distintas, as quais são subdivididas em seis tipos e diversos subtipos (Figura 3). A Classe 1 inclui os sistemas CRISPR/Cas do tipo I e do tipo III, bem como, o novo tipo IV, os quais caracterizam-se pelo emprego de um complexo efetor (crRNP) com múltiplas proteínas Cas durante a etapa de interferência. A Classe 2 compreende os sistemas CRISPR/Cas tipos II, V e VI, definidos pela presença de um complexo efetor simples, constituído por uma única proteína Cas com múltiplos domínios (Makarova et al., 2015; Koonin; Makarova; Zhang, 2017).

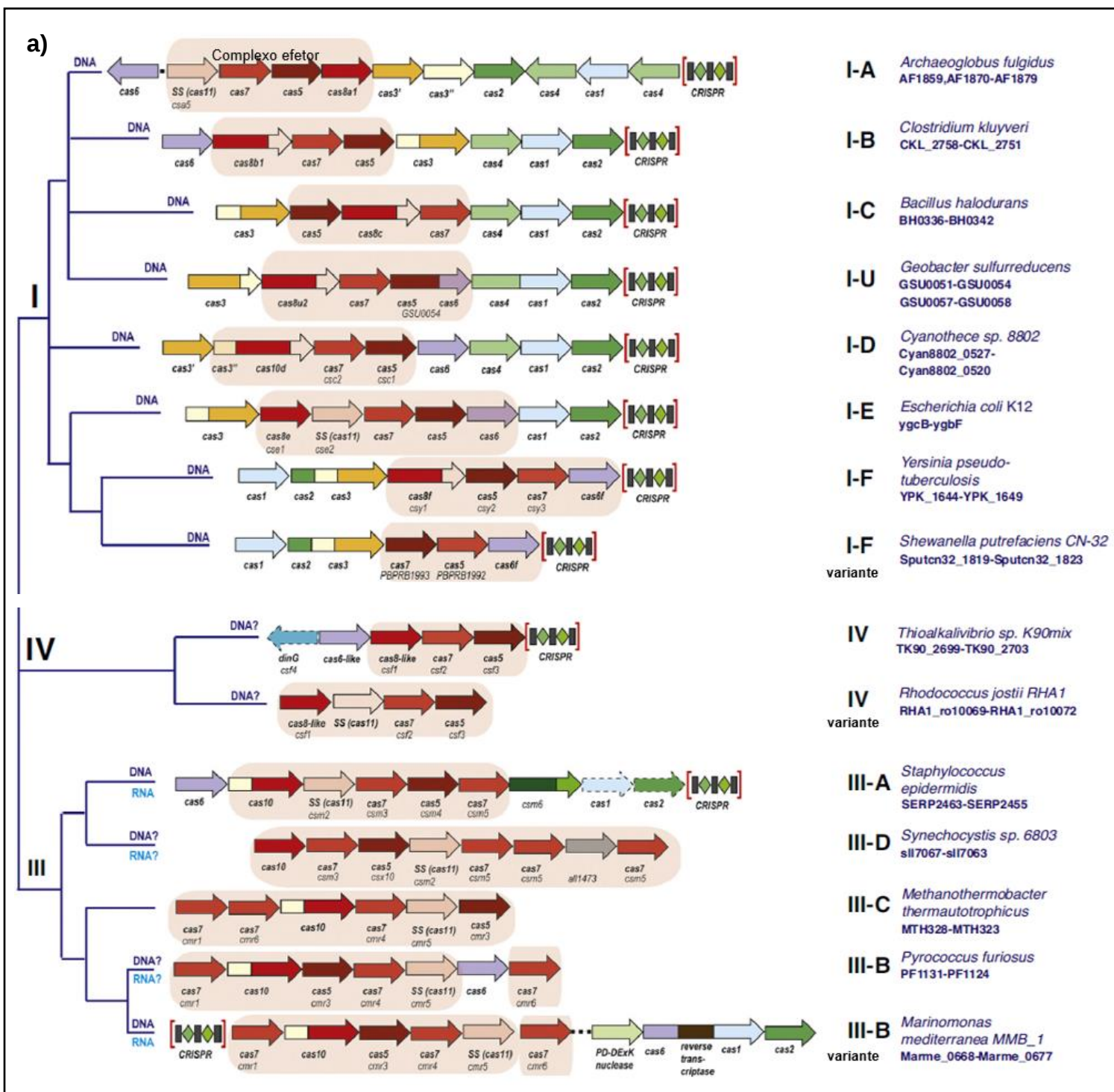


Figura 3. Classificação atualizada dos Sistemas CRISPR/Cas. a) Classe 1. b) Classe 2. A organização das proteínas efetoras em relação ao locus CRISPR, bem como o alvo (previsto) (DNA ou RNA, ou ambos) são mostrados para cada subtipo. Fonte: Adaptado de Koonin, Makarova e Zhang (2017).

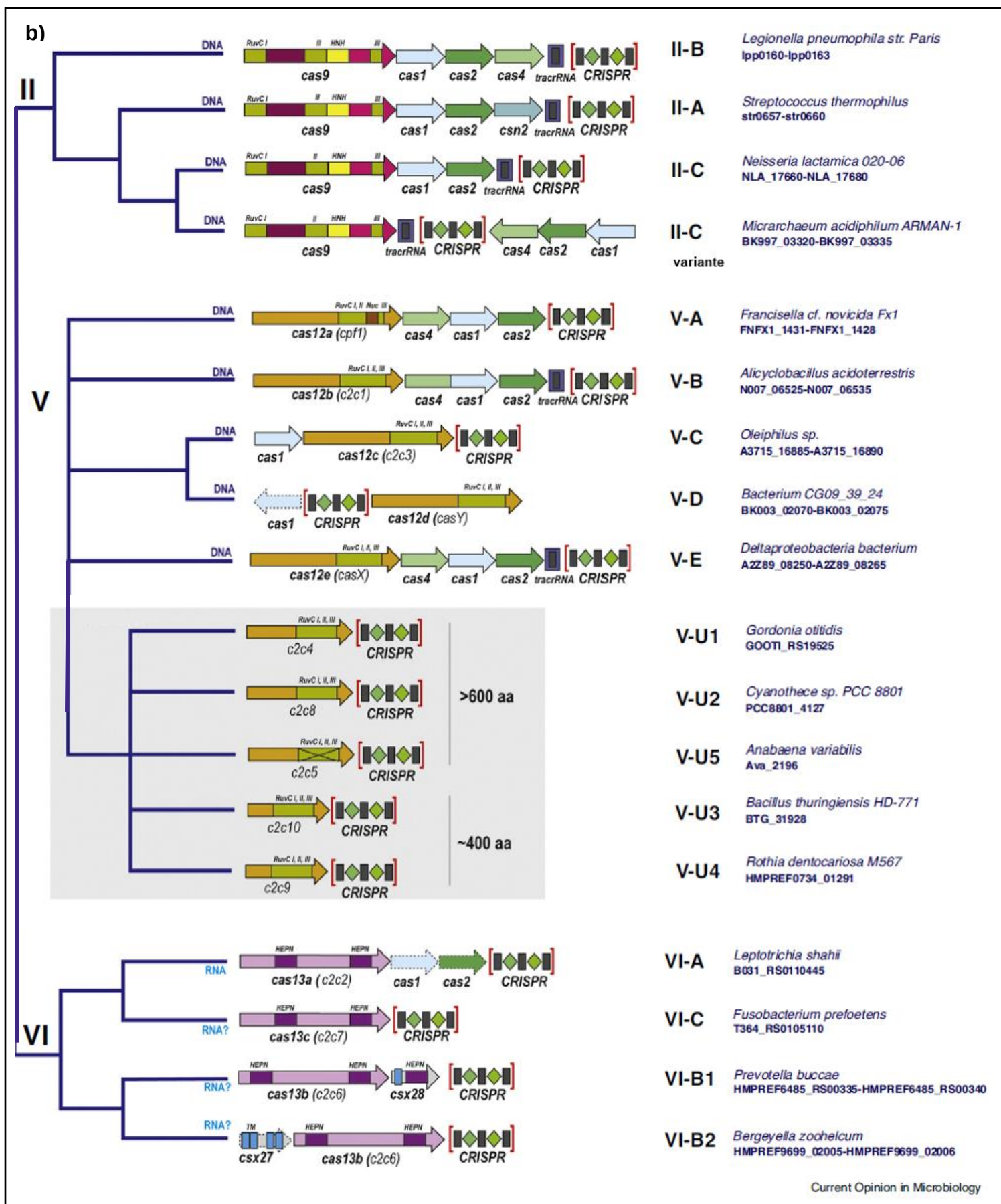


Figura 3 (Continuação).

O sistema Tipo I possui o gene de assinatura *cas3* (marcador para este Tipo), o qual codifica uma proteína com atividade de helicase, com capacidade de resolver DNA dupla fita ou complexos DNA-RNA. Frequentemente, o domínio helicase da Cas3 está fusionado com um domínio de endonuclease (Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015). Este Tipo compreende atualmente oito subtipos (I-A à I-F, existindo um subtipo I-F variante, e I-U) (Koonin; Makarova; Zhang, 2017). O crRNP efetor deste Tipo é composto por diversas proteínas Cas (Cas5, Cas6, Cas7 e Cas8), conhecido como *Cascade* (*CRISPR-associated complex of antiviral defence*) (Van der Oost et al., 2014). O sistema Tipo I é o mais difundido, constituindo 50% de todos os sistemas CRISPR/Cas presentes em bactérias e arqueas (Makarova et al., 2015; Briner; Barrangou, 2016). As proteínas Cas intrínsecas aos sistemas Tipo I-C, I-D, I-E e I-F, são tipicamente codificadas por um único *operon*, o qual compreende os genes *cas1*, *cas2* e *cas3*, assim como os genes para as subunidades do complexo *Cascade*. Nos tipos I-A e I-B os genes *cas* são agrupados em dois ou mais *operons* (Makarova et al., 2015). Os *operons cas* deste Tipo apresentam, em geral, ortólogos dos genes *cas3*, *cas5*, *cas7* e *cas8* (Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015).

O sistema CRISPR/Cas Tipo III utiliza complexos efetores semelhantes ao *Cascade* (Csm para III-A e Cmr para III-B) (Hille et al., 2018). O gene marcador deste Tipo é *cas10*, responsável por codificar uma proteína com domínio de reconhecimento de RNA, semelhante ao domínio observado em polimerases, a qual constitui a maior subunidade do crRNP neste Tipo (Makarova et al., 2015). Diante desta capacidade da Cas10, os sistemas do Tipo III são os únicos que podem reconhecer e clivar moléculas de DNA e RNA (Hille et al., 2018). Todos os subtipos do sistema Tipo III também possuem os genes para *cas5* e *cas7* (Koonin; Makarova; Zhang, 2017). A organização estrutural nos sistemas Tipo III é mais polimórfica que nos sistemas Tipo I, embora o número de subtipos seja inferior, apresentando duplicações e deleções de genes, inserções e fusões de domínios, e a presença de domínios adicionais, pouco caracterizados (Makarova et al., 2015).

O sistema Tipo IV, recém-classificado, é caracterizado pela presença da proteína Csf1 (proteína assinatura deste Tipo), Cas5 e uma única subunidade de Cas7 em seu complexo efetor. Neste Tipo, o *operon Cas* geralmente não está localizado próximo ao *locus* CRISPR, ou em muitos casos, é codificado em

genomas que não possuem um *locus* (Makarova et al., 2015). Sistemas Tipo IV também foram reportados em plasmídeos, como descrito anteriormente, em *Acidithiobacillus ferrooxidans* (organismo modelo para o sistema Tipo IV), na Cianobactéria *Synechocystis*, em *Streptomyces rochei*, e em *Lactococcus lactis* (Makarova et al., 2015). Este fato fornece mais um suporte à ocorrência de transferência horizontal de sistemas CRISPR/Cas (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Bondy-Denomy; Davidson, 2014). Hille et al. (2018) afirmam que os mecanismos efetores intrínsecos a este Tipo ainda precisam ser elucidados, contudo, a presença de ortólogos *cas5* e *cas7* sugere semelhanças aos demais Tipos da classe 1 (Hille et al., 2018).

O Tipo II é o mais simples, pois requer apenas uma proteína para seu funcionamento, a Cas9, sendo esta o marcador deste Tipo. Cas9 é uma proteína grande e bilobulada, com um lóbulo de reconhecimento (REC) e um lóbulo de atividade de nuclease (NUC), onde há dois domínios catalíticos (RuvC-like e HNH) (Makarova et al., 2011; Vieira et al., 2016). Esta proteína combina as funções do complexo efetor de crRNA com a clivagem do DNA alvo, contribuindo também para a adaptação (Makarova et al., 2015). Neste Tipo, a clivagem do pré-crRNA em vários crRNAs é realizada pela RNase III, uma proteína constitutiva da célula bacteriana (Makarova et al., 2011). O processamento do crRNA ocorre com o auxílio de uma classe de RNA conhecida como tracrRNA (transativador crRNA), o qual possui complementariedade de bases com a DR no pré-crRNA. O RNA fita dupla resultante (crRNA-tracrRNA) é clivado pela RNase III de maneira dependente da Cas9 (Van der Oost et al., 2014; Westra; Buckling; Fineran, 2014). Durante a interferência do Tipo II, Cas9 em complexo com tracrRNA e crRNA percorre o DNA alvo visando a identificação de PAM e, subsequente, complementaridade ao crRNA. O pareamento de bases com o crRNA desencadeia uma mudança de conformação na Cas9, de modo que, os sítios catalíticos de RuvC e HNH entram em contato com o DNA alvo, resultando na clivagem (Hille et al., 2018).

O sistema Tipo V foi observado em diversos genomas bacterianos e um genoma de arquea. O organismo modelo para este sistema foi uma cepa de *Francisella cf. novicida*. Este Tipo é caracterizado pelo gene *cas12* (anteriormente chamado *cpf1*), encontrado adjacente a um *locus* CRISPR e aos genes *cas1* e *cas2* (Makarova et al., 2015). O gene *cas12* codifica uma proteína grande que

contém um domínio *RuvC-like*, como a Cas9, mas não contém um domínio HNH. Cas12 possui uma alta similaridade com a proteína TnpB, da família de transposons IS605, sugerindo que ela foi recrutada de elementos transponíveis (Makarova et al., 2015; Hille et al., 2018). Diferentemente de Cas9, Cas12 não se associa a tracrRNA, e é responsável pelo processamento pré-crRNA, embora a natureza de sua atividade RNase não seja caracterizada (Shmakov et al., 2017). Além disso, vários sistemas provisoriamente anotados como Tipo V-U não possuem o módulo de adaptação Cas1-Cas2, mas codificam proteínas efetoras putativas contendo domínios *RuvC-like* e *zinc-fingers*, cujas possíveis funções reguladoras ou de defesa requerem investigação adicional (Shmakov et al., 2017).

O Tipo VI, também recém-identificado, é definido pela presença da proteína efetora Cas13, a qual possui dois domínios HEPN que, em distinção das demais proteínas efetoras da Classe 2, é capaz de clivar RNA fita simples (Shmakov et al., 2017; Hille et al., 2018). Mediante a ativação pelo reconhecimento do RNA fita simples alvo, Cas13 degrada não apenas este, mas também outros RNAs fita simples paralelos, similar às enzimas Csm6 e Csx1 em sistemas do Tipo III (Smargon et al., 2017; Hille et al., 2018). Esta atividade indiscriminada de RNase da Cas13, entretanto, conduz à restrição do crescimento bacteriano, implicando que o Tipo VI pode degradar os RNAs do hospedeiro para induzir morte ou dormência de células infectadas (Abudayyeh et al., 2016; East-Seletsky et al., 2016). Cas13, similar a Cas12, não requer tracrRNA. Neste Tipo, a maturação de crRNA não constitui um requisito absoluto para interferência (East-Seletsky et al., 2017). Após a ligação ao pré-crRNA, Cas13 sofre mudanças conformacionais que estabilizam o crRNA e facilitam a ligação ao alvo (Hille et al., 2018).

2.3 ACINETOBACTER BAUMANNII

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa, pertencente ao gênero *Acinetobacter*, caracterizada como um patógeno oportunista de grande importância nas infecções nosocomiais. Tem uma alta incidência entre indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles expostos à internação prolongada (superior a 90 dias) (Di Nocera et al., 2011). É frequentemente isolada em

pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), submetidos a procedimentos invasivos e terapêutica antimicrobiana de amplo espectro (Fournier; Richet, 2006; Howard et al., 2012). A capacidade de sobreviver em condições secas e a resistência a desinfetantes e agentes antimicrobianos contribuem para a seleção de *A. baumannii* no ambiente hospitalar (Lowe et al., 2018), resultando em altos índices de morbidade e mortalidade (Müller et al., 2017).

Acinetobacter baumannii apresenta-se como cocobacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, catalase-positivo, oxidase-negativo, imóvel, não-fermentador de glicose e não-fastidioso, com crescimento representativo em Ágar Sangue, formando colônias branco-acinzentadas, e no Ágar MacConkey, com colônias levemente rosadas normalmente cremosas, podendo ter um aspecto mucoide (Howard et al., 2012).

Como outros membros do mesmo gênero, *A. baumannii* possui elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente em diferentes ambientes, pois utiliza uma ampla variedade de substratos como fonte de carbono, sendo capaz de sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies inanimadas. Na área hospitalar, cepas têm sido isoladas de diversos objetos, como, por exemplo, leitos, bancadas e superfícies de cateteres, além de ser encontrada em fontes úmidas, tais como válvulas e circuitos de ventiladores mecânicos (Di Nocera et al., 2011; Müller et al., 2017). Esta espécie tem como alvo específico tecidos úmidos, como membranas mucosas ou áreas da pele que estão expostas, seja por acidente ou lesão. Também é relacionada a infecções potencialmente fatais, incluindo pneumonia relacionada à ventilação mecânica, sepse, meningite, endocardite, osteomielite, infecções do trato urinário e distúrbios da pele e dos tecidos moles (Howard et al., 2012; Ghaith et al., 2017).

De acordo com Cisneros e Rodríguez-Baño (2002), *A. baumannii* desenvolve resistência antimicrobiana de forma extremamente rápida, sendo capaz de regular positivamente os mecanismos inatos de resistência e incorporar MGEs (Cisneros; Rodríguez-Baño, 2002; Howard et al., 2012). Entre os mecanismos de resistência a antimicrobianos conhecidos em tal espécie, destacam-se: a produção de β -lactamases de amplo espectro, especialmente β -lactamases de classe D de Ambler e, em menor medida, β -lactamases de classe B (metalo- β -lactamases – MBLs); atuação de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e quinolonas; alterações nas porinas da membrana externa

(diminuindo a permeabilidade da membrana externa); ativação de sistemas de efluxo; produção de biofilme (limitando o contato da célula bacteriana com as drogas antimicrobianas e com a defesa imune do hospedeiro); e alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBP) (Howard et al., 2012; Ghaith et al., 2017).

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. são as bactérias mais frequentemente reportadas como portadoras de resistência contra múltiplas drogas antimicrobianas (Kwiatek et al., 2017). Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma lista de patógenos com prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos ou estratégias de defesa. Na categoria “crítica” estão patógenos comuns em hospitais e no tratamento de pacientes que fazem uso de respiração artificial e cateteres intravenosos, sendo eles *A. baumannii*, bactérias da família Enterobacteriaceae, e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas resistentes a antimicrobianos carbapenêmicos (Who, 2017).

2.3.1 *Acinetobacter baumannii* e o Sistema CRISPR/Cas

O sistema CRISPR/Cas pode ser verificado em cerca de 48% de todos os genomas de patógenos bacterianos, sendo o sistema do Tipo I o mais encontrado, seguido por sistemas do Tipo II e do Tipo III (Hatoum-Aslan; Marraffini, 2014; Briner; Barrangou, 2016; Maikova et al., 2018). É reportado entre patógenos multirresistentes, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (Luz et al., 2019), *Staphylococcus aureus* (Marraffini; Sontheimer, 2008) e *Klebsiella pneumoniae* (Ostria-Hernández et al., 2015). Em *Acinetobacter baumannii* dois subtipos de sistemas CRISPR/Cas foram encontrados (Di Nocera et al., 2011; Hauck et al., 2012). Contudo, ainda são poucos os estudos voltados a este tema nesta espécie.

Geralmente, o Tipo de sistema CRISPR/Cas identificado em *A. baumannii* é o sistema CRISPR/Cas subtipo I-F, sendo relatados os subtipos I-Fa e I-Fb (Di Nocera et al., 2011; Hauck et al., 2012; Touchon et al., 2014). Di Nocera et al. (2011), verificaram nas cepas 4190, AB0057 e AYE a presença destes subtipos de sistema CRISPR/Cas, codificado em ilhas genômicas (Di Nocera et al., 2011).

Touchon e colaboradores (2014), afirmam que a presença de sistemas CRISPR/Cas entre cepas de *A. baumannii* é bastante dinâmica, sendo verificada em determinadas linhagens (Touchon et al., 2014). No entanto, considerando que esta espécie é extremamente diversificada em termos de repertórios gênicos, possuindo elevada plasticidade genômica, trabalhos adicionais são necessários para entender a contribuição de sistemas CRISPR/Cas no genoma de tal espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GENOMAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

O estudo incluiu 47 genomas de isolados clínicos de *A. baumannii*, previamente sequenciados e anotados (artigo em correção pelos autores). Os isolados foram oriundos de diversas fontes de infecção (líquor, secreção traqueal, sangue, cateter, swab retal, osso, líquido cavitário, partes moles), coletados entre 2010 e 2014 de pacientes hospitalizados de diferentes setores (UTI, ambulatório, apartamento) de cinco hospitais da cidade do Recife.

A cepa *Acinetobacter baumannii* AYE (número de acesso do GenBank: GCA_000069245.1) foi utilizada como referência para análise dos *loci* CRISPR e genes *cas*, considerada cepa modelo em estudos envolvendo o sistema CRISPR/Cas nesta espécie (Karah et al., 2015).

3.2 ANÁLISE *IN SILICO* DO SISTEMA CRISPR/CAS

A análise da frequência, organização estrutural, composição gênica, número e tamanho do sistema CRISPR/Cas, bem como, a caracterização dos espaçadores, foi realizada com o uso de ferramentas computacionais.

As sequências dos genes *cas* foram confirmadas através do BLASTp contra sequências depositadas no GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e do Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>). O tipo de sistema CRISPR/Cas foi estabelecido a partir da organização dos genes *cas*, segundo a classificação atual de Koonin e colaboradores (2017).

O CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/>) foi utilizado para identificação dos *loci* CRISPRs, os quais foram confirmados mediante a ferramenta do CRISPRone (<http://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone>). A definição de Repetições Degeneradas (DG) foi realizada manualmente, por análise comparativa entre as Repetições Diretas (DR) do *locus*, visto que as ferramentas de bioinformática não permitiam sua identificação.

As sequências espaçadoras encontradas foram numeradas de acordo com o conteúdo de pares de bases, cuja organização foi realizada no Microsoft Office – Excel – segundo ordem alfabética. Sequências com diferenças de até 4 pb foram consideradas o mesmo espaçador, enquanto que, diferenças de 4 a 7 pb caracterizavam espaçadores variantes (Karah et al., 2015). A ordem dos espaçadores no *locus* foi determinada a partir da DG (repetição degenerada); deste modo, o primeiro espaçador do *locus* consistia na primeira sequência adjacente à DG. Todas as sequências espaçadoras foram comparadas com o banco de dados CRISPRdb, usando a ferramenta BLAST CRISPRdb (disponível em <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>), e BLASTn do NCBI, para determinar se eles já existem no banco de dados específico de sequências CRISPR ou se já foram descritas no NCBI como região CRISPR. A busca das possíveis origens destas sequências espaçadoras foi realizada utilizando as ferramentas CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html), e BLASTn contra genomas microbianos no GenBank (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequências retornadas na busca BLASTn descritas como qualquer proteína (hipotética ou não), foram verificadas no Uniprot, uma vez que é um banco de dados de proteínas curadas (disponível em <http://www.uniprot.org/blast/>).

A determinação da sequência líder foi realizada manualmente, através da comparação dos *loci* CRISPR confirmados entre os isolados estudados, com a cepa de referência *A. baumannii* AYE (número de acesso do GenBank: GCA_000069245.1), visto que ainda não existe uma ferramenta que realize sua anotação automaticamente.

3.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A técnica do MLST *in silico* dos genomas de *A. baumannii* foi realizada anteriormente (Artigo em correção pelos autores), utilizando a ferramenta SRST2 (Inouye et al., 2014). A sequência de alelo e as definições de perfil MLST foram atribuídas usando a sequência e os perfis disponíveis na PubMLST (http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef

) para o esquema de Pasteur e Oxford. Diante do perfil de MLST foi determinado o complexo clonal (CC).

A tipagem baseada no *locus* CRISPR foi realizada a partir da análise da matriz de espaçadores. A representação visual das matrizes de espaçadores foi aplicada como descrito anteriormente (Andersen et al., 2016), cujos primeiros espaçadores dispostos na matriz corresponderam aos espaçadores ancestrais. A comparação de matrizes conservadas, alinhadas a partir de espaçadores ancestrais comuns, permitiu a determinação dos genótipos CRISPR (Tomida et al., 2017).

Os resultados da tipagem molecular mediante as técnicas do MLST e CRISPR foram comparados com as informações epidemiológicas dos isolados (ano de isolamento, hospital, setor e fonte de coleta), a fim de compreender o perfil de disseminação dos isolados de *A. baumannii* nos hospitais públicos da cidade do Recife.

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO *LOCUS* CRISPR E GENES *CAS* NOS GENOMAS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Com base na análise genômica dos isolados, verificou-se que, dentre os 47 genomas investigados, apenas 14 (Acb1, Acb4, Acb5, Acb8, Acb21, Acb24, Acb29, Acb33, Acb35, Acb36, Acb38, Acb41, Acb44 e Acb47), correspondendo a 30% dos isolados investigados, possuíam o sistema CRISPR/Cas em seu genoma, com o *locus* CRISPR associado aos genes *cas*. Todos estes isolados apresentaram *loci* CRISPR bem estruturados e foi possível distinguir todos os componentes que compõe o *locus* CRISPR, assim como o conjunto de genes *cas* adjacentes. Foi verificado um único sistema no genoma dos isolados positivos que apresentaram tamanho, número de DRs e espaçadores distintos.

Em relação aos genes *cas*, foi observado que todos os isolados apresentaram o mesmo conteúdo gênico associado ao *locus* CRISPR. A presença dos genes *cas3*, *cas6f*, *csy1*, *csy2* e *csy3* permitiu a classificação do respectivo sistema CRISPR/Cas como Tipo I, subtipo I-F.

As sequências nucleotídicas de cada gene *cas* foram similares na maioria dos isolados, sendo também análogas às sequências dos respectivos genes *cas* da cepa de referência *A. baumannii* AYE, observando-se, contudo, algumas mutações pontuais. As sequências correspondentes aos genes *csy1*, *csy2* e *csy3*, foram idênticas entre os isolados e a cepa de referência, exceto nos isolados Acb33 e Acb36, nos quais foi verificada uma sequência distinta para o gene *csy3*. O isolado Acb41 diferiu dos demais isolados quanto à sequência do gene *cas1*.

4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DO *LOCUS* CRISPR

Após a identificação dos *loci* CRISPR através do CRISPRFinder e CRISPRone, foi realizada a montagem destes, sendo possível identificar as repetições diretas (DR), espaçadores e repetições degeneradas (DG) (Figura 4).

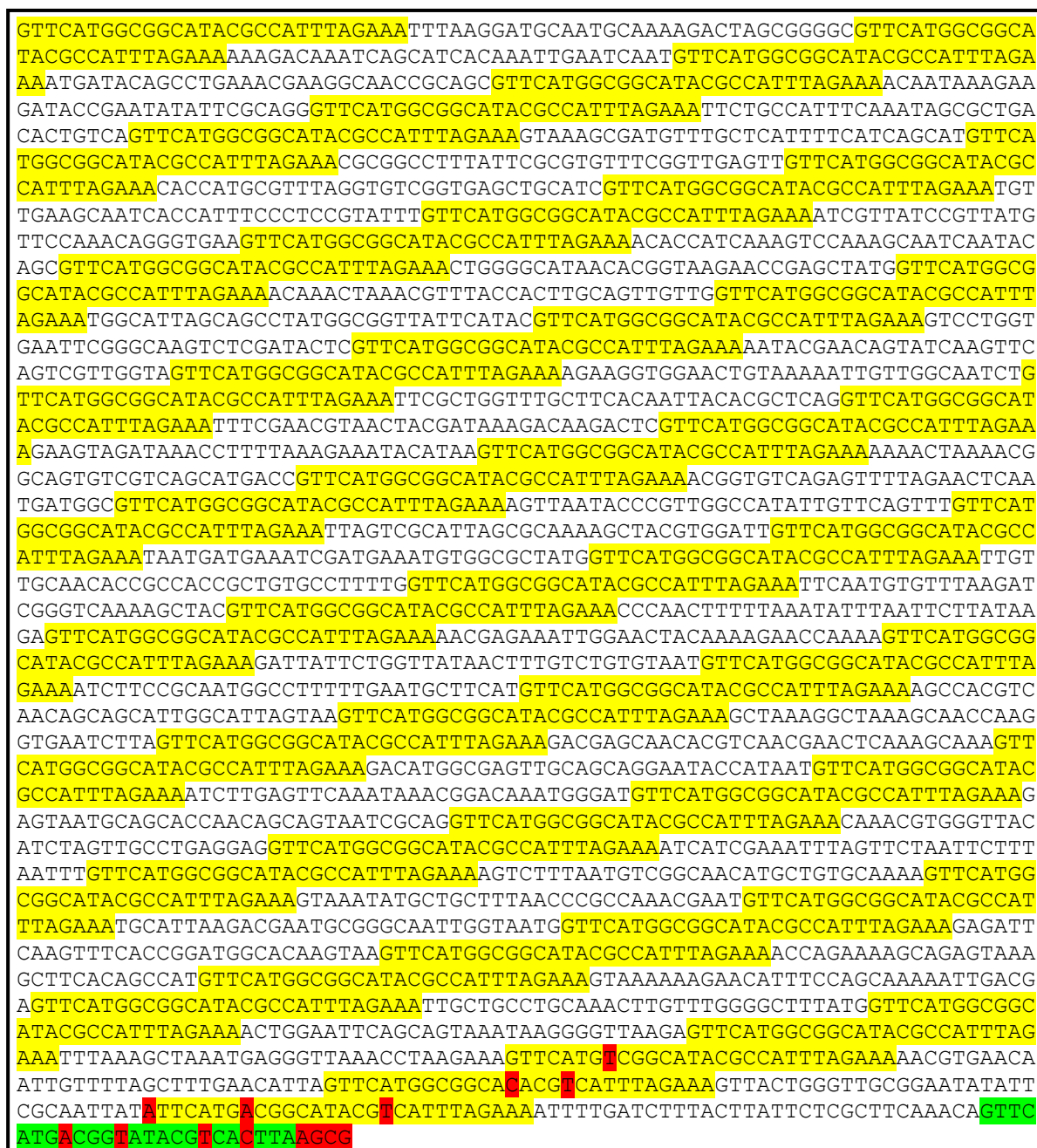


Figura 4. Montagem esquemática do *locus* CRISPR no isolado Acb1: DRs estão destacadas em amarelo; espaçadores em branco; DG em verde; mutações em vermelho.

Os *loci* identificados apresentaram tamanhos distintos que variaram entre 1.889 e 6.512 pb (Quadro 1). Em alguns isolados foram notados *loci* com tamanhos equivalentes, os quais possuem o mesmo número de DRs e espaçadores (Quadro 1).

Isolados	Tamanho do <i>locus</i> CRISPR (pb)	Número de Repetições Diretas (DR)	Número de Espaçadores
Acb1	3.089 pb	52	51
Acb4	4.953 pb	83	82
Acb5	6.512 pb	109	108
Acb8	3.090 pb	52	51
Acb21	3.089 pb	52	51
Acb24	3.089 pb	52	51
Acb29	6.512 pb	109	108
Acb33	3.089 pb	52	51
Acb35	3.209 pb	54	53
Acb36	3.089 pb	52	51
Acb38	3.089 pb	52	51
Acb41	1.889 pb	50	49
Acb44	4.651 pb	78	77
Acb47	4.651 pb	78	77

Quadro 1. Caracterização estrutural do *locus* CRISPR de isolados de *Acinetobacter baumannii*. pb = pares de bases.

Os *loci* CRISPRs investigados apresentaram um padrão similar entre os isolados, verificando-se a conservação de determinados componentes, tais como DR e DG, as quais apresentaram tamanhos e sequências análogas (Quadro 2).

Componente do <i>locus</i> CRISPR	Sequência	Tamanho (pb)
DR (Repetição Direta)	5' GTTCATGGCGGCATACGCCATTTAGAAA 3'	28 pb
DG (Repetição Degenerada)	5' GTTCATGACGGTATACGTCACTTAAGCG 3'	28 pb

Quadro 2. Componentes do *locus* CRISPR conservados entre os genomas de isolados de *Acinetobacter baumannii* em estudo.

Verificou-se em todos os *loci*, repetições diretas de 28 pb, com mesma sequência de nucleotídeos, exceto no isolado Acb8, para ambas características, sendo observado 29 pb na segunda DR (possui uma adenina adicional), e a substituição de uma adenina por timina na quinta posição (5'-3') na última DR do *locus* (Quadro 3). As três primeiras DRs (adjacentes à DG) apresentaram mutações pontuais idênticas em todos os *loci* (Quadro 3). As repetições diretas notadas apresentaram sequências idênticas às DRs de quatro isolados depositados no banco do CRISPRFinder (*Acinetobacter baumannii* AYE, *Acinetobacter baumannii* AB307_0294, *Acinetobacter baumannii* GCF_000963815, *Acinetobacter baumannii* GCF_001399655).

Isolado	Sequência da DR	Posição da DR no <i>locus</i>
Acb8	5' A GTTCATGGCGGCAC C ACG T CATTTAGAAA 3'	Segunda (29pb)
Acb8	5' GTTC T TGGCGGCATACGCCATT T AGAAA 3'	Última
Todos (+)	5' A TTTCATGA C GGCATA C CG T CATTTAGAAA 3'	Primeira
Todos (+), salvo Acb8	5' GTTCATGGCGGCAC C ACG T CATTTAGAAA 3'	Segunda
Todos (+)	5' GTTCATG T CGGCATACGCCATT T AGAAA 3'	Terceira

Quadro 3. Repetições diretas com mutações. DR = Repetição Direta. (+) = Positivo para CRISPR.

Na cepa de referência *Acinetobacter baumannii* AYE são observadas quatro DRs, próximas à repetição degenerada, com mutações pontuais, sendo estas, porém, distintas das verificadas neste estudo. Além disso, observou-se que a sequência nucleotídica da DG notada nestes *loci* não apresentou similaridade com a sequência correspondente na cepa de referência.

A montagem esquemática dos *loci* CRISPR também possibilitou a identificação da possível sequência líder (Quadro 4), compreendendo 147 pb. A confirmação desta sequência foi obtida com a investigação do genoma da cepa de referência (AYE), observando-se homologia entre ambas.

Sequência Líder	(%) Conteúdo AT
5'GTCCCAGAGTTTGGACCCAATATTTTTCTATTCTTTAACAGCTCAATAAAAT CAATA AGTTACAATAGGTCTTTTTTTGATTGGGTAAAATGCCAAAATCCATGA TAAACACT TGTTGTAACCTTATATTTTTACTATAATTTTATA3'	74,15%

Quadro 4. Sequência líder dos *loci* CRISPR e porcentagem do conteúdo AT. AT = Adenina e Timina

Neste estudo foram identificadas 152 sequências distintas de espaçadores, os quais compreendiam 32 a 34 pb. Duas delas foram denominadas como variantes. O espaçador s92 apresentou duas sequências bastante similares a ele, diferindo em algumas bases, sendo então nomeadas de s92v e s92vv. Com base na pesquisa destes espaçadores pela ferramenta BLAST CRISPRdb foi possível determinar quais espaçadores eram análogos as sequências espaçadoras já depositadas no banco do CRISPRdb e quais representavam espaçadores novos. Como resultado, verificou-se que os espaçadores s6, s33, s59, s61, s65, s78, s81, s92, s96 e s143 correspondiam a sequências espaçadoras encontradas nos isolados *Acinetobacter baumannii* GCF_001457535 e *Acinetobacter baumannii* GCF_001517645, já depositadas no banco.

A análise do conteúdo do espaçador de cada *locus* CRISPR identificado, revelou uma ampla distribuição dos espaçadores entre os *loci* CRISPR dos genomas investigados. Deste modo, foram verificadas diferenças entre os isolados com base no conteúdo dos espaçadores (Figura 5).



Figura 5. Esquema representativo dos espaçadores em cada isolado de *Acinetobacter baumannii* CRISPR/Cas subtipo I-F. AUS = ausente.

Espaçadores descritos como ausentes foram perdidos devido a erros durante o sequenciamento e montagem dos genomas. O espaçador s22 no isolado Acb41 difere dos espaçadores equivalentes nos isolados Acb5 e Acb29 devido à troca de uma adenina por guanina. Espaçadores em comum foram observados na maioria dos isolados (Figura 5). Além disso, verificou-se que determinados isolados apresentaram o mesmo conteúdo de espaçadores. Os isolados Acb5 e Acb29; Acb44 e Acb47; Acb1, Acb8, Acb21, Acb24, Acb33, Acb36 e Acb38. O isolado Acb35 distinguiu-se por exibir, além dos espaçadores compartilhados entre estes últimos isolados, dois espaçadores diferentes, s72 e s114. Já o isolado Acb41, destacou-se por apresentar um conteúdo de espaçador discrepante aos notados nos demais isolados.

Com relação à ordem de incorporação dos espaçadores no *locus* CRISPR, todos os *loci* dos 14 isolados CRISPR positivo, apresentaram os quatro primeiros espaçadores idênticos (Figura 6). A partir destes, observou-se conjuntos de espaçadores organizados diferentemente entre os *loci*. Assim como, cinco padrões de similaridade (P) na distribuição da ordem dos espaçadores entre os isolados: Acb1, Acb8, Acb21, Acb24, Acb33, Acb35, Acb36 e Acb38 (P1); Acb5 e Acb29 (P2); Acb44 e Acb47 (P4). O isolado Acb4 apresentou uma distribuição de espaçadores semelhante ao dos isolados Acb44 e Acb47, contudo, observou-se a incorporação de alguns espaçadores verificados nos isolados Acb5 e Acb29 em uma ordem distinta, configurando um perfil distinto (P3) (Figura 6). Interessantemente, o *locus* do isolado Acb41 apresentou uma organização de espaçadores singular, salvo os quatro primeiros espaçadores alocados na mesma ordem em todos os *loci*, caracterizando outro perfil de distribuição dos espaçadores (P5) (Figura 6). Esta é mais uma característica diferente observada no isolado acb41, o qual é o único isolado com a sequência do gene *cas1* distinta.

		CRISPR - Espaçadores																									
Perfil	Isolado		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
P1	Acb_1	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_21	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_24	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_33	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_38	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_36	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	AUSENTEAUSENTE		s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_8	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
	Acb_35	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47	s84	s5	s68	s133
P2	Acb_5	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s22	s27	s91	s65	s124	s33	s61	s139	s110	s85	s117	s1
	Acb_29	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s29	s42	s22	s27	s91	s65	s124	s33	s61	s139	s110	s85	s117	s1
P3	Acb_4	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s117	s1	s30	s71	s66	s116	s75	s119	s80	s137	s129	s53	s44	s108
P4	Acb_44	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s117	s1	s30	s71	s66	s116	s75	s119	s80	s137	s129	s53	s44	s108
	Acb_47	DG	s59	s96	s6	s143	s20	s138	s92	s16	s81	s118	s94	s117	s1	s30	s71	s66	s116	s75	s119	s80	s137	s129	s53	s44	s108
P5	Acb_41	DG	s59	s96	s6	s143	s92vv	s81	s22	s35	s134	s78	s75	s9	s119	s80	s97	s137	s112	s107	s109	s67	s130	s37	s105	s132	s147
			26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Acb_1			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_21			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_24			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_33			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_38			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_36			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_8			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_35			s141	s99	s131	s32	s18	s2	s74	s146	s135	s21	s8	s95	s120	s12	s73	s14	s45	s125	s62	s69	s93	s136	s13	s49	s3
Acb_5			s30	s71	s66	s116	s75	s119	s80	s137	s129	s53	s44	s108	s113	s36	s140	s57	s50	s38	s101	s122	s149	s92v	s115	s56	s51
Acb_29			s30	s71	s66	s116	s75	s119	s80	s137	s129	s53	s44	s108	s113	s36	s140	s57	s50	s38	s101	s122	s149	s92v	s115	s56	s51
Acb_4			s113	s36	s140	s57	s50	s38	s101	s122	s149	s92v	s115	s56	s51	s55	s142	s76	s86	s87	s150	s39	s26	s98	s60	s82	s48
Acb_44			s113	s36	s50	s38	s101	s122	s149	s51	s55	s142	s76	s86	s87	s150	s39	s26	s98	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47
Acb_47			s113	s36	s50	s38	s101	s122	s149	s51	s55	s142	s76	s86	s87	s150	s39	s26	s98	s60	s82	s48	s77	s79	s90	s25	s47
Acb_41			s106	s4	s43	s127	s104	s102	s24	s128	s52	s70	s31	s100	s23	s148	s54	s40	s88	s34	s41	s10	s7	s83	s28	s17	

Figura 6. Disposição representativa dos 50 espaçadores iniciais no locus CRISPR dos isolados de *Acinetobacter baumannii*. P = padrão de espaçadores. DG = repetição degenerada.

4.3 ANÁLISE DA ORIGEM DOS ESPAÇADORES

Os espaçadores identificados foram submetidos à pesquisa através de alinhamento local no CRISPRTarget, BLASTn e Uniprot, a fim de estabelecer a origem destas sequências. Com base nestas análises, verificou-se que 150 das 152 sequências espaçadoras (englobando as variantes) apresentaram homologias a sequências nucleotídicas depositadas nos respectivos bancos de dados.

Dentre os espaçadores com possíveis origens identificadas, 60 foram análogos a sequências de elementos genéticos móveis (Quadro 5).

Espaçador	Sequência de Nucleotídeos	Origem identificada
s2	AAAACATAAACGGCAGTGTCTGTCAGCATGACC	Proteína da cauda do fago
s3	AAAGACAAATCAGCATCACAAATTGAATCAAT	Plasmídeo pNDM-0285 de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa ABNIH28
s5	AACGAGAAATTGGAACACAAAAGAACCAAAA	Proteína da cauda do fago
s7	AACGTTTCCGCAAATCTGCGAAATACTCGTTG	Proteína da cauda do fago
s8	AATACGAACAGTATCAAGTTCAGTCGTTGGTA	Proteína da cauda do fago
s12	ACAAACTAAACGTTTACCACTTGCAGTTGTTG	Proteína de revestimento do bacteriófago
s15	ACATGATATGAAGCGAAAGCCATATCAGTGTT	Proteína da cauda do fago
s17	ACCGTTTGCTCTTCCAGCAAAAATAGGATCCG	Proteína da cauda do fago
s18	ACGGTGTCTAGAGTTTTAGAACTCAATGATGGC	Proteína FI da bainha da cauda do fago
s21	AGAAGGTGGAACGTGTAATAATTGTTGGCAATCT	Proteína da cauda do fago
s25	AGCCACGTCAACAGCAGCATTGGCATTAGTAA	Proteína da cauda do fago
s27	AGTAGTTGCACCAGACTCCGCACAATCTAAAA	Proteína da cauda do fago
s28	AGTCGGCACAGGTAGCAGTTGAGCAGTCATCG	Proteína da cauda do fago
s35	ATAAAGCGCACAAACCCATTGATTTGTATTTTT	Proteína da cauda do fago
s37	ATACACATGTTTTTCTAATAAGAATAAGACAA	Proteína da cauda do fago

s40	ATATGGTGGTTGTTATAAACCGCCTAATGATA	Proteína da cauda do fago
s42	ATCATCGAAATTTAGTTCTAATTCTTTAATTT	Proteína da cauda do fago
s44	ATCCTGTCTCTTGGTCAATCTTGGCACGTAGG	Proteína da cauda do fago
s46	ATCTTATCGCTAATTTTCTTGGCTAATGCATC	Proteína relacionada a fago
s47	ATCTTCCGCAATGGCCTTTTTGAATGCTTCAT	Proteína da cauda do fago
s48	ATCTTGAGTTCAAATAAACGGACAAATGGGAT	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s53	ATTACCGACTGATTGTTGAGTGGCAATGTTAA	Proteína da cauda do fago
s58	ATTTGGACGGCTTGAACCAATCCAACAAGAAC	Proteína da cauda do fago
s60	CAAACGTGGGTTACATCTAGTTGCCTGAGGAG	Plasmídeo pmZS de <i>Acinetobacter lwoffii</i> cepa ZS207
s61	CAATGGATTTAAAGATTCAACCGCTTGGGAG	Proteína integrasse
s62	CACCATGCGTTTAGGTGTCGGTGAGCTGCATC	Proteína relacionada a fago
s63	CAGCAAATGGGCGGTGTAATTGCTGATGGAGC	Proteína da cauda do fago
s64	CAGCCAAAAAAGACTGGGAAAAAGGGATTGAT	Proteína relacionada a fago
s67	CCAGACTTGATTTTTATCACCATTGAAGAGTT	Proteína integrasse
s69	CGCGGCCTTTATTGCGTGTTTCGGTTGAGTT	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s71	CGTCAAAACAATCAAAAAAGCAATGAGTACAA	Plasmídeo pEMTOL01 de <i>Emticicia oligotrophica</i> cepa DSM 17448
s72	CTGAATTTTCTAAATCTAGTTGTGATCCGAAA	Plasmídeo pPLP-1 de <i>Lactobacillus plantarum</i> cepa LPL-1

s74	GAAGTAGATAAACCTTTTAAAGAAATACATAA	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s75	GAATTGCACTTGCTAAGCCAATAATGCCAACT	Proteína relacionada a fago
s77	GACATGGCGAGTTGCAGCAGGAATACCATAAT	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s79	GACGAGCAACACGTCAACGAACTCAAAGCAAA	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s81	GAGATTCAAGTTTCACCGGATGGCACAAGTAA	Proteína da cauda do fago
s82	GAGTAATGCAGCACCAACAGCAGTAATCGCAG	Proteína da cauda do fago
s85	GCAAGTGTCACCTTTAAGTGACGGAAGAAAT	Proteína da cauda do fago
s95	GTCCTGGTGAATTGCGGCAAGTCTCGATACTC	Proteína da morfogênese do virion do fago
s97	TAAAATCACATCAGGGAAGTGAAGGCGAGCTA	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s107	TCAAAACGTATGGGTTATTGATGCTCAAGATT	Proteína da cauda do fago
s109	TCAGGTAATAAAAAACCGCCGAAGGCGGTAT	Proteína da cauda do bacteriófago lambda I
s111	TCGCAGCTTCAAGCACACCTTCTTGATGAGCA	Proteína relacionada a fago
s117	TGCATCGAAGTCATAGAACGCTTTGAGTTTCCA	Proteína relacionada a fago
s118	TGCATTAAGACGAATGCGGGCAATTGGTAATG	Proteína relacionada a fago
s123	TGTGACTGTGGAGAGTTACCACCGCTAAATTC	Proteína relacionada a fago
s126	TGTTGTGGATCGCAATGGCAATCAACTCATGT	Proteína relacionada a fago
s129	TTACACATGAAGTCAGCAAATGCCACCATGTT	Plasmídeo tig00000793 de <i>Escherichia coli</i> cepa AR_0128

s131	TTAGTCGCATTAGCGCAAAAGCTACGTGGATT	Proteína da cauda do fago
s132	TTATAGATGGCTTTAACTGACTCCCAGCCCAT	Proteína de replicação de fago CRI
s133	TTCAATGTGTTTAAGATCGGGTCAAAAGCTAC	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s134	TTCCTCAACTGACATTTCCAAATAGTAGAGGC	Proteína da cauda do fago
s135	TTGCTGGTTTGCTTACAATTACACGCTCAG	Proteína da cauda do fago
s136	TTCTGCCATTTCAAATAGCGCTGACACTGTCA	Proteína da cauda do fago
s139	TTGGTTGTTTAGTAAGTTCAAAGCCCGTTGTA	Proteína da cauda do fago
s140	TTGTAACAACTTTAATGGAGAAGCCTTAATCT	Proteína de replicação de fago/plasmídeo
s145	TTTAAGGATGCAATGCAAAAGACTAGCGGGGC	Plasmídeo pNDM-9c17 de <i>Acinetobacter sp.</i> ACNIH1
s147	TTTGCCGATGCGTGCAAACATTTGCTCCGCTTC	Proteína do capsídeo do fago
s148	TTTGCGCTCTTGCGGTTATTATCAAAGACCTC	Proteína da cauda do fago

Quadro 5. Sequência e origem dos espaçadores identificados análogos a sequências de elementos genéticos móveis.

A partir destes dados, foi verificado que a maior parte das sequências espaçadoras oriundas de MGEs corresponderam a proteínas da cauda de fagos. Outras foram análogas a sequências de proteínas de replicação de fagos, plasmídeos (s48, s69, s74, s77, s132, s133, s140) e integrase (s61 e s67). Além disso, os espaçadores s3, s60, 71, s72, s129 e s145 apresentaram sequências intrínsecas a plasmídeos distintos: plasmídeo pNDM-0285, plasmídeo pmZS, pEMTOL01, pPLP-1, plasmídeo tig00000793 e plasmídeo pNDM-9c17, oriundos de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Emticicia oligotrophica*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter* sp., respectivamente.

As demais sequências espaçadoras com homologias identificadas corresponderam a sequências genômicas de *A. baumannii*, proteínas não caracterizadas e regiões cromossômicas de outros organismos, como, *Vibrio alginolyticus* (s2), *Escherichia coli* (s3), *Serratia symbiotica* (s5), *Desulfobacula toluolica* (s11), *Edwardsiella tarda* (s12), *Bacillus subtilis* (s13, s125), *Klebsiella pneumoniae* (s34), *Bacillus cereus* (s116), *Enterococcus faecium* (s72), entre outros.

Todas as sequências espaçadoras encontradas nos *loci* foram submetidas à busca no NCBI e CRISPRdb a fim de determinar quais espaçadores já foram descritos e quais consistiam em espaçadores novos. Esta análise revelou 89 espaçadores novos (Anexo 1), ainda não caracterizados em tais bancos, perfazendo um total de 59%.

Destes espaçadores caracterizados como novos, 30 corresponderam a sequências oriundas de fagos e plasmídeos.

4.4 TIPAGEM MOLECULAR PELO MLST E CRISPR

O resultado da análise de perfil MLST do genoma dos 47 isolados de *A. baumannii* identificou sete diferentes “sequence type” (STs); ST1, ST15, ST25, ST79, ST113, ST881 e ST882 (Figura 7).

ST	Isolados													
ST1	Acb9	Acb13	Acb16	Acb19	Acb45									
ST15	Acb3	Acb7	Acb10	Acb12	Acb14	Acb25	Acb34	Acb37	Acb43	Acb46				
ST25	Acb41													
ST79	Acb2	Acb6	Acb15	Acb17	Acb18	Acb20	Acb22	Acb23	Acb26	Acb28	Acb30	Acb31	Acb32	Acb39
ST113	Acb1	Acb4	Acb5	Acb8	Acb21	Acb24	Acb29	Acb33	Acb35	Acb36	Acb38	Acb44	Acb47	
ST881	Acb40	Acb42												
ST882	Acb11													

Figura 7. Sequence Types (STs) identificados entre os isolados de *Acinetobacter baumannii*. Isolados destacados em vermelho são positivos para o sistema CRISPR/Cas.

O *locus* CRISPR foi encontrado apenas no genoma dos isolados que pertencem ao ST113 e ST25. O ST113 compreendeu a maioria dos isolados positivos para o sistema CRISPR/Cas. Apenas o isolado Acb41, o qual se distingue por apresentar um perfil de espaçadores (P5) e sequência do gene *cas1* distintos, pertence ao ST25.

Todos os isolados positivos para o sistema CRISPR/Cas subtipo I-F pertencem ao complexo clonal CC25.

A tipagem molecular baseada no *locus* CRISPR, realizada a partir da análise dos perfis de espaçadores, permitiu agrupar os 14 isolados positivos para o sistema em cinco genótipos CRISPR diferentes (G1-G5) (Figura 8). Vale destacar que, a determinação de cada genótipo compreendeu todos os espaçadores presentes nos *loci* CRISPR. A Figura 8 representa apenas os 50 espaçadores iniciais do *locus* em cada isolado.

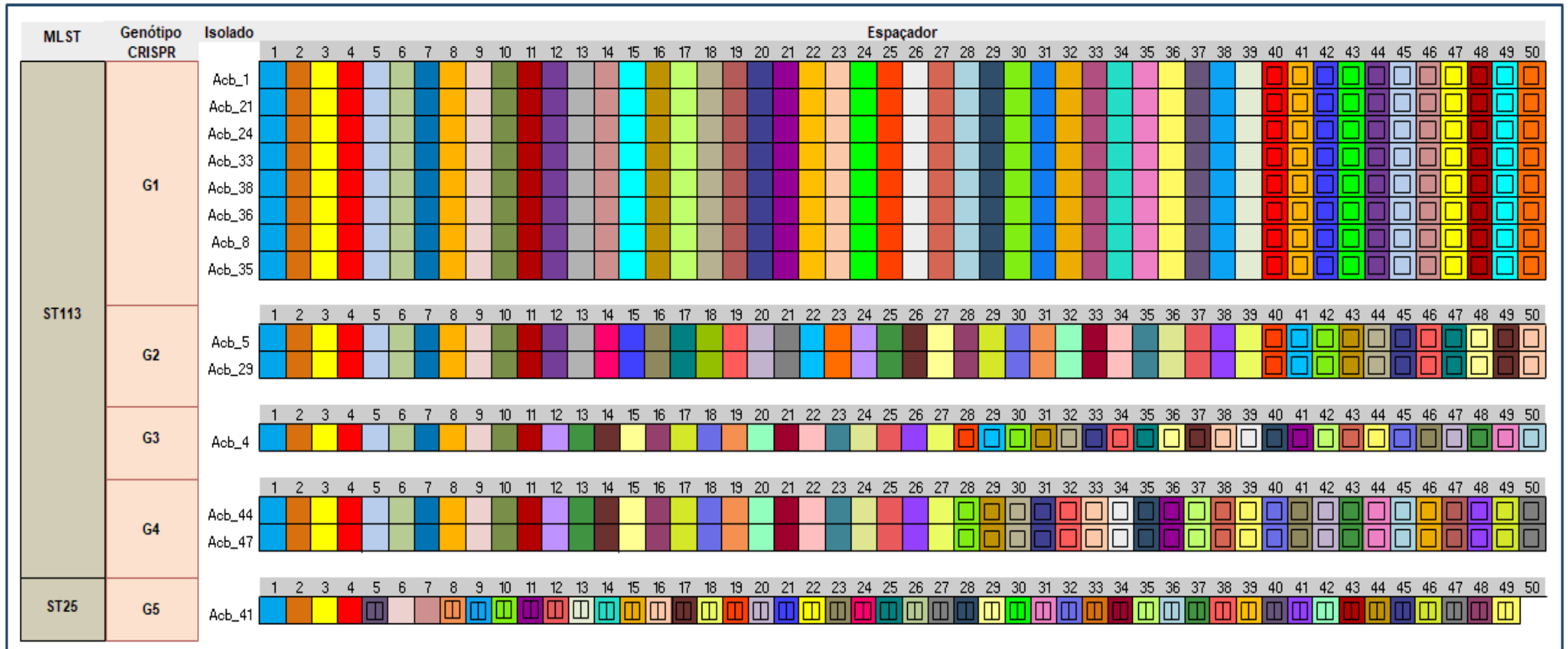


Figura 8. Alinhamento estrutural dos genótipos CRISPR determinados a partir das matrizes de espaçadores, contendo os 50 primeiros espaçadores dos *loci*. Espaçadores idênticos são representados como quadrados com mesma combinação de cor e forma. A numeração do espaçador é iniciada na extremidade ancestral (esquerda) em direção aos espaçadores mais recentemente adquiridos.

Isolados do ST113 foram distribuídos entre quatro genótipos CRISPR (G1-G4), os quais apresentaram os 11 espaçadores ancestrais em comum. A partir deste, os espaçadores 12 e 13 são comuns apenas entre os genótipos G1 e G2, G3 e G4. É observada uma diferença expressiva entre G1 e G2 a partir do espaçador 14. Os genótipos G3 e G4 apresentaram o mesmo perfil de espaçadores até o espaçador 27 (1-27); a partir deste, G3 distinguiu-se por apresentar inserções de alguns espaçadores (28, 29, 35, 36 e 37). G2 apesar de compartilhar os 13 espaçadores ancestrais com o G1, a partir do espaçador 24 apresentou a mesma sequência de espaçadores verificada em G3.

O G1 incluiu o maior número de isolados (8/14). O G5 compreendeu o único isolado pertencente ao ST25 que possui o sistema CRISPR/Cas. Este genótipo, por sua vez, caracterizou-se por possuir 49 espaçadores, dentre os quais, apenas os espaçadores 1, 2, 3, 4, 6 e 7 foram observados nos demais genótipos. Contudo, os espaçadores 6 e 7 não estavam dispostos em sequência nos outros genótipos, sendo correspondentes ao espaçador 9 (compartilhado entre G1, G2, G3 e G4) e 14 (G1), respectivamente, evidenciando eventos de incorporação de espaçadores aleatórias.

4.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ISOLADOS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

A partir das informações epidemiológicas dos isolados (Quadro 6), associadas aos genótipos CRISPR e perfil MLST, foram traçadas rotas de disseminação destes isolados entre os hospitais investigados.

Isolado	Hospital	Data de isolamento	Setor hospitalar	Sítio de infecção	Genótipo CRISPR	ST
Acb_1	A	14/05/2012	UTI Adulto Salão 1 - Leito 2	Líquor	G1	ST113
Acb_21	B	05/06/2014	ND	Secreção traqueal		
Acb_24	C	05/07/2010	UTI	Sangue		
Acb_33	D	15/07/2014	UTI 19	Sangue		
Acb_38	D	04/08/2014	Ambulatório	Partes moles		
Acb_36	D	06/08/2014	UTI 19	Cateter		
Acb_8	A	17/09/2012	UTI Adulto Salão 1 - Leito 3	Líquor		
Acb_35	D	06/08/2014	UTI 21	Cateter		
Acb_5	A	16/08/2012	UTI Adulto Salão 2 - Leito 506-7	Líquor	G2	
Acb_29	C	02/07/2010	UTI	Swab retal		
Acb_4	A	09/07/2012	UTI Adulto Salão 2 - Leito 16	Líquor	G3	
Acb_44	E	03/06/2014	UTI	Secreção traqueal	G4	
Acb_47	E	21/08/2014	UTI	Líquido cavitário		
Acb_41	D	11/07/2014	ND	Osso	G5	ST25

Quadro 6. Informações epidemiológicas dos isolados de *Acinetobacter baumannii*, associadas ao genótipo CRISPR e MLST. ND = não determinado. UTI = Unidade de terapia intensiva. G = genótipo. ST = *sequence type*.

Foi verificada uma distribuição dos genótipos CRISPR entre os hospitais analisados. O G1 foi identificado em isolados dos Hospitais A, B, C e D; G2 em isolados dos Hospitais A e C; G3 em apenas um isolado do Hospital A; G4 em dois isolados do Hospital E; e G5 em apenas um isolado do Hospital D. Nos Hospitais A, C e D foram identificados isolados com genótipos CRISPR distintos (Figura 9).

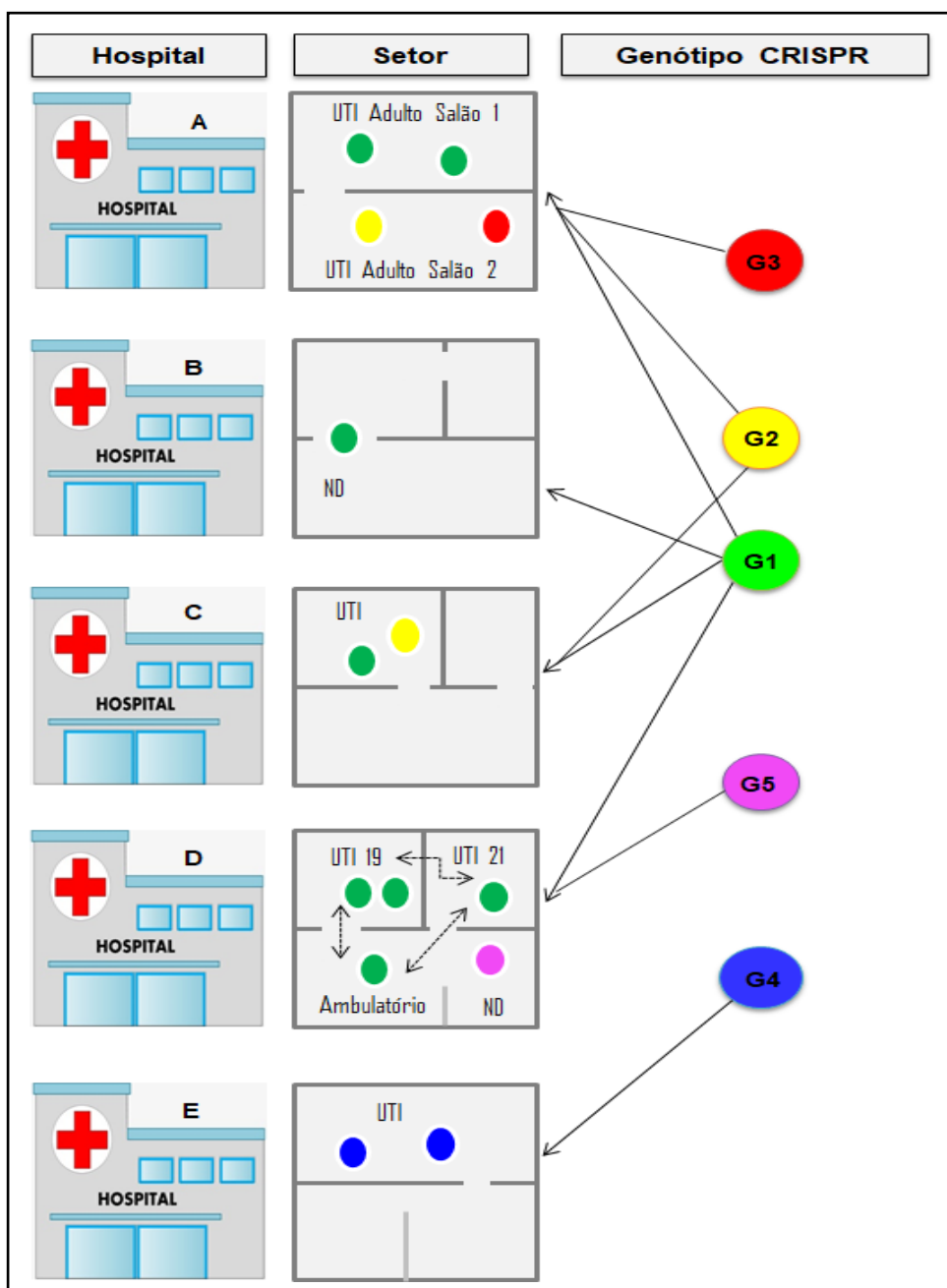


Figura 9. Representação esquemática da distribuição dos genótipos CRISPR entre os hospitais. Cada isolado de *Acinetobacter baumannii* está representado por um círculo distribuído no respectivo setor hospitalar.

No Hospital A foram observados os genótipos G1, G2 e G3. O G1 foi identificado em isolados oriundos de pacientes alocados no mesmo setor (UTI Adulto Salão 1), leitos vizinhos (Leitos 2 e 3). G2 e G3 foram verificados em isolados coletados de pacientes também internados no mesmo setor (UTI Adulto Salão 2). Todos estes genótipos identificados no Hospital A estão associados a isolados coletados na UTI Adulto, no mesmo ano (2012), diferindo apenas os salões.

No Hospital B foi identificado apenas o G1, em um isolado, cujo setor de coleta não foi determinado. No Hospital C foram verificados G1 e G2, em isolados oriundos de pacientes internados no mesmo setor (UTI), em datas equivalentes. No Hospital D observou-se G1 e G5; o G1 foi identificado em isolados distribuídos em três setores distintos (ambulatório, UTI 19 e UTI 21); o isolado que apresentou o G5, correspondente ao ST25, não teve o setor de coleta especificado; ambos os genótipos foram observados em isolados coletados em períodos similares. No Hospital E identificou-se apenas G4, em dois isolados coletados de pacientes alocados no mesmo setor (UTI), no mesmo ano.

O G1 incluiu isolados obtidos em 2010 (Hospital C), 2012 (Hospital A) e 2014 (Hospitais B e D). G2 compreendeu um isolado coletado em 2010 (Hospital C) e um isolado obtido em 2012 (Hospital A). O G3 incluiu apenas um isolado obtido em 2012 (Hospital A). G4 englobou dois isolados obtidos em 2014 (Hospital E), no mesmo setor (UTI), demonstrando o fluxo destes isolados neste ambiente. O G5 compreendeu apenas um isolado coletado em 2014 (Hospital D).

5 DISCUSSÃO

A identificação e caracterização da estrutura dos *loci* CRISPR e genes *cas* já foram realizadas por Luz et al. (2019) em *Pseudomonas aeruginosa*, Ostria-Hernández et al. (2015) em *Klebsiella pneumoniae*, Andersen et al. (2016) em *Clostridium difficile*, Briner e Barrangou (2014) em *Lactobacillus buchneri* e Tomida et al. (2017) em isolados clínicos de *Helicobacter cinaedi*. Todos revelaram uma variedade dos *loci* CRISPR e genes *cas* presentes, demonstrando sua diversidade entre estas espécies.

Os estudos compreendendo o sistema CRISPR/Cas em *Acinetobacter baumannii* ainda são bastante restritos, voltados, principalmente, a análises epidemiológicas e filogenéticas (Karlupudi et al., 2018; Karah et al., 2015; Touchon et al., 2014; Hare et al., 2014; Hauck et al., 2012). Karah et al. (2015) investigaram o modo de evolução e a diversidade dos espaçadores do sistema CRISPR/Cas subtipo I-Fb em uma coleção de 76 isolados de *A. baumannii*, obtidos de 14 países e quatro continentes. Hauck et al. (2012), desenvolveram estudos epidemiológicos e filogenéticos a partir do sistema CRISPR/Cas, em 106 isolados globais de *A. baumannii*. Todavia, nenhum destes estudos englobou isolados clínicos brasileiros.

Neste trabalho, foi investigada a frequência e estrutura do sistema CRISPR/Cas em genomas de 47 isolados clínicos de *A. baumannii*, dentre os quais, 30% (14/47 isolados) foram positivos para o sistema. Estudos anteriores já reportaram a baixa frequência do sistema CRISPR/Cas em *A. baumannii* (Hauck et al., 2012), bem como, em *Klebsiella pneumoniae* (Ostria-Hernández et al., 2015) e *Campylobacter jejuni* (Pearson et al., 2015). Fatores relacionados à manutenção do sistema CRISPR/Cas, como o gasto energético intrínseco à expressão constitutiva das proteínas Cas (Vale et al., 2015), além da interferência do sistema no processo de transferência horizontal gênica (HGT), podem estar relacionados à frequência relativamente baixa observada entre os isolados.

Os isolados em estudo consistiam em isolados clínicos multirresistentes, nos quais a aquisição de elementos genéticos móveis (MGE), possivelmente carregando genes de resistência a antimicrobianos ou genes de virulência, contribuem positivamente com o *fitness*, permitindo a seleção de tais isolados no ambiente hospitalar. Nestes casos, manter um sistema CRISPR/Cas no genoma

pode limitar a aquisição de diversos MGEs (Marraffini; Sontheimer, 2008), reduzindo o potencial adaptativo destes isolados, principalmente quanto à resistência a novos antimicrobianos. Portanto, a ausência do sistema CRISPR/Cas pode representar vantagem seletiva aos isolados CRISPR/Cas-negativas, diminuindo custos metabólicos e favorecendo a aquisição de MGEs (Hille; Charpentier, 2016).

Os genes *cas* verificados neste estudo, nos isolados, permitiram a classificação dos sistemas CRISPR/Cas como Tipo I, subtipo I-F, principal tipo encontrado nesta espécie bacteriana (Di Nocera et al., 2011; Hauck et al., 2012; Touchon et al., 2014).

A análise estrutural dos *loci* CRISPR revelou similaridades entre os isolados, com repetições diretas (DRs), repetições degeneradas (DG), mutações pontuais nas primeiras DRs, já reportadas por Di Nocera et al. (2011) e Hauck et al. (2012), e sequência líder praticamente idênticos, excluindo-se os espaçadores. A cepa de referência *A. baumannii* AYE, apesar de representar a mesma espécie, expõe um *locus* CRISPR com modificações na DG e primeiras DRs (Karah et al., 2015), evidenciando diferenças dos *loci* dentro da espécie.

A sequência líder identificada com conteúdo AT expressivo (74,15%) sugere a atividade promotora desta região (Burmistrz; Pyrc, 2015; Hille; Charpentier, 2016). A homologia com a respectiva sequência da cepa de referência *A. baumannii* AYE demonstra sua possível conservação dentro da mesma espécie (Deveau; Garneau; Moineau, 2010; Alkhnbashi et al., 2016).

A identificação de espaçadores (já descritos e novos) correspondentes a proteínas de fagos e plasmídeos confirma a atividade de defesa do sistema CRISPR/Cas contra elementos genéticos móveis (Dy et al., 2014; Burmistrz; Pyrc, 2015; Luz et al., 2019). No entanto, possuir espaçadores contra plasmídeos pode representar uma desvantagem, visto que, a atividade do sistema CRISPR/Cas contra o plasmídeo específico pode acarretar em perda de genes acessórios importantes por ele carregados (Marraffini; Sontheimer, 2008).

Dentre os espaçadores oriundos de elementos genéticos móveis, a maioria correspondeu a proteínas de fagos, cujo resultado pode estar associado ao fato de que em *A. baumannii* eventos de transformação natural e conjugação não são comuns, visto que, esta espécie bacteriana não possui mecanismos de transformação natural ativa e também não conjugam efetivamente (Gebhardt et

al., 2015). Logo, a transdução (mediada por fagos) caracteriza-se como o mecanismo de transferência horizontal de genes mais comum nesta espécie.

A identificação de espaçadores equivalentes a sequências genômicas de outras espécies bacterianas também pode estar relacionada aos eventos de transdução, sendo veiculadas por fagos em virtude do empacotamento conjunto do genoma viral e frações do genoma da bactéria hospedeira. Estes eventos de empacotamento conjunto propiciam a propagação de fragmentos do genoma bacteriano correspondentes a regiões cromossômicas, bem como, partes de plasmídeos ou plasmídeos completos (Delavat et al., 2017).

A determinação da possível origem dos espaçadores no *locus* CRISPR consiste em uma tarefa ainda bastante complicada, visto que, estas sequências são, teoricamente, oriundas de fagos e outros MGEs invasores, cujos genomas sequenciados e depositados em banco de dados correspondem a um número baixo. Este fato limita a identificação das origens destas sequências, mesmo aquelas que já foram descritas no NCBI como região CRISPR (Al-Attar et al., 2011; Chaudhary; Chattopadhyay; Pratap, 2017). Por outro lado, a ausência da origem dos espaçadores também pode se dar ao fato destes não terem sido descritos ou estudados até o presente trabalho.

A tipagem molecular dos 47 isolados de *A. baumannii* investigados por meio da definição do perfil MLST demonstrou a existência de tipos de STs distintos. Contudo, apenas dois STs (ST113 e ST25) foram observados nos isolados que possuíam o sistema CRISPR/Cas. Curiosamente, nenhum dos isolados pertencentes ao ST1, o qual pertence a cepa de referência *Acinetobacter baumannii* AYE, exibiu o sistema CRISPR/Cas em seus genomas. Vale destacar, que todos os isolados pertencentes ao ST113 apresentaram o sistema CRISPR/Cas, evidenciando a sua possível manutenção neste tipo específico. Karah e colaboradores (2015) já reportaram a presença do sistema CRISPR/Cas Tipo I-F em isolados pertencentes aos ST113 e ST25.

Ambos ST113 e ST25 pertencem ao mesmo complexo clonal (CC25), evidenciando relações filogenéticas entre tais tipos. Este complexo clonal é caracterizado como Clone Internacional I (IC1), extensamente distribuído na população global de *A. baumannii*, relatado em diferentes países da Europa, América do Sul, América do Norte, África e Ásia (Zarrilli et al., 2013). No Brasil,

este complexo clonal é amplamente disseminado, além dos complexos CC1, CC79 e CC15 (Woodford; Turton; Livermore, 2011).

A análise da organização e polimorfismos de espaçadores nos *loci* CRISPR foi conduzida para avaliar a relação genética entre os isolados clínicos de *A. baumannii*, o qual permitiu agrupá-los em cinco genótipos distintos, demonstrando um maior poder discriminatório que o MLST. Outros estudos já reportaram a eficiência da tipagem baseada em CRISPR para diferenciar isolados bacterianos, refletindo processos microevolutivos (Cui et al., 2008; Barros et al., 2014; Timme et al., 2013; Andersen et al., 2016; Tomida et al., 2017). Todavia, a ausência do sistema CRISPR/Cas em determinadas espécies bacterianas limitam a aplicação da tipagem fundamentada na análise dos *loci* CRISPR.

Enquanto o perfil MLST apresentou pouca variabilidade entre os 14 isolados que possuem o sistema CRISPR/Cas, a tipagem fundamentada na análise das matrizes de espaçadores permitiu a distribuição de isolados pertencentes ao mesmo ST em genótipos diferentes. A caracterização de quatro genótipos CRISPR distintos (G1-G4) entre os isolados pertencentes ao ST113, revelou a versatilidade dos *loci* nos isolados, evidenciando diferentes eventos de exposição a elementos genéticos móveis à medida que os isolados se distribuem em vários ambientes. Mediante análise das matrizes de espaçadores é possível inferir o processo de disseminação de isolados intimamente relacionados, como reportado por Tomida et al. (2017) em estudo com isolados de *Helicobacter cinaedi* coletados em um mesmo hospital.

A conservação de espaçadores ancestrais entre os genótipos CRISPR reflete a relação filogenética existente entre os isolados, pertencentes ao mesmo ST, salvo Acb41. Os genótipos associados ao ST113 compartilharam 11 espaçadores ancestrais, verificando-se distinção entre eles a partir do espaçador 12. Os pontos de distinção de espaçadores na matriz conservada evidenciam o processo de distribuição dos isolados clínicos, cujos espaçadores novos vão sendo adquiridos conforme a disseminação dos isolados em diferentes ambientes, como já reportado por Andersen et al. (2016), Tomida et al. (2017) e Luz et al. (2019), em *Clostridium difficile*, *Helicobacter cinaedi* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

A observação de polimorfismos de espaçadores na matriz conservada permitiu inferir uma ramificação do ST113 em dois grupos, compreendendo os

genótipos G1 e G2, respectivamente. Ambos os genótipos apresentaram uma distinção significativa a partir do espaçador 14, sugerindo duas rotas de disseminação entre membros destes genótipos, sob exposição a diferentes elementos genéticos móveis. Curiosamente, é possível verificar que G2, G3 e G4 estão relacionados, visto que, todos os espaçadores observados em G4 estão presentes em G3, e este, por sua vez, compartilha todos os espaçadores com G2. Todavia, a ausência de alguns espaçadores observada em G3 e G4, em relação a G2, sugere a ocorrência de eventos de deleção interna nos *loci* CRISPR, permitindo a diferenciação entre ambos os genótipos. Segundo Karah et al. (2015), eventos de remodelação interna do *locus* CRISPR (deleções, duplicações ou inserções de alguns espaçadores) podem ocorrer, caracterizando genótipos distintos (Karah et al., 2015). Deste modo, é possível inferir uma remodelação interna no *locus* do genótipo G2, com deleção de um grupo de espaçadores (12 a 23), resultando no perfil que caracteriza G3. Posteriormente, a deleção dos espaçadores 28, 29, 35, 36 e 37 no *locus* CRISPR verificado em G3, conduziu à configuração do genótipo G4.

Interessantemente, o genótipo G5, o qual incluiu o único isolado pertencente ao ST25 (Acb41), apresentou uma composição de espaçadores bastante discrepante aos demais genótipos, sugerindo uma relação entre os genótipos CRISPR com o perfil MLST. De acordo com Andersen et al. (2016), a aquisição de espaçadores distintos no *locus* exibe caminhos evolutivos divergentes ao longo do tempo (Andersen et al., 2016). Desse modo, isolados pertencentes à STs diferentes apresentam conteúdo de espaçadores heterogêneo, como verificado no presente estudo, cujos genótipos intrínsecos a um mesmo ST apresentam uma conservação na matriz de espaçadores. Todavia, embora G5 esteja associado a outro ST, observou-se que os quatro espaçadores ancestrais do *locus* neste genótipo eram idênticos aos verificados nos demais genótipos. Tal fato pode insinuar uma possível diferenciação entre o ST113 e ST25, após os eventos de incorporação destes espaçadores.

A presença de pelo menos um dos genótipos intrínsecos ao ST113 (G1, G2, G3 e G4) em todos os hospitais investigados, revela a distribuição de *Acinetobacter baumannii* ST113 entre as unidades hospitalares da cidade do Recife. A veiculação destes isolados pode estar relacionada à transferência inter-hospitalar de pacientes ou, até mesmo, da equipe médica e/ ou acessórios,

considerando a capacidade desta espécie de colonizar superfícies abióticas e sobreviver por períodos prolongados (Howard et al., 2012).

Dentre os genótipos identificados, G1 comportou-se como o mais prevalente, apresentando veiculação intra-hospitalar (hospital D) e inter-hospitalar, sendo identificado em isolados dos hospitais A, B, C e D. No Hospital A, a identificação deste genótipo foi entre os isolados oriundos de pacientes internados na UTI (Acb1 e Acb8), em leitos vizinhos, no mesmo ano (2012), refletindo a manutenção destes isolados neste ambiente específico. Este fato evidencia possíveis falhas nas práticas de controle de infecção hospitalar, representando um alerta para a CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar), visto que, estes isolados multirresistentes estão circulando na UTI. No Hospital C, G1 também foi identificado em isolado coletado na UTI, demonstrando a necessidade de práticas mais eficazes de controle de infecção hospitalar neste ambiente. A presença de isolados multirresistentes em UTI caracteriza-se como sério risco à saúde dos pacientes (Howard et al., 2012).

Os isolados obtidos em 2014, no hospital D, foram oriundos de pacientes alocados em ambulatório (Acb38), UTI 19 (Acb33 e Acb36) e UTI 21 (Acb35), refletindo a circulação de tais isolados em diferentes setores desta unidade hospitalar, cuja veiculação pode ocorrer em superfícies, através de equipamentos ou pelos próprios profissionais. Os isolados Acb33 e Acb36 foram coletados de pacientes da UTI 19, em dias distintos, evidenciando a manutenção destes isolados neste ambiente. O isolado Acb35, apesar de possuir a configuração de espaçadores intrínseca ao genótipo G1, apresentou dois espaçadores adicionais, posteriormente incorporados ao *locus*, sugerindo uma possível exposição à MGEs distintos neste setor. Estes resultados, mais uma vez, evidenciam falhas associadas aos procedimentos de controle de infecção hospitalar, consistindo em alerta à CCIH, visto que, a veiculação de isolados multirresistentes está acontecendo em diferentes setores hospitalares, assim como, entre hospitais distintos. Isolados de *A. baumannii* multirresistentes estão comumente associados a surtos de infecções hospitalares, constituindo um crescente problema de saúde pública (Cheon et al., 2016). Mediante a data de coleta dos isolados, pode-se sugerir que G1 foi primariamente observado no Hospital C (2010), sendo posteriormente identificado também no Hospital A (2012), disseminando-se para

os Hospitais B e D, caracterizando a transferência inter-hospitalar deste genótipo específico.

Além de G1, o genótipo G2 também apresentou uma veiculação inter-hospitalar, sendo inicialmente identificado no Hospital C (2010) e, posteriormente, no Hospital A (2012). Ambos os isolados coletados nos Hospitais A (Acb5) e C (Acb29) foram obtidos de pacientes internos na UTI, demonstrando o perigo da circulação de isolados multirresistentes neste setor, traduzindo-se em aviso de risco à CCIH de cada hospital. É importante ressaltar que estratégias de controle de infecção intensificadas precisam ser adotadas para controlar a disseminação de *A. baumannii* multirresistente (além das medidas de controle de rotina) nestes setores, como, por exemplo, educação de toda a equipe hospitalar, culturas de vigilância ativa, precauções de contato, desinfecção de alas e equipamentos, promoção da higiene das mãos, além da aplicação de terapia antimicrobiana sob vigilância (Gaynes; Edwards, 2005). *A. baumannii* é um dos patógenos multirresistentes mais difíceis de conter, e medidas de controle de infecção em longo prazo são imprescindíveis para alcançar um controle suficiente (OMS, 2017).

Os genótipos G3, G4 e G5 não exibiram disseminação inter-hospitalar, sendo identificados nos Hospitais A (Acb4), E (Acb44 e Acb47) e D (Acb41), respectivamente. Vale destacar que, o genótipo G4 foi o único identificado no Hospital E, em dois isolados obtidos de pacientes alocados na UTI, em períodos distintos, refletindo a manutenção dos isolados neste ambiente. Como este genótipo foi verificado apenas neste setor, pode-se inferir uma localização ainda “restrita” destes isolados. No Hospital D, a identificação de G5, além da observação do genótipo G1 prevalente entre os isolados, revela a coexistência de *A. baumannii* ST113 e ST25 nesta unidade hospitalar. Interessantemente, isolados pertencentes ao ST113 estiveram distribuídos em diferentes setores neste hospital, evidenciando uma disseminação mais ativa que *A. baumannii* ST25. A presença de isolados distintos multirresistentes em um ambiente hospitalar caracteriza aumento do risco de surto de infecções hospitalares entre os pacientes, visto que, a terapia antimicrobiana pode ser eficaz sobre um isolado específico e não possuir atividade sobre o outro (Montefour et al., 2008; Cheon et al., 2016). A confirmação da presença de *A. baumannii* ST113 e ST25 multirresistentes no Hospital D, além da verificação de circulação dos isolados

pertencentes ao ST113 em diferentes setores, desde o ambulatório até a UTI, promove um alerta de risco para a CCIH deste hospital, cujas medidas de controle de infecção precisam ser reavaliadas e intensificadas, de modo a garantir a segurança dos pacientes e profissionais. Dentre os hospitais investigados, o Hospital D caracterizou-se como o de maior risco a surto de infecção hospitalar por *A. baumannii* multirresistente.

No Hospital A, a observação de três genótipos (G1, G2 e G3) distribuídos na UTI Adulto, entre os salões 1 e 2, evidencia a presença de isolados distintos neste setor, reforçando mais uma vez a necessidade de práticas de controle de infecção mais efetivas. Este alerta também se aplica ao Hospital C, no qual foram verificados os genótipos G1 e G2 em isolados obtidos de pacientes alocados na UTI. Estes resultados refletem o problema da disseminação de *A. baumannii* multirresistente na Unidade de Terapia Intensiva, caracterizando sério risco à saúde dos pacientes, cujas condições fisiológicas de pacientes imunodeprimidos favorecem a aquisição de infecções hospitalares. Considerando que *A. baumannii* é um patógeno oportunista capaz de desencadear sérios quadros de infecções, além de apresentar difícil controle e eliminação, sua presença configura um alerta à CCIH, requerendo o emprego de práticas de controle de infecção acentuadas em todo o ambiente hospitalar, visto que, a equipe médica, bem como, equipamentos e demais superfícies funcionam como veículos à circulação deste patógeno (Das et al., 2002; Rodríguez-Baño et al., 2009; Cheon et al., 2016).

A descrição da análise epidemiológica molecular dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizando as matrizes de espaçadores CRISPR, além do perfil MLST e informações epidemiológicas, apresentou resultado positivo quanto à avaliação da distribuição destes isolados nos hospitais investigados. Tal fato demonstra a aplicação da análise dos *loci* CRISPR como uma ferramenta auxiliar no estudo de infecções hospitalares por *A. baumannii*, possibilitando estabelecer a relação genética entre os isolados e elucidar o processo de disseminação dos mesmos no ambiente hospitalar. A partir destes dados também é possível inferir os processos de veiculação intra e inter-hospitalares dos isolados, refletindo, conseqüentemente, o nível de eficiência das práticas de controle de infecção hospitalar, cujos resultados podem direcionar a atuação da CCIH mediante riscos de surto e necessidade de intensificação das medidas de controle.

Apesar do desenvolvimento crescente de estudos voltados ao sistema CRISPR/Cas, visando desvendar as bases estruturais, detalhar o mecanismo de ação e interferência deste sistema em diferentes processos celulares, em diversos organismos, muito ainda precisa ser investigado sobre este sistema imune procariótico. A análise da configuração estrutural do *locus* CRISPR compreende informações importantes acerca do contato de determinadas espécies bacterianas com elementos genéticos móveis, além de refletir processos de disseminação distintos e possibilitar o rastreamento de isolados, caracterizando-se como uma ferramenta importante para análises filogenéticas e de tipagem molecular.

6 CONCLUSÕES

- a) A baixa frequência do *locus* CRISPR em isolados clínicos de *A. baumannii* demonstra a importância que elementos genéticos móveis possuem na adaptação e evolução do genoma desta espécie;
- b) A identificação de diferentes espaçadores correspondentes a sequências de fagos e/ou plasmídeos revela a capacidade de adaptação do sistema CRISPR/Cas mediante exposição a distintos MGEs;
- c) A observação de similaridade entre os *loci* CRISPR dos isolados investigados revela a conservação estrutural do *locus*, salvo o conteúdo de espaçadores, dentro de um mesmo ST, e, possivelmente, entre isolados pertencentes ao mesmo Complexo Clonal;
- d) A caracterização de genótipos CRISPR, baseada na análise dos polimorfismos na matriz de espaçadores, apresenta maior poder de discriminação que o perfil MLST, contribuindo para a tipagem de isolados de *A. baumannii* intimamente relacionados;
- e) A observação de genótipos com configurações de espaçadores significativamente distintos, entre isolados pertencentes à mesma espécie, sugere a microevolução dos isolados sob rotas de disseminação diferentes;
- f) A análise das matrizes de espaçadores dos *loci* CRISPR constitui uma ferramenta auxiliar em estudos de epidemiologia molecular, possibilitando, juntamente com o MLST e informações epidemiológicas, a elucidação do processo de disseminação dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.

REFERÊNCIAS

- ABUDAYYEH, Omar O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science**, v. 353, n. 6299, p. aaf5573, 2016.
- AL-ATTAR, Sinan et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 4, p. 277-289, 2011.
- ALKHNBASHI, Omer S. et al. Characterizing leader sequences of CRISPR loci. **Bioinformatics**, v. 32, n. 17, p. 576-585, 2016.
- AMITAI, Gil; SOREK, Rotem. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 67-76, 2016.
- ANDERSEN, Joakim M. et al. CRISPR diversity and microevolution in *Clostridium difficile*. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 9, p. 2841-2855, 2016.
- BABU, Mohan et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 484-502, 2011.
- BARRANGOU, Rodolphe et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.
- BARRANGOU, Rodolphe; MARRAFFINI, Luciano A. CRISPR-cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2014.
- BARROS, Maria Paloma S. et al. Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e108353, 2014.
- BHAYA, Devaki; DAVISON, Michelle; BARRANGOU, Rodolphe. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. **Annual Reviews of Genetics**, v. 45, p. 273-297, 2011.
- BLOWER, Tim R. et al. Evolution of *Pectobacterium* bacteriophage M1 to escape two bifunctional type III toxin-antitoxin and abortive infection systems through mutations in a single viral gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 8, p. e03229-16, 2017.
- BOLOTIN, Alexander et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005.
- BONDY-DENOMY, Joseph; DAVIDSON, Alan R. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR-Cas systems. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 218-225, 2014.

BONDY-DENOMY, Joseph et al. Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti–CRISPR proteins. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 136-139, 2015.

BRINER, Alexandra E.; BARRANGOU, Rodolphe. *Lactobacillus buchneri*: genotyping on the basis of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) locus diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 994-1001, 2014.

BRINER, Alexandra E.; BARRANGOU, Rodolphe. Deciphering and shaping bacterial diversity through CRISPR. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 101-108, 2016.

BURMISTRZ, Michal; PYRC, Krzysztof. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 193-202, 2015.

CHAUDHARY, Kulbhushan; CHATTOPADHYAY, Anirudha; PRATAP, Dharmendra. Anti-CRISPR proteins: counterattack of phages on bacterial defense (CRISPR/Cas) system. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 57-59, 2018.

CHEON, Shinye et al. Controlling endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Units using antimicrobial stewardship and infection control. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 2, p. 367-374, 2016.

CISNEROS, José Miguel; RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.

CRISPRs Web Server. Disponível em: <<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>>. Acesso em: 11/07/2017.

CUI, Yujun et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Plos One**, v. 3, n. 7, p. e2652, 2008.

DAS, Ira et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 2, p. 110-114, 2002.

DELAVAT, François et al. The hidden life of integrative and conjugative elements. **Fems Microbiology Reviews**, v. 41, n. 4, p. 512-537, 2017.

DEVEAU, Héléne; GARNEAU, Josiane E.; MOINEAU, Sylvain. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 475-493, 2010.

DI NOCERA, Pier Paolo et al. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 224, p. 224-241, 2011.

DIANCOURT, Laure et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. e10034, 2010.

DÍAZ-MUÑOZ, Samuel L.; KOSKELLA, Britt. Bacteria-phage interactions in natural environments. **Advances in Applied Microbiology**, v. 89, p. 135-183, 2014.

DY, Ron L. et al. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 307-331, 2014.

EAST-SELETSKY, Alexandra et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 270-273, 2016.

FOURNIER, Pierre Edouard; RICHET, Hervé. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 692-699, 2006.

GAITH, Doaa Mohammad et al. The emergence of a novel sequence type of MDR *Acinetobacter baumannii* from the intensive care unit of an Egyptian tertiary care hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 34-42, 2017.

GARNEAU, Josiane E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, p. 67-71, 2010.

GAYNES, Robert; EDWARDS, Jonathan R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848-854, 2005.

GEBHARDT, Michael J. et al. Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01660-15, 2015.

GRISSA, Ibtissem; VERGNAUD, Guilles; POURCEL, Christine. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic Acids Research**, v. 35(Web Server issue), p. W52-W57, 2007.

GROENEN, Peter M. A. et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

GUDBERGSDOTTIR, Soley et al. Dynamic properties of the *Sulfolobus* CRISPR/Cas and CRISPR/Cmr systems when challenged with vector-borne viral and plasmid genes and protospacers. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 35-49, 2011.

HAMOUDA, Ahmed et al. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based

typing of *bla*OXA-51-like genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2476-2483, 2010.

HARE, Janelle M. et al. Prophage Induction and Differential RecA and UmuDAB Transcriptome Regulation in the DNA Damage Responses of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. e93861, 2014.

HATOUM-ASLAN, Asma; MARRAFFINI, Luciano A. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 82-90, 2014.

HAUCK, Yolande et al. Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeats analysis. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. e44597, 2012.

HILLE, Frank; CHARPENTIER, Emmanuelle. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 371, n. 1707, p. 20150496, 2016.

HILLE, Frank et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.

HORVATH, Philippe et al. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 62-70, 2009.

HOWARD, Aoife et al. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.

HULLAHALLI, Karthik et al. An attenuated CRISPR-Cas system in *Enterococcus faecalis* permits DNA acquisition. **MBio**, v. 9, n. 3, p. e00414-18, 2018.

INOUE, Michael et al. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. **Genome Medicine**, v. 6, n. 11, p. 90-106, 2014.

ISHINO, Yoshizumi et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JACKSON, Simon A. et al. CRISPR-Cas: Adapting to change. **Science**, v. 356, n. 40, p. e5056, 2017.

JANSEN, Ruud et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.

JIANG, Wenyan et al. Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. **Plos Genetics**, v. 9, n. 9, p. e1003844, 2013.

JOHNSON, Christopher M.; GROSSMAN, Alan D. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): what they do and how they work. **Annual Review of Genetics**, v. 49, p. 577-601, 2015.

JORTH, Peter; WHITELEY, Marvin. An evolutionary link between natural transformation and CRISPR adaptive immunity. **MBio**, v. 3, n. 5, p. e00309-12, 2012.

KARAH, Nabil et al. CRISPR-Cas Subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: evolution and utilization for strain subtyping. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0118205, 2015.

KARLAPUDI, Abraham P. et al. In silico sgRNA tool design for CRISPR control of quorum sensing in *Acinetobacter* species. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 123-129, 2018.

KOONIN, Eugene V.; MAKAROVA, Kira S.; ZHANG, Feng. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 67-78, 2017.

KWIATEK, Magdalena et al. Isolation of bacteriophages and their application to control *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilme models. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 3, p. 194-207, 2017.

LABRIE, Simon J.; SAMSON, Julie E.; MOINEAU, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, 2010.

LEAL-BALBINO, Tereza Cristina et al. Introdução ao CRISPR. In: PEREIRA, Tiago Campos (2016) **Introdução à técnica de CRISPR**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

LEVY, Asaf et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 505-510, 2015.

LOUWEN, Rogier et al. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 207-226, 2013.

LOWE, Michelle et al. *Acinetobacter baumannii*: epidemiological and beta-lactamase data from two tertiary academic hospitals in tshwane, South Africa. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1280, 2018.

LUZ, Ana Carolina de Oliveira et al. Analysis of direct repeats and spacers of CRISPR/Cas systems type I-F in Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-11, 2019.

MAIKOVA, Anna et al. Discovery of new type I toxin–antitoxin systems adjacent to CRISPR arrays in *Clostridium difficile*. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 9, p. 4733-4751, 2018.

MAKAROVA, Kira S. et al. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 482-496, 2002.

MAKAROVA, Kira S. et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology Direct**, v. 1, n. 1, p. 7-33, 2006.

MAKAROVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467-477, 2011.

MAKAROVA, Kira S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722-736, 2015.

MANDIN, Pierre et al. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 3, p. 962-974, 2007.

MARRAFFINI, Luciano; SONTHEIMER, Erik J. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in *Staphylococci* by Targeting DNA. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1843-1845, 2008.

MAXWELL, Karen L. The Anti-CRISPR Story: a battle for survival. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 8-14, 2017.

MODELL, Joshua W.; JIANG, Wenyan; MARRAFFINI, Luciano A. CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity. **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 101-104, 2017.

MOJICA, Francisco J. M. et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 1995.

MOJICA, Francisco J. M. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000.

MONTEFOUR, Kerry et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. **Critical Care Nurse**, v. 28, n. 1, p. 15-25, 2008.

MÜLLER, Gabriela L. et al. Light modulates metabolic pathways and other novel physiological traits in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 10, p. e00011-17, 2017.

OMS. **Agentes patogênicos prioritários**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

OSTRIA-HERNÁNDEZ, Martha Lorena et al. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 332, 2015.

PATTERSON, Adrian G.; YEVSTIGNEYEVA, Mariya S.; FINERAN, Peter C. Regulation of CRISPR-Cas adaptive immune systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 1-7, 2017.

PAWLUK, April; DAVIDSON, Alan R.; MAXWELL, Karen L. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12-17, 2018.

PEARSON, Bruce M. et al. Differential distribution of Type II CRISPR-Cas systems in agricultural and nonagricultural *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates correlates with lack of shared environments. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 9, p. 2663-2679, 2015.

POURCEL, Christine; SALVIGNOL, Grégory; VERGNAUD, Gilles. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 653-663, 2005.

PUL, Ümit et al. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1495-1512, 2010.

RICHTER, Corinna; CHANG, James T.; FINERAN, Peter C. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2291-2311, 2012.

RODIC, Andjela et al. Features of CRISPR-Cas regulation key to highly efficient and temporally-specific crRNA production. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2139, 2017.

RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús et al. Long-term Control of Hospital-wide Endemic Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* through a Comprehensive "Bundle" Approach. **American Journal of Infection Control**, v. 37, n. 9, p. 715-722, 2009.

SAMPSON, Timothy R. et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 254-257, 2013.

SAMSON, Julie E. et al. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 675-687, 2013.

SELLE, Kurt; KLAENHAMMER, Todd R.; BARRANGOU, Rodolphe. CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. **PNAS**, v. 112, n. 26, p. 8076-8081, 2015.

SHARIAT, Nikki; DUDLEY, Edward G. CRISPRs: Molecular signatures used for pathogen subtyping. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 430-439, 2014.

SHMAKOV, Sergey et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169-182, 2017.

SMARGON, Aaron A. et al. Cas13b is a Type VI-B CRISPR-associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. **Molecular Cell**, v. 65, n. 4, p. 618-630, 2017.

SONTHEIMER, Erik J.; DAVIDSON, Alan R. Inhibition of CRISPR-Cas systems by mobile genetic elements. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 120-127, 2017.

SOREK, Rotem; KUNIN, Victor; HUGENHOLTZ, Philip. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 181-186, 2008.

SOUKY, Shannon M.; HUANG, Jinling; GOGARTEN, Johann Peter. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 8, p. 472-482, 2015.

STERN, Adi et al. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? **Trends in Genetics**, v. 26, n. 8, p. 335-40, 2010.

STERNBERG, Samuel H. et al. Adaptation in CRISPR-Cas Systems. **Molecular Cell**, v. 61, n. 6, p. 797-808, 2016.

TIMME, Ruth E. et al. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 11, p. 2109-2123, 2013.

TOMIDA, Junko et al. Diversity and microevolution of CRISPR loci in *Helicobacter cinaedi*. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. e0186241, 2017.

TOUCHON, Marie et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 10, p. 2866-2882, 2014.

VALE, Pedro F. et al. Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in *Streptococcus thermophilus*. **Proceedings Biological Sciences**, v. 282, n. 1812, p. 20151270, 2015.

VAN DER OOST, John et al. CRISPR-based adaptative and heritable immunity in prokaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 8, p. 401-407, 2009.

VAN DER OOST, John et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 479-492, 2014.

VERCOE, Reuben B. et al. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. **Plos Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003454, 2013.

VIEIRA, Gabriel Viliod et al. Visão Geral do Mecanismo Básico de Ação. In: PEREIRA, Tiago Campos (2016) **Introdução à técnica de CRISPR**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

VISWANATHAN, Poorna et al. Regulation of dev, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-Associated genes and repeats. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 3738-3750, 2007.

WATSON, Bridget N. J.; STAALS, Raymond H. J.; FINERAN, Peter C. CRISPR-Cas-Mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. **MBio**, v. 9, n. 1, p. 2406-2417, 2018.

WEINBERGER, Ariel D. et al. Viral diversity threshold for adaptive immunity in prokaryotes. **MBio**, v. 3, n. 6, p. e00456-12, 2012.

WEISSMAN, Jake L. et al. Immune loss as a driver of coexistence during host-phage coevolution. **The ISME Journal**, v. 12, p. 585-597, 2018.

WESTRA, Edze R.; BUCKLING, Angus; FINERAN, Peter C. CRISPR-Cas systems: beyond adaptative immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 317-326, 2014.

WESTRA, Edze R. et al. Parasite exposure drives selective evolution of constitutive versus inducible defense. **Current Biology**, v. 25, n. 8, p. 1043-1049, 2015.

WHO. OMS publica lista de bactérias para as quais novos antibióticos são urgentemente necessários. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 19/07/2017.

WOODFORD, Neil; TURTON, Jane F.; LIVERMORE, David M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 736-755, 2011.

ZARRILLI, Raffaele et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2013.

ZEGANS, Michael E. et al. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviours of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 1, p. 210-219, 2009.

ZHANG, Quan; YE, Yuzhen. Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 92-104, 2017.

APÊNDICE A - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO (restrito ao período de
vínculo ao PPGG)

Hirisleide Bezerra Alves

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

Título: Investigação estrutural e epidemiológica do Sistema CRISPR/Cas em genomas de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*

Orientador(a): Tereza Cristina Leal Balbino

Co-orientador: Felipe Lira de Sá Cavalcanti

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Formação complementar

2018 - 2018 Extensão universitária em Desenho de primers para PCR quantitativa em tempo real.

(Carga horária: 8h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2018 - 2018 Extensão universitária em Fundamentos e Metodologias do Yeast two-hybrid para detecção in vivo.

(Carga horária: 8h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2018 - 2018 QBA/On-line - Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente.

Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brasil.

2018 - 2018 Extensão universitária em Banco de Dados e Anotação (BLAST).

(Carga horária: 5h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2017 - 2017 Extensão universitária em Prevenção e Controle de Infecções na Área da Saúde.

(Carga horária: 4h).

Unieducar Inteligência Educacional, UNIEDUCAR, Brasil.

2017 - 2017 Extensão universitária em Noções Básicas em Bioinformática.

(Carga horária: 8h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ALVES, H. B.; SILVA, A. M. A.; LUZ, A. C. O.; LEAL-BALBINO, T. C. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*, 2018. (Outra Apresentação de Trabalho)**

Referências adicionais: Brasil/Português; Evento: VIII Jornada de Pós Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. **III Simpósio Norte e Nordeste de Bioinformática, 2018. (Outra)**
2. **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018. (Outra)**
3. **VII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2017. (Outra)**

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **Avaliadora de e-Pôster na XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), 2018. Universidade Federal Rural de Pernambuco.**
2. **Avaliadora de Resumos Online na XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), 2017. Universidade Federal Rural de Pernambuco.**

ANEXO A - DESCRIÇÃO DOS ESPAÇADORES ENCONTRADOS NESTE ESTUDO.

Espaçador	Sequência	Descrição
s1	AAAAAGTTTTTTTGACAATCAAGCCGGCAAGTT	Novo
s2	AAAACATAAACGGCAGTGTCGTCAGCATGACC	Novo
s3	AAAGACAAATCAGCATCACAAATTGAATCAAT	Novo
s4	AAAGATTCTAGCCCCCTCAATTGAGAAGTTAT	Descrito como CRISPR
s5	AACGAGAAATTGGAACACAAAAGAACCAAAA	Novo
s6	AACGTGAACAATTGTTTTAGCTTTGAACATTA	Descrito como CRISPR
s7	AACGTTTCCGCAAATCTGCGAAATACTCGTTG	Descrito como CRISPR
s8	AATACGAACAGTATCAAGTTCAGTCGTTGGTA	Descrito como CRISPR
s9	AATAGAATTAACCACGTTGATAATATAGGT	Descrito como CRISPR
s10	AATATAGTGGCATCTTCGAGAGTTAAAGGCGG	Descrito como CRISPR
s11	AATTAGAAAATTTTTCATCCTCCCCCTTGAG	Descrito como CRISPR
s12	ACAACTAAACGTTTACCACTTGCAGTTGTTG	Novo
s13	ACAATAAAGAAGATACCGAATATATTCGCAGG	Novo
s14	ACACCATCAAAGTCCAAAGCAATCAATACAGC	Novo
s15	ACATGATATGAAGCGAAAGCCATATCAGTGTT	Novo
s16	ACCAGAAAAGCAGAGTAAAGCTTCACAGCCAT	Descrito como CRISPR
s17	ACCGTTTGCTCTTCCAGCAAAAATAGGATCCG	Novo
s18	ACGGTGTGAGAGTTTTAGAACTCAATGATGGC	Novo
s19	ACTGAGAAAAACCTCCTTTTGTGGCTTCTCTT	Novo
s20	ACTGGAATTCAGCAGTAAATAAGGGTTAAGA	Novo
s21	AGAAGGTGGAAGTGTAAAAATTGTTGGCAATCT	Novo
s22	AGCAAATAGATCAACTGGTGCGCCCTATGAAT	Descrito como CRISPR
s23	AGCATGTGCTAAATCAGGGAAAAGAAAAGCCA	Descrito como CRISPR
s24	AGCCAACTTAATAGTAGAAAGGTAATGCCCTT	Descrito como CRISPR
s25	AGCCACGTCAACAGCAGCATTGGCATTAGTAA	Novo

s26	AGCCGGTGTTGATCTGATATGCGTTAGCCATT	Novo
s27	AGTAGTTGCACCAGACTCCGCACAATCTAAAA	Descrito como CRISPR
s28	AGTCGGCACAGGTAGCAGTTGAGCAGTCATCG	Descrito como CRISPR
s29	AGTCTTTAATGTCGGCAACATGCTGTGCAAAA	Novo
s30	AGTGAATGGGATTTATTCGCAAGGTGATATTA	Novo
s31	AGTGCGTGAACATTATTCTTTCTGAATCAGCT	Descrito como CRISPR
s32	AGTTAATACCCGTTGGCCATATTGTTTCAGTTT	Novo
s33	AGTTGATATGATTATTAATATTAAGTTGTTT	Descrito como CRISPR
s34	AGTTTGAACATCTAATAATTGAGCTGTAATAC	Descrito como CRISPR
s35	ATAAAGCGCACAAACCCATTGATTTGTATTTTT	Descrito como CRISPR
s36	ATAACGAGAAGCGTTGCGTAGACTTACAACCTC	Novo
s37	ATACACATGTTTTCTAATAAGAATAAGACAA	Descrito como CRISPR
s38	ATACGAACATCATTTACTTGCTGAAGTTGCTT	Novo
s39	ATACGCGCCAAACATGAATGGGTTTAAACGT	Novo
s40	ATATGGTGGTTGTTATAAACCGCCTAATGATA	Descrito como CRISPR
s41	ATCAGAATTTTGTTTACAAGTTCTAAGCGGGA	Descrito como CRISPR
s42	ATCATCGAAATTTAGTTCTAATTCTTTAATTT	Descrito como CRISPR
s43	ATCATGAAGCTTATTAAATGACTGACATGGCT	Descrito como CRISPR
s44	ATCCTGTCTCTTGGTCAATCTTGGCACGTAGG	Novo
s45	ATCGTTATCCGTTATGTTCCAAACAGGGTGAA	Novo
s46	ATCTTATCGCTAATTTTCTTGGCTAATGCATC	Novo
s47	ATCTTCCGCAATGGCCTTTTTGAATGCTTCAT	Novo
s48	ATCTTGAGTTCAAATAAACGGACAAATGGGAT	Descrito como CRISPR
s49	ATGATACAGCCTGAAACGAAGGCAACCGCAGC	Novo
s50	ATGCTCTCAATAATTCGCAAGTAAAAGTGGAT	Novo
s51	ATTAAGCAAGGGCTGACCCCGACCGCCGAGCA	Novo
s52	ATTAATAGTAATCGTAGTGGCGGTGTGTCAAT	Descrito como CRISPR
s53	ATTACCGACTGATTGTTGAGTGGCAATGTAA	Descrito como CRISPR
s54	ATTAGAAGACGTGGACTCCCCAACCTTTCAA	Descrito como CRISPR

s55	ATTAGCAGGTGATTACGCAGTCTTATCTAATG	Novo
s56	ATTGACTTACAGCGTTATGAGAGATCCCTAGTT	Novo
s57	ATTGGGGGTACTGCTGCTGAGGTCATTCAATA	Novo
s58	ATTTGGACGGCTTGAACCAATCCAACAAGAAC	Novo
s59	ATTTTGATCTTTACTTATTCTCGCTTCAAACA	Descrito como CRISPR
s60	CAAACGTGGGTACATCTAGTTGCCTGAGGAG	Descrito como CRISPR
s61	CAATGGATTAAAGATTTC AACCGCTTGGGAG	Descrito como CRISPR
s62	CACCATGCGTTTAGGTGTCGGTGAGCTGCATC	Novo
s63	CAGCAAATGGGCGGTGTAATTGCTGATGGAGC	Novo
s64	CAGCCAAAAAAGACTGGGAAAAAGGGATTGAT	Novo
s65	CATGACCCAACCACGTAAATTCATACCACACG	Novo
s66	CCAAGCTGTGAATGTTGGTAATGCTTTAAGCG	Novo
s67	CCAGACTTGATTTTTATCACCATTGAAGAGTT	Descrito como CRISPR
s68	CCCAACTTTTTAAATATTTAATTCTTATAAGA	Novo
s69	CGCGGCCTTTATTCGCGTGTTTCGGTTGAGTT	Novo
s70	CGGTACGTTCAACGGTCAGCAGATTGTGTTA	Descrito como CRISPR
s71	CGTCAAAACAATCAAAAAAGCAATGAGTACAA	Novo
s72	CTGAATTTTCTAAATCTAGTTGTGATCCGAAA	Novo
s73	CTGGGGCATAACACGGTAAGAACCGAGCTATG	Novo
s74	GAAGTAGATAAACCTTTTAAAGAAATACATAA	Novo
s75	GAATTGCACTTGCTAAGCCAATAATGCCAACT	Descrito como CRISPR
s76	GACAGGAACCGTCACTGAAAGCGCACAGGCTC	Novo
s77	GACATGGCGAGTTGCAGCAGGAATACCATAAT	Descrito como CRISPR
s78	GACCCATAAATCAAACAAGCCAACATAATTGA	Descrito como CRISPR
s79	GACGAGCAACACGTCAACGAACCTCAAAGCAAA	Descrito como CRISPR
s80	GAGAATGATTTAAATTGCATTAAGCCTTTAAA	Descrito como CRISPR
s81	GAGATTCAAGTTTCACCGGATGGCACAAGTAA	Descrito como CRISPR
s82	GAGTAATGCAGCACCAACAGCAGTAATCGCAG	Novo
s83	GAGTTCTTTCATAACGTAGGCTTTAATGCCTG	Descrito como CRISPR

s84	GATTATTCTGGTTATAACTTTGTCTGTGTAAT	Novo
s85	GCAAGTGTCACCTTTAAGTGCACGGAAGAAAT	Novo
s86	GCAGTATTGACTGTCGGACTTGTGACAACCTG	Novo
s87	GCCAGGGGCAACATACCGCGCTAACGTTAGTG	Novo
s88	GCCTCCAATTGATCCAATTGATCAACCTCCAT	Descrito como CRISPR
s89	GCCTGCAAGTACAGATGAAGAAACACAAAAAA	Novo
s90	GCTAAAGGCTAAAGCAACCAAGGTGAATCTTA	Novo
s91	GCTCCGTAATTAATCAAGAAATAATCAAATTT	Novo
s92	GTAAAAAAGAACATTTCCAGCAAAAATTGACGA	Descrito como CRISPR
s93	GTAAAGCGATGTTTGCTCATTTTCATCAGCAT	Novo
s94	GTAAATATGCTGCTTTAACCCGCCAAACGAAT	Novo
s95	GTCCTGGTGAATTCGGGCAAGTCTCGATACTC	Novo
s96	GTTACTGGGTTGCGGAATATATTCGCAATTAT	Descrito como CRISPR
s97	TAAAATCACATCAGGGAAGTGAAGGCGAGCTA	Descrito como CRISPR
s98	TAACCTAGACTGAATATCTGATGCTAAAGATT	Novo
s99	TAATGATGAAATCGATGAAATGTGGCGCTATG	Novo
s100	TAATTATAATCGCAATAGCTTCAATACTCCTA	Descrito como CRISPR
s101	TACAGCAATAACGACCAAACCGATATAGGTAA	Novo
s102	TACCAAACCAATCAGCAATGGAAAAACCACCG	Descrito como CRISPR
s103	TAGACCTCGCTAACCTTGAGCTTAATAAGCCC	Novo
s104	TATAAAACGCGCAAAAAAATATAAGGGACGTA	Novo
s105	TATAAGAAAAATGCAAAAAAGGCATTTATTAG	Descrito como CRISPR
s106	TATTTAGAAAGCTTGGAATAAAGGTGACTG	Descrito como CRISPR
s107	TCAAAACGTATGGGTTATTGATGCTCAAGATT	Descrito como CRISPR
s108	TCAAATCTAAGCCATGCTCATTAGGCATAGGT	Novo
s109	TCAGGTAATAAAAAACCGCCCGAAGGCGGTAT	Descrito como CRISPR
s110	TCCATTCTCGCTAAGTGGCATCACACGCGATG	Novo
s111	TCGCAGCTTCAAGCACACCTTCTTGATGAGCA	Novo
s112	TCGTTGCTACGCGCCACGGCGCACCCATCGTT	Descrito como CRISPR

s113	TCTTGTTATTTCTGGTAATAAATATCAGAACA	Novo
s114	TGAAGACACTCCTTTATGACACTACGTTACAT	Novo
s115	TGATGATTGGATAGAGATTCATGCGTTAGATT	Novo
s116	TGATGCGGGTTGTCCACCAGTTATGACTACTT	Novo
s117	TGCATCGAAGTCATAGAACGCTTTGAGTTTCCA	Descrito como CRISPR
s118	TGCATTAAGACGAATGCGGGCAATTGGTAATG	Novo
s119	TGGAAGTCATGAATGTAGGTGTTGAGGATGGC	Descrito como CRISPR
s120	TGGCATTAGCAGCCTATGGCGGTTATTCATAC	Novo
s121	TGGTGTTTTAATTTCTCGTTTAGCAGCCATGA	Novo
s122	TGTAAAAAGTTTAATAATTTTTTCAGTGAAT	Novo
s123	TGTGACTGTGGAGAGTTACCACCGCTAAATTC	Novo
s124	TGTGCCCATTCCCGCAAACACGGCGCAACGCT	Descrito como CRISPR
s125	TGTTGAAGCAATCACCATTTCCCTCCGTATTT	Novo
s126	TGTTGTGGATCGCAATGGCAATCAACTCATGT	Descrito como CRISPR
s127	TTAAACTGATTTACAAGCTTGATCAGTAGGCC	Descrito como CRISPR
s128	TTAACTTGCTTACGGCCAACACCTGTAATCAA	Descrito como CRISPR
s129	TTACACATGAAGTCAGCAAATGCCACCATGTT	Novo
s130	TTACCAGATAGCAACTCTCTAGGTCAGATAGAC	Descrito como CRISPR
s131	TTAGTCGCATTAGCGCAAAAGCTACGTGGATT	Novo
s132	TTATAGATGGCTTTAACTGACTCCCAGCCCAT	Novo
s133	TTCAATGTGTTTAAGATCGGGTCAAAAGCTAC	Novo
s134	TTCCTCAACTGACATTTCCAAATAGTAGAGGC	Descrito como CRISPR
s135	TTGCTGGTTTGCTTCACAATTACACGCTCAG	Novo
s136	TTCTGCCATTTCAAATAGCGCTGACACTGTCA	Descrito como CRISPR
s137	TTGAATCGGCCGCTTTGCGTATAAACACCACC	Descrito como CRISPR
s138	TTGCTGCCTGCAAACCTGTTTGGGGCTTTATG	Novo
s139	TTGGTTGTTTAGTAAGTTCAAAGCCCGTTGTA	Novo
s140	TTGTAACAACCTTAATGGAGAAGCCTTAATCT	Novo
s141	TTGTTGCAACACCGCCACCGCTGTGCCTTTTG	Novo

s142	TTGTTTCAGTTGCATAGTCAAACGATGAGAAC	Novo
s143	TTTAAAGCTAAATGAGGGTTAAACCTAAGAAA	Descrito como CRISPR
s144	TTTAACCGTGATCAAGAGGTGTAGCTTGGGC	Novo
s145	TTTAAGGATGCAATGCAAAAGACTAGCGGGGC	Novo
s146	TTTCGAACGTAAC TACGATAAAGACAAGACTC	Novo
s147	TTTGCCGATGCGTGCAAACATTTGCTCCGCTTC	Descrito como CRISPR
s148	TTTGCGCTCTTGCGGTTATTATCAAAGACCTC	Novo
s149	TTTGGAACCAAGTCGCCCTATGCGACCTGATA	Novo
s150	TTTGTGCCTCAATATGATTTCAAATATGGTTT	Novo