

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Keyla Vitória Marques Xavier

Análise genômica dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comportando o Sistema CRISPR/Cas

**Recife
2021**

Keyla Vitória Marques Xavier

Análise genômica dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comportando o sistema CRISPR/Cas

Defesa de Mestrado 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.

Orientador: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientadores: Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz

Dr. Wilson José da Silva Junior

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Xavier, Keyla Vitória Marques

Análise genômica dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comportando o Sistema CRISPR/Cas / Keyla Vitória Marques Xavier – 2021.

80 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientadores: Ana Carolina de Oliveira Luz e Wilson José da Silva Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Genética 2. Bactérias gran-negativas 3. Infecção hospitalar I. Balbino, Tereza Cristina Leal (orient.). II. Luz, Ana Carolina de Oliveira (coorient.) III. Silva Junior, Wilson José (coorient.) IV. Título

576.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-298

KEYLA VITÓRIA MARQUES XAVIER

**ANÁLISE GENÔMICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE PSEUDOMONAS
AERUGINOSA COMPORTANDO O SISTEMA CRISPR/CAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Recife, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovado em: 30/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Tereza Cristina Leal Balbino (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof^º. Dr. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr^ª. Isabelle Freire Tabosa Viana (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof^º. Dr. Saulo Relison Titino (Examinador Externo)
Universidade Estadual do Cariri

Dedico este trabalho a todos os profissionais de linha de frente no enfrentamento contra a COVID-19. Sem a ciência, seria tudo mais difícil.

Agradecimentos

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, que permitiram a realização deste trabalho através da concessão de bolsa e auxílios financeiros.

Agradeço à minha orientadora e aos meus coorientadores por todo o aprendizado, paciência e determinação em cada detalhe. Sou grata em tê-los na minha vida profissional. Em especial, quero agradecer a minha orientadora pelo acolhimento desde o primeiro dia. Toda sua dedicação, inteligência, delicadeza e principalmente, o ser humano que você é, me fizeram e fazem te ter como inspiração profissional e pessoal. Não posso deixar de agradecer com muito carinho, minha coorientadora. Te agradeço por ter pegado em minha mão e me permitido crescer. Você é incrível!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética por todo apoio e serviço prestado.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM), pela infraestrutura para realização do projeto e serviços prestados.

Agradeço ao Prof. Dr. Valdir e demais integrantes do LABBE, pela parceria, pela amizade e serviços prestados.

Agradeço a Deus por todos os milagres e companhia. Agradeço a minha família e esposo, por se manterem perto de mim em todos os momentos, mesmo há 800 km de distância. Vocês são minha base e minha força.

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista capaz de infectar pacientes queimados ou imunocomprometidos em hospitais e ambientes de assistência à saúde. Uma das principais causas de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* é devido a sua resistência intrínseca aos antimicrobianos e produção de biofilme. O sistema CRISPR/Cas é definido como um mecanismo de defesa de procariotos contra elementos genéticos móveis (MGEs), composto por um loco CRISPR, formado por sequências repetitivas intercaladas por espaçadores e genes cas. O trabalho teve como objetivo uma análise de isolados de *P. aeruginosa* comportando o sistema CRISPR/Cas. Dos 12 isolados analisados, 83% abrigam o sistema tipo I-F e 17% o sistema tipo I-E. Os espaçadores encontrados para o tipo I-F correspondem a sequências de bacteriófagos e plasmídeos. Foram observados 282 espaçadores nos isolados, onde 149 sequências foram relatadas pela primeira vez. A presença de genes anti-CRISPR e profagos inseridos nos genomas desses isolados, sugere uma pressão seletiva entre fagos e bactérias. A presença dos STs compartilhados entre setores e entre hospitais permitiu traçar uma rota de disseminação desses isolados. Entretanto, a aplicação do loco CRISPR como uma ferramenta molecular para tipagem, se mostrou ineficaz em *P. aeruginosa*. Os resultados fornecem informações sobre a genética básica estrutural do loco CRISPR, relata a diversidade dos MGEs predatórios de *P. aeruginosa*, o que vem a contribuir com a geração de conhecimentos sobre o sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Elementos Genéticos Móveis; MLST; Genes anti-CRISPR.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen able to infect burn or immunocompromised patients in hospitals and healthcare settings. One of the main causes of hospital infections caused by *P. aeruginosa* is due an intrinsic resistance to antimicrobials and biofilm production. The CRISPR/Cas system is defined as a defense mechanism of prokaryotes against mobile genetic elements (MGEs), composed of a CRISPR locus, formed by repetitive sequences interspersed by spacers and *cas* genes. The aim of this work was to analyze *P. aeruginosa* isolates carrying the CRISPR/Cas system. Of the 12 isolates analyzed, 83% harbor the type I-F system and 17% the type I-E system. The spacers found for type I-F correspond to bacteriophage and plasmid sequences. 282 spacers were observed in the isolates, where 149 sequences were reported for the first time. The presence of anti-CRISPR genes and prophages inserted in the genomes of these isolates suggests a selective pressure between phages and bacteria. The presence of STs shared between sectors and between hospitals allowed to trace a route for the dissemination of these isolates. However, the application of the CRISPR locus as a molecular tool for typing was ineffective in *P. aeruginosa*. The results provide information about the basic structural genetics of the CRISPR locus, in addition to reporting, the diversity of predatory *P. aeruginosa* MGEs, which contributes to the generation of knowledge about the CRISPR/Cas system in *P. aeruginosa*.

Key words: Mobile genetic elements (MGEs); MLST; Anti-CRISPR genes.

Lista de Figuras

Figura 1 - Série de eventos da transmissão de <i>P. aeruginosa</i> entre os pacientes.	18
Figura 2 - Organização estrutural geral do Sistema de defesa CRISPR/Cas.	21
Figura 3 - Organização do Sistema CRISPR/Cas.	23
Figura 4 – Pareamento de bases entre espaçador e sua molécula alvo.	25
Figura 5 – Mecanismo Geral de ação do Sistema CRISPR/Cas.	26
Figura 6 - Classificação do Sistema CRISPR/Cas	29
Figura 7- Esquema representativo do complexo CASCADE em <i>E.coli</i> .	31
Figura 8- Associação entre genes <i>aca</i> e <i>acr</i> .	35
Figura 9- Mecanismo de ação geral de genes anti-CRISPR.	36
Figura 10- Contexto genético do Sistema CRISPR/Cas em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	38
Figura 11- Esquematização do sistema CRISPR/cas I-F	38
Figura 12- Esquema utilizado para a tipagem molecular através da análise do loco CRISPR	41
Figura 13- Tipos de sistema CRISPR/Cas e estrutura encontrados nos genomas estudados	50
Figura 14- Contexto genético do sistema CRISPR/Cas encontrados nos genomas estudados	51
Figura 15- Relação entre as sequências espaçadoras e seus possíveis alvos.	53
Figura 16 - Relação entre as 149 sequências espaçadoras nunca antes observadas e seus possíveis alvos.	57
Figura 17- Mapa epidemiológico baseado na tipagem CRISPR para as cepas isoladas no Hospital 1.	65

Figura 18- Mapa epidemiológico baseado na tipagem CRISPR para as 66 cepas isoladas no Hospital 2.

Lista de Tabelas

Tabela 1- Informações sobre os isolados do presente estudo.	44
Tabela 2- Tipos de CRISPR/Cas dos isolados brasileiros de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudados.	49
Tabela 3- Panorama dos novos espaçadores identificados no presente estudo.	53
Tabela 4- Profagos inseridos nos genomas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	58
Tabela 5- Investigação dos genes anti-CRISPR em isolados de <i>P. aeruginosa</i> .	59
Tabela 6- Caracterização genética dos isolados brasileiros de <i>P. aeruginosa</i> .	60
Tabela 7- Isolados clínicos brasileiros de <i>P. aeruginosa</i> caracterizados pela técnica de MLST.	61
Tabela 8-. Caracterização genética dos isolados brasileiros de <i>P. aeruginosa</i> utilizados na análise epidemiológica com base na tipagem molecular CRISPR.	62
Tabela 9- Comparação dos alelos gênicos avaliados no esquema de MLST para <i>P. aeruginosa</i> dos ST 244, 360,620 2234, pertencentes ao grupo E.	63
Tabela 10- Comparação dos alelos gênicos avaliados no esquema de MLST para <i>P. aeruginosa</i> dos ST 3137 e 3078, pertencentes ao grupo A.	64
Tabela 11- Comparação do número de variações entre alelos gênicos dos STs do Grupo E.	64
Tabela 12- Comparação do número de variações entre alelos gênicos dos STs do Grupo A.	64

Lista de Abreviaturas

<i>aca</i>	Genes adjacentes a genes anti-CRISPR
<i>acr</i>	Genes anti-CRISPR
<i>Aip</i>	Fosfatase alcalina
<i>cas</i>	Genes associados ao CRISPR (<i>CRISPR associated genes</i>)
CASCADE	Complexo de defesa antiviral associado ao CRISPR (<i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>)
CRISPR	Repetições Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNA	RNA-CRISPR
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Repetição direta
MGE	Elementos genéticos móveis (<i>Mobile Genetic Elements</i>)
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares (<i>Extracellular polymeric substances</i>)
HTH	Motivo hélice-volta-hélice (<i>Helix-turn-helix</i>)
Mb	Megabase
MDR	Resistência a múltiplas drogas (<i>Multiple drug resistance</i>)
MLST	Tipagem de sequências multilocos (<i>Multilocus sequence typing</i>)
MLVA	Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (<i>Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis</i>)
OprD	Porina de membrana externa (<i>D Outer membrane porin</i>)
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
pb	Pares de base

PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>)
Pré-crRNA	Precursor de RNA CRISPR
RFLP	Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
ST	Sequência Tipo (<i>Sequence Type</i>)
UTIs	Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 O GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i>	16
2.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	17
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	19
2.4 SISTEMA CRISPR/CAS	21
2.4.1 Mecanismo geral do sistema CRISPR/Cas	24
2.4.2 Classificação do sistema CRISPR/CAS	27
2.5 BACTERIÓFAGOS	32
2.6 GENES ANTI-CRISPR	33
2.7 SISTEMA CRISPR/CAS EM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	37
2.8 LOCO CRISPR COMO FERRAMENTA DE GENOTIPAGEM	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	44
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	44
4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS	45
4.3.1 Montagem e anotação dos genomas	45
4.4 PESQUISA DO SISTEMA CRISPR/CAS	45
4.5 ANÁLISE DOS ESPAÇADORES	46
4.6 INVESTIGAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E GENES ANTI-CRISPR	46

4.7 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS.....	47
4.8 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 PESQUISA DO SISTEMA CRISPR/CAS	49
5.2 ANÁLISE DOS ESPAÇADORES	52
5.3 BACTERIÓFAGOS E ANTI-CRISPR INTEGRADOS NO GENOMA	57
5.4 MLST.....	59
5.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	60
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	78
APÊNDICE 1.....	78
APÊNDICE 2.....	78
ANEXOS	79
ANEXO 1.....	79

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa são bacilos Gram-negativos com versatilidade nutricional bem expressiva, que os permitem colonizar nichos ecológicos diversos, sejam eles terrestres ou aquáticos. Esta bactéria é considerada uma das principais causadoras de infecções hospitalares, acometendo pacientes debilitados imunologicamente. Características de *P. aeruginosa*, como a presença comum de resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos e sua habilidade na produção de biofilme, dificultam e limitam o tratamento de pacientes através dos métodos terapêuticos disponíveis.

Devido ao aumento da resistência aos antibióticos, a necessidade de abordagens terapêuticas alternativas se faz de suma importância, a exemplo da terapia fágica (fagoterapia). A fagoterapia se baseia na administração de fagos específicos contra bactérias patogênicas, agindo diretamente no alvo, com baixa toxicidade ao paciente. Deste modo, conhecer e inferir como as bactérias se relacionam e respondem à invasão celular por bacteriófagos é uma informação crucial na seleção dos fagos de escolha.

O sistema CRISPR/Cas é uma maquinaria de defesa de bactérias e arqueias contra elementos genéticos móveis (MGEs), como plasmídeos, transposons e principalmente, bacteriófagos. Este sistema é composto pelo loco CRISPR (Repetições Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas ou *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), uma estrutura genética semi-repetitiva composta por Repetições Diretas, intercaladas por Espaçadores, sendo estes provenientes de sequências de fagos e MGEs; e pelos genes *cas* (*CRISPR-associated*), os quais codificam proteínas com funções diversas.

Através das inserções dos espaçadores dentro do genoma da bactéria, de forma cronológica, juntamente com a variabilidade desse conteúdo espaçador no loco CRISPR, o sistema CRISPR/Cas em bactérias tem sido utilizado como ferramenta para conhecer a história evolutiva destes microrganismos e, como eles interagem e co-evoluem junto aos bacteriófagos. Além disso, diante da variabilidade de espaçadores no loco CRISPR e sua organização, o estudo desse loco tem se mostrado relevante para análises filogenéticas, tipagem molecular, estudos de modulação da resistência à fagos, e controle da disseminação de MGEs.

O sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* ainda é pouco explorado e carece de informações relacionadas a sua estrutura e organização nesse patógeno. Assim, uma descrição estrutural desse sistema na aquisição dos MGEs, trará informações promissoras para estudos epidemiológicos e informações voltadas ao controle de disseminação de patógenos, tornando o sistema CRISPR/Cas um futuro aliado da saúde pública.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O GÊNERO *PSEUDOMONAS*

O gênero *Pseudomonas* foi descrito em 1984 (Migula,1984) baseado em características morfológicas, agrupando bacilos Gram-negativos, não esporulados, aeróbicos restritos, móveis, com apenas um flagelo polar. Tal definição causou uma sobrecarga de classificações errôneas, tendo cerca de 800 espécies dentro do gênero, em 1990 (Andreani & Fasolato, 2017).

Para solucionar esse problema, foram incluídas características genotípicas, através da composição nucleotídica do DNA, hibridização DNA-DNA e posteriormente, a utilização de critérios genotípicos, baseados em RNAs ribossomais. A partir da década de 90, o uso do RNA ribossomal (rRNA) 16S foi de grande importância para a reclassificação e identificação de novas espécies, o que permitiu com que a técnica se tornasse promissora dentro da microbiologia (Peix et al., 2009).

Atualmente, vários parâmetros são utilizados na classificação do gênero *Pseudomonas*, que incluem desde caracteres morfológicos, estrutura celular, pigmentação, aspectos metabólicos, patogenicidade, resistência a antibióticos, além de análises de cunho genético e ecológicos (Peix et al.,2009).

O gênero *Pseudomonas* se destaca por apresentar processos fisiológicos bastante expressivos que permitiram sua colonização em ambientes diversificados, abrangendo habitats terrestres e aquáticos, bem como o desenvolvimento de doenças em plantas e animais. A fim de entender melhor o gênero, estudos moleculares foram realizados para a identificação das características de cepas, como as de *P. aeruginosa* e *P. syringae*, que se mostraram de grande interesse médico e fitossanitário, respectivamente (Silby et al., 2011).

2.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A primeira espécie que teve seu genoma sequenciado dentro do gênero foi a cepa de *P. aeruginosa* PAO1, por Stover e colaboradores em 2000. Sabe-se que, convencionalmente, o genoma de *P. aeruginosa* varia de 5,5 a 7 megapares de base (Mb), com uma alta porcentagem de conteúdo CG (65-76%) com cerca de 4000 genes presentes na maioria das cepas dessa espécie. No entanto, acredita-se que haja uma variedade de 10.000 a 40.000 genes adicionais, o que implica afirmar que seus genes centrais são pouco conservados, além das possíveis recombinações exógenas, que aumenta ainda mais essa variabilidade (Van Belkun et al., 2015; Parkins; Somayaji; Waters, 2018).

Pseudomonas aeruginosa se comporta como um patógeno oportunista, infectando pacientes queimados ou imunocomprometidos em hospitais e ambientes de assistência à saúde, podendo causar quadros clínicos como pneumonia, infecções gastrointestinais, dermatite e demais infecções de pele, infecções do trato urinário, bacteremia, entre outros. O sucesso de *P. aeruginosa* nestes casos deve-se, em especial, à sua resistência intrínseca contra antimicrobianos, à sua ampla habilidade em adquirir novos determinantes de resistência e, ao fato de ser uma excelente produtora de biofilme (Turner et al., 2014; Moradali; Ghods; Rehm, 2017).

Por ser uma bactéria associada a infecções hospitalares, o Consórcio Internacional de Controle de Infecção Hospitalar (INICC) a considera como um fator de risco à saúde pública, pois são microrganismos altamente resistentes aos antibióticos e aos meios de esterilização utilizados nos equipamentos hospitalares, a exemplo de jalecos, estetoscópios, termômetros, sondas de ultrassom, além de sobreviver em superfícies inorgânicas, como ventiladores, e assim, ser transmitida

de paciente para paciente, envolvendo setores desde a enfermaria até as unidades de terapia intensiva (UTIs) (figura 1) (Abreu et al., 2014; Rosenthal et al., 2016).

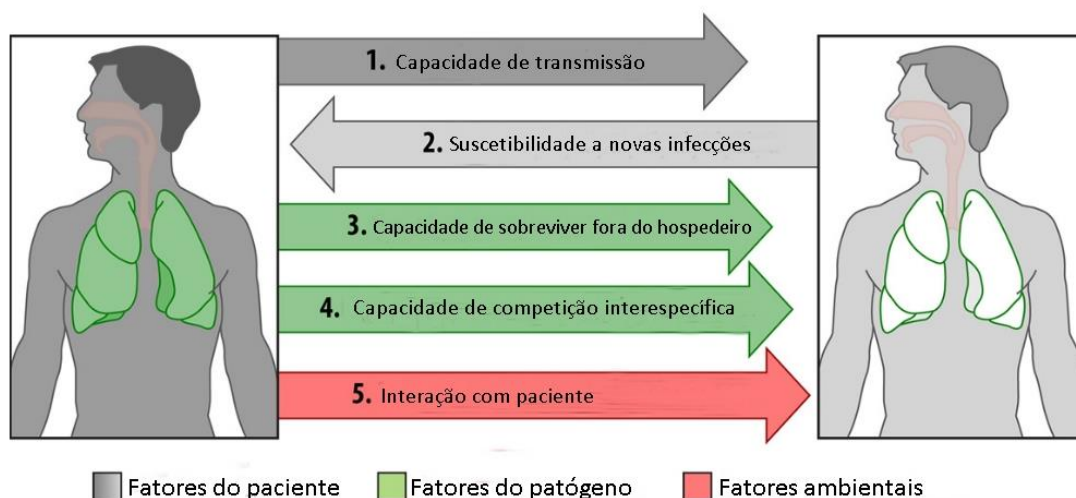


Figura 1. Diferentes mecanismos de transmissão de *P. aeruginosa* entre os pacientes. 1. Os fatores do paciente se iniciam a partir de um paciente infectado, transmitindo o patógeno a um paciente susceptível, por meio das vias aéreas. Os fatores do patógeno estão relacionados a sua capacidade de sobrevivência em situações críticas, bem como a capacidade de competir com outras espécies ali já instaladas. Os fatores ambientais atuam na dispersão dessas cepas, com enfoque voltado à infraestrutura hospitalar e uso de Equipamentos de Proteção Individual. Fonte: Adaptado de Parkins; Somayaji; Waters (2018).

Diante do panorama mundial de resistência antimicrobiana por bactérias de interesse médico, a Organização Mundial de Saúde, em 2017, divulgou uma lista sobre os principais patógenos resistentes a múltiplos antibióticos, tendo como alvo, as necessidades da saúde pública e desenvolvimento de novos tratamentos. *P. aeruginosa*, juntamente com *Acinetobacter baumannii* e bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae foram categorizadas como Prioridade 1, em situação Crítica para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e terapias alternativas (OMS, 2017).

Uma vez estabelecida essa preocupação com a crescente resistência aos antibióticos, terapias alternativas vem sendo desenvolvidas sob diversas vertentes,

através do uso de anticorpos, com base na neutralização da virulência do patógeno; vacinas, por meio da resposta imune adquirida do organismo (Rello; Parisella; Perez, 2019); uso de probióticos, estabelecendo um sistema de competição com bactérias patogênicas; uso de prebióticos para o fortalecimento do sistema imune; fitoterapias, com o uso do extrato de plantas medicinais e óleos essenciais, que apresentam atividades antimicrobianas (Vítor & Vale, 2011); e a fagoterapia (*phage therapy*) que é a utilização de bacteriófagos específicos para o tratamento de infecções, cuja vantagem é atribuída a sua especificidade contra bactérias alvo (menor probabilidade de destruir a microbiota normal), sua aparente baixa toxicidade às células humanas e sua capacidade de penetrar a matriz polimérica do biofilme, melhor do que a de antimicrobianos (Debarbieux et al., 2010; Khalifa et al., 2016; Kakasis & Panitsa, 2019) .

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O sucesso como patógeno de *P. aeruginosa* está bastante relacionado ao que se é chamado de *quorum sensing* (detecção de quórum), um sistema de sinais químicos, relacionado à densidade populacional do microrganismo, em um determinado meio que, ao atingir uma densidade expressiva (limiar), são capazes de desencadear funções celulares bacterianas (Barr et al., 2015).

Alguns dos primeiros mecanismos desencadeados pelo *quórum sensing* são alterações na expressão de genes relacionados à produção de moléculas fundamentais na virulência, motilidade, desenvolvimento de biofilme, mecanismos de resistência a antibióticos e adaptação das vias metabólicas (Barr et al., 2015).

Quando iniciada a fase aguda da infecção, *P. aeruginosa* pode perder seu flagelo e posteriormente, na fase crônica fixar em superfícies, gerando um agregado de células revestidas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS).

Esta estrutura formada por células bacterianas imersas em EPS é comumente chamada de biofilme, e protege essas colônias do meio em questão (Moradali; Ghods; Rehm, 2017).

Os mecanismos de resistência desenvolvidos de forma intrínseca ocorrem por meio da expressão de genes bacterianos, cujos produtos atuam contra substância tóxicas presentes em antibióticos. Em *P. aeruginosa*, foi observado a redução e substituição de proteínas porinas não específicas por canais específicos, com a capacidade de concentrar apenas os nutrientes indispensáveis, evitando, assim, a absorção desses compostos antimicrobianos (Moradali; Ghods; Rehm, 2017).

Os mecanismos moleculares que atuam diretamente na resistência das cepas são diversos e são diferentes para cada classe de antibióticos, causando uma grande preocupação ao sistema de saúde mundial. A exemplo dos carbapênemicos, algumas cepas apresentam uma mutação na porina OprD, que impede a entrada da substância na célula bacteriana (Moradali; Ghods; Rehm, 2017).

Além disso, já foi reportado que, alterações de genes responsáveis pelo funcionamento das bombas de efluxos, intituladas bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR), são capazes de interagir com diversas classes de antimicrobianos, levando ao surgimento de cepas potencialmente resistentes de forma não específica (Blair et al., 2014).

Mecanismos cruciais no desenvolvimento de resistência contra os antimicrobianos estão também relacionados à transferência horizontal de genes, que são aqueles advindos de elementos genéticos móveis (MGEs), tais como plasmídeos, que podem ser transferidos de uma célula bacteriana para outra,

principalmente por conjugação. Esses genes adquiridos participam diretamente na evolução bacteriana, pois é observado a transferência de genes de virulência e de resistência aos antibióticos e metais, sendo um dos principais responsáveis pelo sucesso patogênico de bactérias.

2.4 SISTEMA CRISPR/CAS

O CRISPR (Repetições Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas ou *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é uma estrutura genética que apresenta uma organização baseada em sequências palindrômicas, intercaladas por sequências espaçadoras (Figura 2). A primeira observação de um loco CRISPR ocorreu próxima a uma região intergênica da fosfatase alcalina (*iap*) da cepa de *Escherichia coli* K12, em 1987 (Ishino et al., 1987).

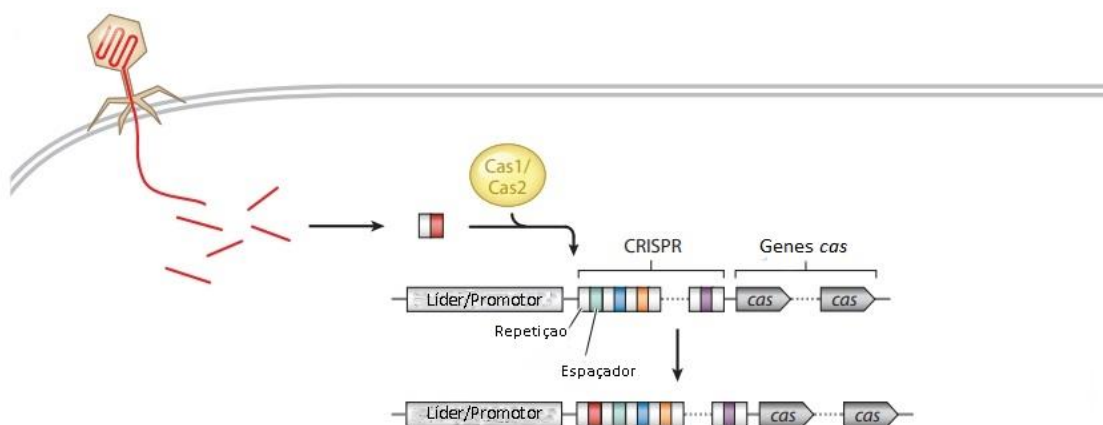


Figura 2. Organização estrutural geral do Sistema de defesa CRISPR/Cas. Fonte: Adaptado de Jiang e Marrafini (2015).

Posteriormente, foi identificado um conjunto de genes próximo a essa região, denominado de genes *cas* (*genes associados ao CRISPR*), que codificam um grande número de proteínas, as quais podem ser agrupadas de acordo com sua

função exercida, como as nucleases/recombinases, que atuam na aquisição de novos espaçadores, como a Cas1; Ribonucleases, necessárias para o processamento de RNAs (Cas6); Proteínas ligantes de RNA, que compõem parte dos complexos efetores (Cas7), e por fim, nucleases responsáveis pela degradação do material alvo - Cas3 (Van Der Oost et al., 2014).

Em 2005, o conhecimento sobre as estruturas que compõe o sistema CRISPR/Cas, propiciou o entendimento sobre sua possível função biológica, por meio de análises computacionais das sequências espaçadoras, onde foi observado que essas sequências apresentavam homologias a plasmídeos e bacteriófagos. Bactérias que possuíam sequências espaçadores homólogas a essas sequências de MGEs estavam protegidas contra a invasão destes (Bolotin et al., 2005; barrangou; Horvath, 2012).

Com bases nesses resultados, o sistema CRISPR/Cas foi definido como uma maquinaria adaptativa de defesa presente em bactérias e arqueias, que atua na proteção contra MGEs, principalmente vírus predatórios de procariotos (Koonin; Makarova; Zhang, 2017a).

Apesar de não apresentar nenhuma homologia com outros sistemas de imunidade adquirida, como os RNAs de interferências (RNAi), é possível observar analogias entre os mecanismos de ação do sistema CRISPR/Cas e nos demais sistemas de eucarióticos baseados em RNA, como, por exemplo, a presença de helicase-nuclease e polimerases específicas de RNA, além de um complexo efetor de proteínas envolvidas em ambos. Não obstante dos mecanismos terem evoluído independentemente, suas semelhanças despertam o interesse na busca de homologias e indícios de uma evolução em comum (Makarova et al., 2006; bhaya; Davison; Barrangou, 2011).

A estruturação genética do sistema é dada pela presença de uma sequência líder, que inclui um promotor, sequências repetidas, as quais são intercaladas por sequências espaçadoras, advindas de origem extracromossômica, além da associação de proteínas Cas (Richter; Chang; Fineran, 2012).

A junção das sequências repetitivas e espaçadores é chamada de matriz CRISPR. As sequências repetitivas, também chamadas de repetições diretas (DR), seguem um padrão de comprimento, variando entre 23-47 pb, e apresentam regiões degeneradas, que marcam o fim do loco, ou seja, representam a DR mais antiga. Os protoespaçadores incorporados no genoma bacteriano dão origem aos espaçadores, que apresentarão um comprimento similar ao da sequência repetitiva da matriz, apesar de já ter sido descrito um espaçador de 72 pb na espécie *Methanopyrus kandleri* (Grissa; Vergnaud; Pourcel, 2007; Richter; Chang; Fineran, 2012).

A sequência Líder é uma região rica em AT, localizada à montante da matriz (Figura 3), com um comprimento que varia entre 200-500 pb. Esta região atua como promotor do loco CRISPR, além de guiar a incorporação de novos espaçadores (Richter; Chang; Fineran, 2012; Yosef et al., 2012).



Figura 3: Organização do Sistema CRISPR/Cas. Fonte: adaptado de Barrangou & Marraffini (2014).

Os genes cas codificam os efetores enzimáticos na defesa adaptativa desses procariotos. Suas proteínas estão englobadas em quatro domínios que apresentam atividades de nucleases, polimerases, helicases e ligantes de ácidos nucleicos. Ao total, existem seis tipos de sistema CRISPR/Cas e a distinção entre eles, tem como base, a presença de Cas assinaturas, a exemplo das Cas3, Cas9

e Cas10, pertencentes aos tipos I,II e III, respectivamente, e outras Cas acessórias que variam a depender do tipo de sistema. (Burmistrz & Pyrc, 2015).

2.4.1 Mecanismo geral do sistema CRISPR/Cas

O mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas consiste em dois grupos principais, onde o primeiro reúne genes que codificam proteínas fundamentais para a obtenção dos espaçadores (fase de adaptação), como as endonucleases Cas1 e a Cas2, que são proteínas encontradas em quase todos os sistemas. O segundo grupo reúne um arsenal de diversas proteínas Cas, que serão recrutadas a depender do tipo de sistema CRISPR/Cas em questão. Essas proteínas atuam no processamento de um precursor de RNA CRISPR (pré-CRISPR) (fase de biogênese do crRNA), e no reconhecimento e clivagem da molécula invasora (fase de interferência) (Koonin; Makarova; Zhang, 2017).

Dessa forma, o mecanismo de imunidade contra os MGEs ocorre em três fases: Adaptação ou Aquisição; Biogênese do crRNA; e Ação contra o invasor ou Interferência. A adaptação ocorre quando a bactéria é infectada por um MGE. Nesse momento, o DNA do patógeno é clivado em vários fragmentos de aproximadamente 30 pb cada, inicialmente por um mecanismo intrínseco da própria célula, pelo sistema de restrição modificação (R-M) , e posteriormente, pela ação da Cas1, na maioria dos tipos de sistema. Esses fragmentos serão incorporados ao loco CRISPR na forma de um novo espaçador, próximo à sequência líder (Makarova et al., 2011b).

A fim de evitar a autoimunidade, o sistema CRISPR/Cas possui mecanismos para reconhecer e diferenciar um material exógeno do seu próprio, através de um motivo de sequência curta (de 2 a 5 nucleotídeos) chamada PAM (Motivo adjacente

ao protoespaçador ou *Protospacer Adjacent Motif*) localizado adjacente ao protoespaçador (Figura 4) (Sashital; Wiedenheft; Doudna, 2012). Através do reconhecimento de uma PAM, um dos fragmentos obtidos pela clivagem do MGE pode ser reconhecido como protoespaçador, e, portanto, ser incorporado como um espaçador (Leenay & Beisel 2017; Gleditsch et al., 2018). A importância da PAM, não está somente voltada ao reconhecimento do protoespaçador e a incorporação ao loco CRISPR como um novo espaçador, mas também na etapa de interferência, pois permite a bactéria diferenciar sequências exógenas de seus próprios espaçadores

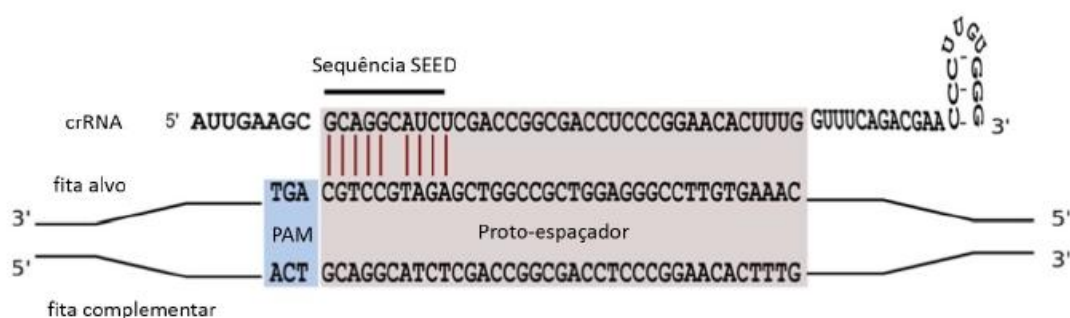


Figura 4: Pareamento de bases entre espaçador e sua molécula alvo, destacando o PAM e a sequência *seed*, regiões de importância para o reconhecimento de moléculas exógenas. Fonte: adaptado de Maier et al. 2015.

Nessa primeira etapa de interação com o DNA alvo, além da PAM, também é necessário a presença de um domínio *seed* (figura 4), que analisa perfeitamente o espaçador, levando a sua clivagem (Westra; Buckling; Fineran, 2014; Vieira et al., 2016; Leenay & Beisel, 2017).

Na segunda etapa, a biogênese do crRNA, o precursor do RNA CRISPR ou pré-crRNA é obtido através da transcrição do loco CRISPR, iniciada a partir da sequência Líder. Nessa fase, há a formação de uma molécula precursora (pré-crRNA), que ao ser clivada, gera vários pequenos fragmentos de RNA CRISPR ou

crRNAs. Assim, os novos crRNAs correspondem a espaçadores específicos, que se ligam as proteínas Cas para a formação de um complexo ribonucleoproteico efetor (crRNP) (Makarova et al., 2011; Westra; Buckling; Fineran, 2014; Burmistrz & Pyrc 2015).

Em um segundo contato com o vírus, na fase de Interferência, o complexo crRNP, atuará como um mecanismo de reconhecimento e pareamento com o DNA alvo, que permitirá o recrutamento de uma nuclease efetora guiada pelos crRNAs para a clivagem do material invasor (figura 5) (Makarova et al. 2011; Marrafini 2015; Hille & Charpentier, 2016).

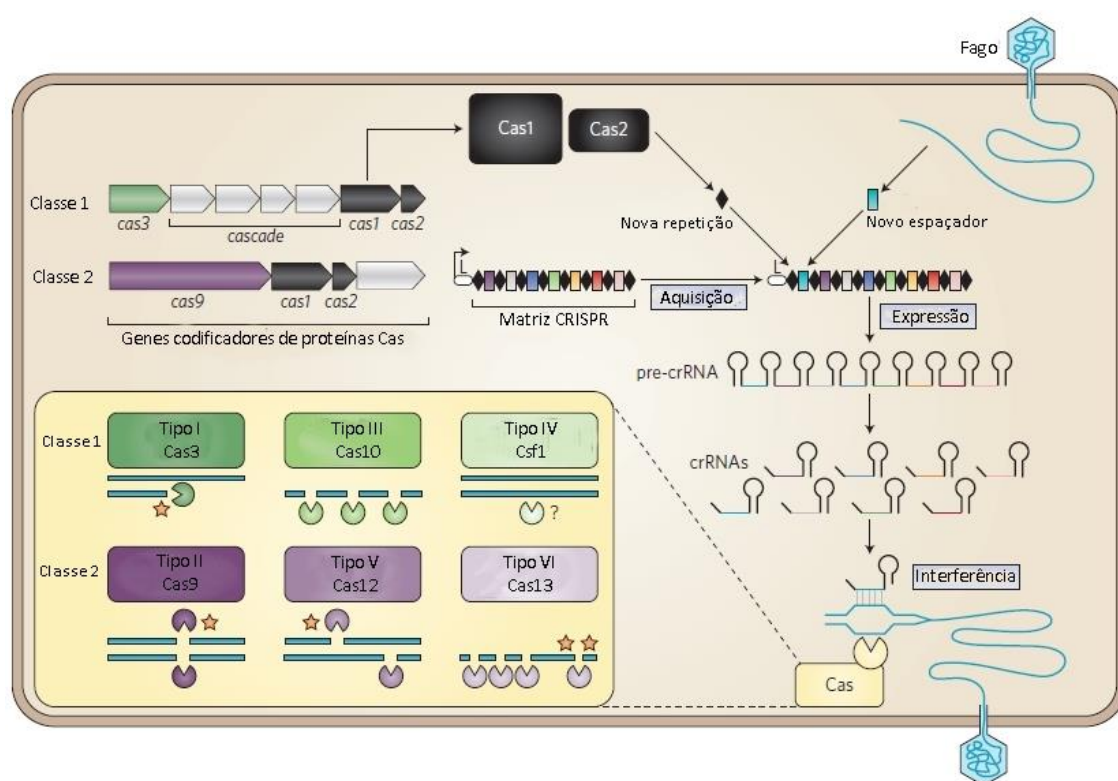


Figura 5: Mecanismo geral de ação do sistema CRISPR/Cas. A figura mostra as classes 1 e 2 e as Cas assinaturas. Os mecanismos se resumem em Aquisição, Expressão e Interferência. Fonte: Adaptado de Barrangou & Horvath (2017).

2.4.2 Classificação do sistema CRISPR/CAS

Pelo fato do sistema CRISPR/Cas estar associado a um mecanismo de defesa, existe uma forte pressão seletiva entre o sistema e os bacteriófagos, onde essa co-evolução faz alusão a uma corrida armamentista e tem como consequência, uma diversidade dos genes *cas* e reestruturações gênicas do sistema CRISPR/Cas (Koonin; Makarova; Zhang, 2017).

Diante dessa diversidade, para estabelecer uma classificação robusta, foi preciso concatenar características gênicas, estruturais e filogenéticas que, apesar do aumento de publicações voltadas ao sistema CRISPR/Cas nessa década e sua utilização como ferramenta de engenharia genética, ainda se faz necessário o entendimento da biologia do sistema, a fim de se ter uma história evolutiva fidedigna, bem como perspectivas para novas aplicações dentro do sistema (Nature Editorial, 2018).

Concernente a isso, os sistemas CRISPR/Cas se encontram em constante evolução para competir com os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos MGEs, como as proteínas anti-CRISPR. Dessa forma, há uma diversificação do repertório de genes *cas* e sua evolução, bem como na arquitetura do loco em si (Ttkeuchi et al., 2012; Bondy-Denomy et al., 2013). Isso faz com que os complexos efetores da imunidade conferida pelo CRISPR se tornem altamente variáveis e, juntamente com a rápida evolução do sistema, dificulte a elaboração de um critério classificatório. Ao contrário do que se acreditava, não existem genes *cas* universais a todos os tipos de CRISPR encontrados, o que impossibilita a classificação baseada apenas nesse critério (Koonin; Makarova; Zhang, 2017; Makarova et al., 2019).

Os critérios de classificação adotados combinam a presença dos genes *cas* assinatura (específicos de determinados tipos e subtipos), similaridade entre as sequências das proteínas Cas, a filogenia da proteína Cas1 (a mais conservada) e a organização dos genes *cas* nos locos CRISPR (Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015). A combinação dos critérios levou à divisão dos sistemas CRISPR/Cas em duas classes, caracterizadas principalmente pelos seus complexos efetores. Os sistemas pertencentes à Classe 1 são aqueles que possuem complexos efetores compostos por mais de uma proteína Cas, enquanto os sistemas da Classe 2 possuem apenas uma proteína com múltiplos domínios, que realiza a mesma função dos complexos de Classe 1 (Makarova et al., 2019).

A Classe 1 agrupa os tipos I, III e IV e cerca de 12 subtipos que podem ser distinguidos através da similaridade entre as sequências de proteínas que participam do complexo efector, da organização dos locos e das sequências de DRs. O tipo I é o mais numeroso e está distribuído em oito subtipos: A, B, C, U, D, E, F1 (anteriormente F), F2 (anteriormente variante F) e F3 (Makarova et al., 2020; Koonin et al., 2017). A Classe 2 inclui os tipos II, V e VI e 17 subtipos. É possível encontrar diversas variantes dos tipos V e VI e o tipo VI destaca-se por ser o único tipo conhecido que degrada exclusivamente RNA, até o momento (Makarova et al., 2015; Makarova et al., 2019) (Figura 6) (Koonin; Makarova; Zhang, 2017a; Makarova et al., 2015).

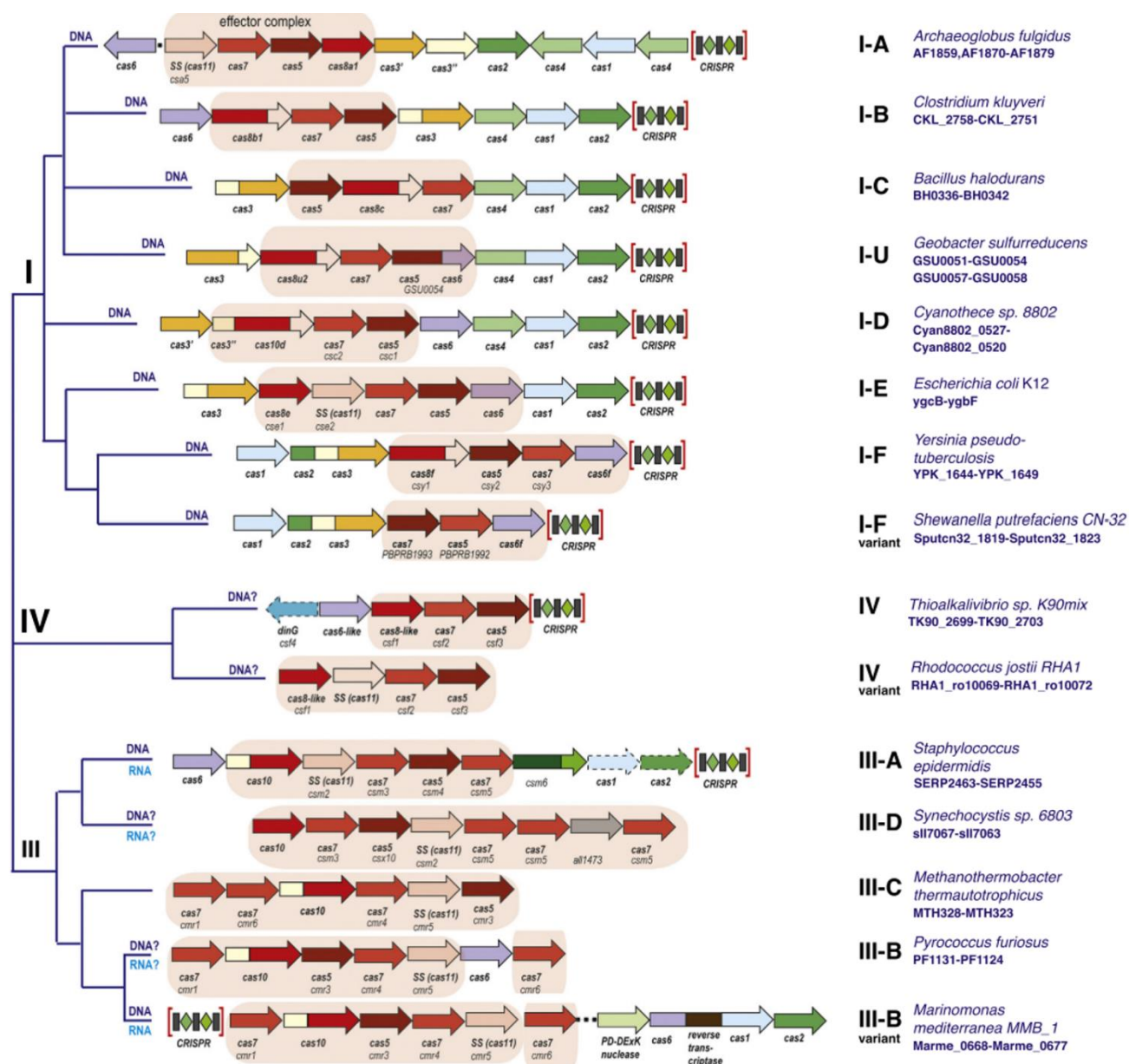


Figura 6: Classificação do Sistema CRISPR/Cas de Classe 1. Fonte: Koonin, Makarova e Zhang (2017).

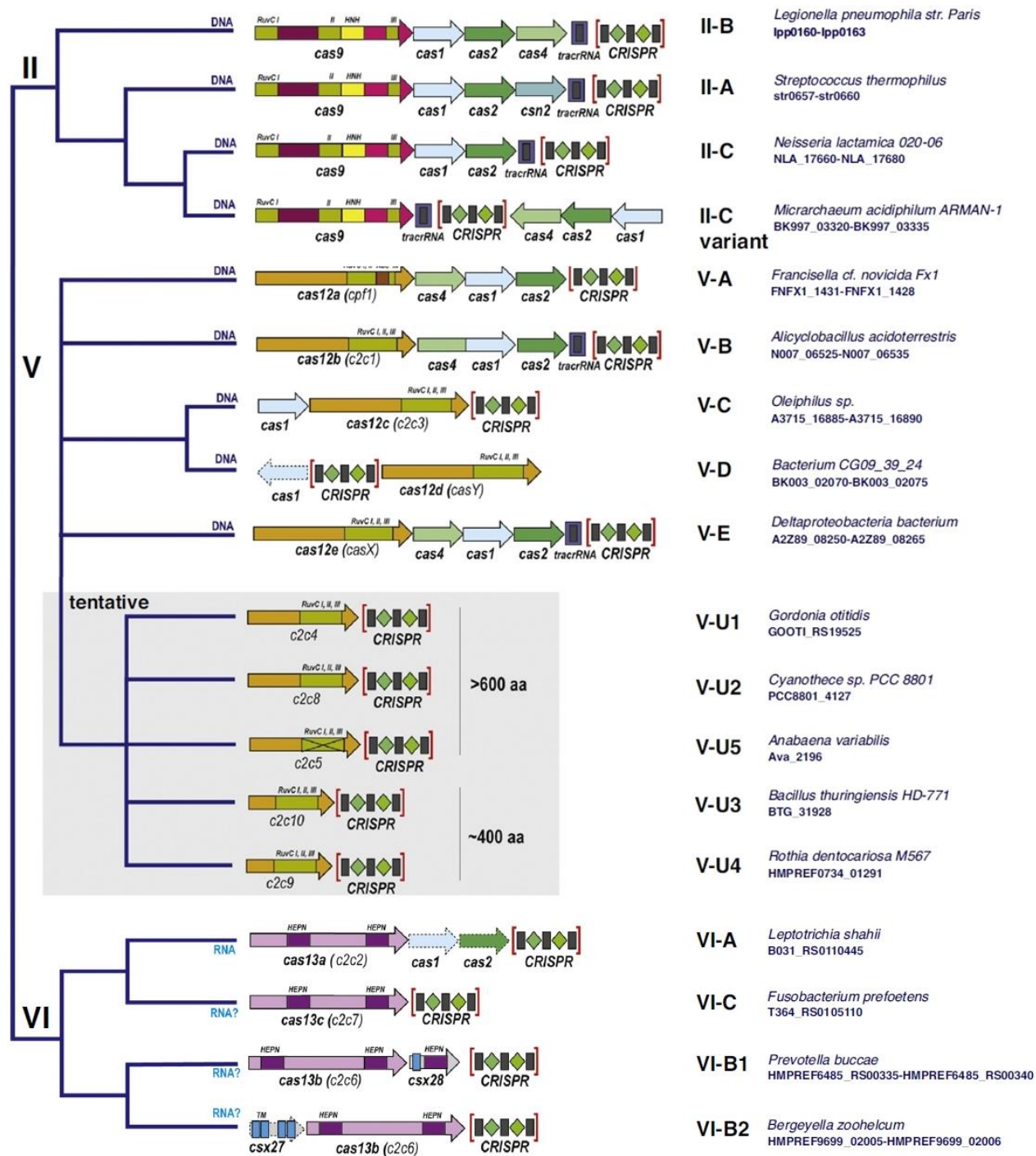


Figura 6: Continuação. Classificação do Sistema CRISPR/Cas de Classe 2 Fonte: Koonin, Makarova e Zhang (2017).

Cinco dos seis tipos do sistema CRISPR/Cas apresentam Cas1 e Cas2 como proteínas cruciais para seu mecanismo de ação. Em contrapartida, cada tipo

apresenta uma assinatura exclusiva, e consequentemente, particularidades no processo de biogênese do RNA CRISPR (crRNA) (Marraffini, 2015).

A imunidade adquirida por meio do Sistema do tipo I é mediada pela nuclease Cas 3, uma helicase com ação de ATPase. Comumente, o domínio da helicase está fusionado com um domínio de endonuclease, decisivos na fase de Interferência. Na fase de biogênese, uma ribonuclease (Cas6) cliva os pré-crRNAs em uma região conservada entre um espaçador e uma repetição direta, gerando, após a transcrição, os novos crRNAs (Charpentier et al., 2015; Stanley & Maxwell, 2018).

A ação final do mecanismo se baseia na formação de um complexo denominado CASCADE (Complexo de defesa antiviral associado ao CRISPR ou *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) (figura 7), que juntamente com os crRNAs, atuam no direcionamento da aquisição de imunidade (Makarova et al., 2011).

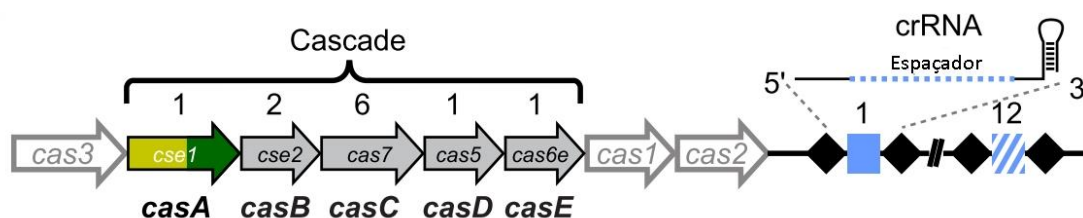


Figura 7: Esquema representativo dos genes que compõem o complexo CASCADE em *Escheria coli*. Os genes cse1-cas6e são os genes que participam do complexo. À jusante, encontra-se o loco CRISPR. Fonte: Adaptado de Sashital; Wiedenheft; Doudna (2015).

O sistema tipo II comporta a Cas 9, uma nuclease com dois domínios de nuclease (HNH e RuvC), com função efetora na biogênese do crRNA, que diferentemente do tipo I, necessita de crRNAs modificados, denominados crRNAs trans-codificados (tracrRNA) para a clivagem do DNA de bacteriófagos e plasmídeos (Deltcheva et al., 2011; Chylinski et al., 2014).

A assinatura do sistema tipo III é uma proteína com domínio de nuclease, a Cas10, que juntamente com a Cas6, uma ribonuclease, atuam principalmente na defesa antiviral de arqueias, com locos CRISPR mais complexos em relação aos das bactérias, além de apresentarem um mecanismo de reconhecimento independente de PAM (Sorek; Lawrence; Wiedenheft, 2013; Burmistrz & Pyrc, 2015; Leal-Balbino, 2016).

O sistema tipo IV não apresenta as Cas1 e Cas2, seu complexo efetor consiste em poucos genes *cas*, sendo Csf1 a proteína assinatura (Makarova et al., 2015). Devido a disposição de uma proteína denominada Cas12, próxima aos genes *cas1* e *cas2* e da matriz CRISPR, foi possível a classificação de mais um tipo de sistema CRISPR, o tipo V. A proteína Cas12 é uma nuclease, mas seu domínio proteico não é compartilhado entre outras *cas*, mas sim com genes relacionados aos transposons. Além da Cas12, a Cas4 também é encontrada em alguns locos do tipo V (Makarova et al., 2015).

Por fim, o tipo VI apresenta, como proteína efetora, a Cas13, com dois domínios de HEPN, que atuam como toxinas, além de possuir atividade de ribonuclease (RNAase) contra bacteriófagos (Mohanraju et al., 2016; Shmakov et al., 2017).

2.5 BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos são formados por um material genético e um capsídeo proteico, encontrados abundantemente em todos os ecossistemas, além de apresentarem uma morfologia e organização genômica bastante diversificada. Também conhecidos como fagos, estes são vírus que infectam apenas bactérias e apresentam especificidade à cepa bacteriana. Por apresentarem diferentes ciclos de vida, compreender suas interações com seus hospedeiros, permite inferir o

papel dessa estrutura genômica na natureza (Clokier et al., 2011; Fortier & Sekulovic, 2013).

Os fagos apresentam diferentes ciclos de vida. Fagos virulentos irão apresentar um ciclo lítico e fagos temperados, um ciclo lisogênico. O ciclo de vida lítico ocorre quando o fago infecta e mata as células de hospedeiro, tendo como produto, a replicação do fago. Nos casos de lisogenia, o fago se integra ao genoma da cepa, tornando-se um profago e tem sua replicação junto ao cromossomo bacteriano, transmitido por transferência vertical. Esse processo pode alterar o fenótipo bacteriano por meio da expressão de genes de resistência advindos desses profagos. Assim, os bacteriófagos atuam como os principais moduladores das comunidades bacterianas, seja através de genes de virulência ou pela co-evolução juntos a esses microrganismos (Horde & Hill, 2018).

Diante da abundância de fagos existentes, sua caracterização e identificação é dificultada, sendo necessário uma combinação de ferramentas, a exemplo de microscopia epifluorescente ou citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão. Diferentemente das bactérias, não é possível utilizar um marcador molecular como o 16S em fagos, por eles não apresentarem homologies entre si, mas se tem utilizado um gene localizado próximo ao pescoço do fago, o que fornece novos caminhos na identificação dessa diversidade dos bacteriófagos, na tentativa de se conhecer um pouco mais sua biologia e suas interações (Clokier et al, 2011).

2.6 GENES ANTI-CRISPR

A dinâmica co-evolutiva entre bactérias e bacteriófagos assemelha-se a uma corrida armamentista, onde ambos os lados precisam desenvolver estratégias de

ataque e sobrevivência. Por um lado, as bactérias apresentam um arsenal de defesa, a exemplo da inibição de ligação fágica em receptores de superfícies celulares, suicídio celular programado, mecanismo toxina-antitoxina com abortamento fágico, CRISPR/Cas, entre outros (Pawluk; Davidson; Maxwell, 2018; Samson et al., 2013). Por outro, os fagos desenvolveram mecanismos contrários à ação de bactérias, por meio de moléculas antitoxinas, proteínas inativadoras de defesa bacteriana, além de mutações pontuais em sequências alvo no sistema CRISPR/Cas (PAM e *seed*), que garantem uma sobrevivência contra maquinarias de defesa das bactérias.

Entretanto, esse mecanismo específico de resistência ao sistema CRISPR/Cas, tem como resposta uma rápida extinção de fagos devido a diversidade de espaçadores gerados a nível populacional. Diante disso, se fez necessário uma resposta adaptativa mais arquitetada, a exemplo dos genes anti-CRISPR (*acr*) (Trasanidou et al., 2019; Westra et al., 2016).

Fagos que apresentam proteínas anti-CRISPR em seu genoma foram observados, inicialmente, nos sistemas I-F e I-E em *Pseudomonas aeruginosa* (Bondy-Denomy et al., 2013; Pawluk et al., 2014). Essas proteínas anti-CRISPR são produtos de genes com ação bloqueadora do mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas e foram descritas como AcrF1, AcrF2, AcrF3, AcrF4 e AcrF5, nas cepas que comportavam o I-F e, AcrE1, AcrE2, AcrE3 AcrE4, para o tipo I-E (Pawluk; Davidson; Maxwell, 2018).

Trasanidou et al (2019) relata a existência de 45 famílias proteicas de genes anti-CRISPR, encontradas inseridas nas bactérias que apresentam o CRISPR/Cas tanto de classe 1 como de classe 2, sendo elas altamente diversificadas, com um comprimento de 50-300 aminoácidos, mas que não compartilham sequências

conservadas entre si e entre proteínas já descritas. Devido à baixa homologia entre as sequências, um grande desafio consistia na busca por novos genes inibidores do sistema CRISPR/Cas. Dessa forma, a busca por similaridades adjacentes foi iniciada, e observou-se que os *acrs* ocorriam adjacentes a um grupo de genes apelidados de “genes associados ao anti-CRISPR” (*aca*), que codificam proteínas de motivo hélice-volta-hélice (HTH) e agem como repressores na transcrição anti-CRISPR, garantindo a sobrevivência do fago (Pawluk et al., 2016; Tang, 2019).

É válido ressaltar que, os genes *aca* apresentam homologias entre si, bem como compartilham sequências similares entre gêneros bacterianos geneticamente relacionados. Devido a essa associação entre *aca* e *acr*, intitulada “*guilt-by-association*” (culpado por associação) (Figura 8), foi possível identificar novas proteínas anti-CRISPR (Pawluk et al., 2016; Trasanidou et al., 2019).

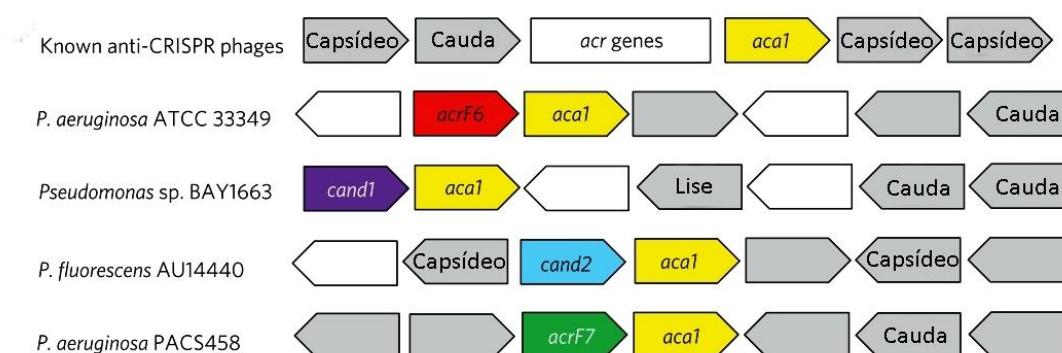


Figura 8: Associação entre genes *aca* e *acr*. Fonte: Adaptado de Trasanidou et al (2019).

O mecanismo de ação dos genes anti-CRISPR são bem diversificados, mas todos apresentam o mesmo propósito: evitar a destruição do DNA alvo (Figura 9). Devido à ausência de homologias entre proteínas Acrs, os primeiros estudos a fim de compreender sua ação foram feitos individualmente. Algumas proteínas da família Acr tipo I-F, atuam na fase de adaptação, bloqueando o reconhecimento do

DNA exógeno ou impedindo o recrutamento da Cas3 (Borges; Davidson; Bondy-Denomy, 2017).

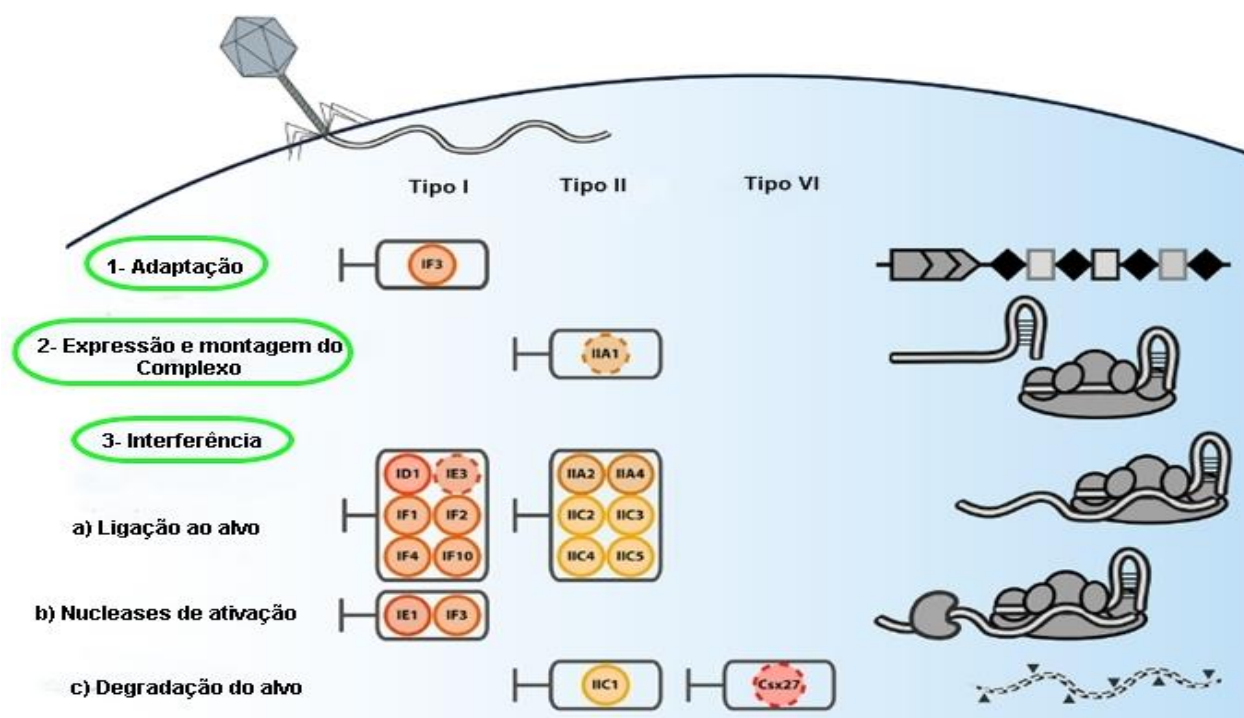


Figura 9: Mecanismo de ação geral de genes Anti-CRISPR. As caixas em verde são os estágios do mecanismo de ação CRISPR/Cas. Acrs estão representados em círculos com seus nomes abreviados (por exemplo, AcrIF3 é abreviado para IF3). Observa-se uma maior presença de genes acrs na fase de Interferência. Fonte: Adaptado de Trasanidou et al (2019).

Apesar da atuação nas fases de adaptação, mecanismos ligados à fase de interferência tem sido observado na maioria das proteínas bloqueadoras do sistema (Trasanidou et al., 2019). Acrs pertencentes a classe II, como as AcrIIA2, AcrIIA4 e AcrIIC3, desenvolveram seus mecanismos contra a Cas9, através do bloqueio entre as Cas e sua ligação ao DNA, tendo como consequência, a falta de imunidade adaptativa adquirida (Borges; Davidson; Bondy-Denomy, 2017).

A inativação do sistema CRISPR/Cas ocorre em cerca de 12% dos sistemas estudados que apresentam o loco CRISPR. Essa interação com proteínas Acrs pode resultar em sistemas incompletos, defeituosos ou ausentes. Entretanto, a inibição do CRISPR/Cas interfere no valor adaptativo bacteriano, uma vez que a transferência horizontal de genes contribui com a modelagem de genomas

bacterianos e implica em um custo benefício para a obtenção de proteínas anti-CRISPR (Borges; Davidson; Bondy-Denomy, 2017; Landsberger et al., 2018).

2.7 SISTEMA CRISPR/CAS EM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa comporta o sistema CRISPR/Cas tipo I, destacando-se os subtipos I-F, em maior frequência (30%) e I-E (12%). Em um estudo realizado por Van Belkun e colaboradores (2015) além desses dois subtipos encontrados, constatou-se a presença de I-C, em menor frequência. A presença de mais de um sistema no mesmo isolado, apesar de raro, foi descrito por Essoh et al (2013) e por Van Belkun et al (2015), entretanto, o primeiro achado em isolados brasileiros foi relatado por Luz et al (2019), onde os sistemas I-F e I-E foram encontrados simultaneamente em duas cepas (1,5%).

Algumas cepas de *P. aeruginosa* não apresentam a matriz CRISPR integrada em seu genoma, a exemplo de PAO1, ou possuem um sistema degenerado com genes *cas* órfãos (Figura 10). Em contrapartida, *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (PA14) apresenta o sistema I-F, com duas matrizes CRISPR: CRISPR 1 e CRISPR 2 (Figura 11). Esta cepa é utilizada como referência para estudos no entendimento do mecanismo de imunidade adaptativa contra fagos lisogênicos e biologia do sistema, em geral (Cady et al., 2012; Heussler et al., 2016; Li et al., 2016; Van Belkun et al., 2015).

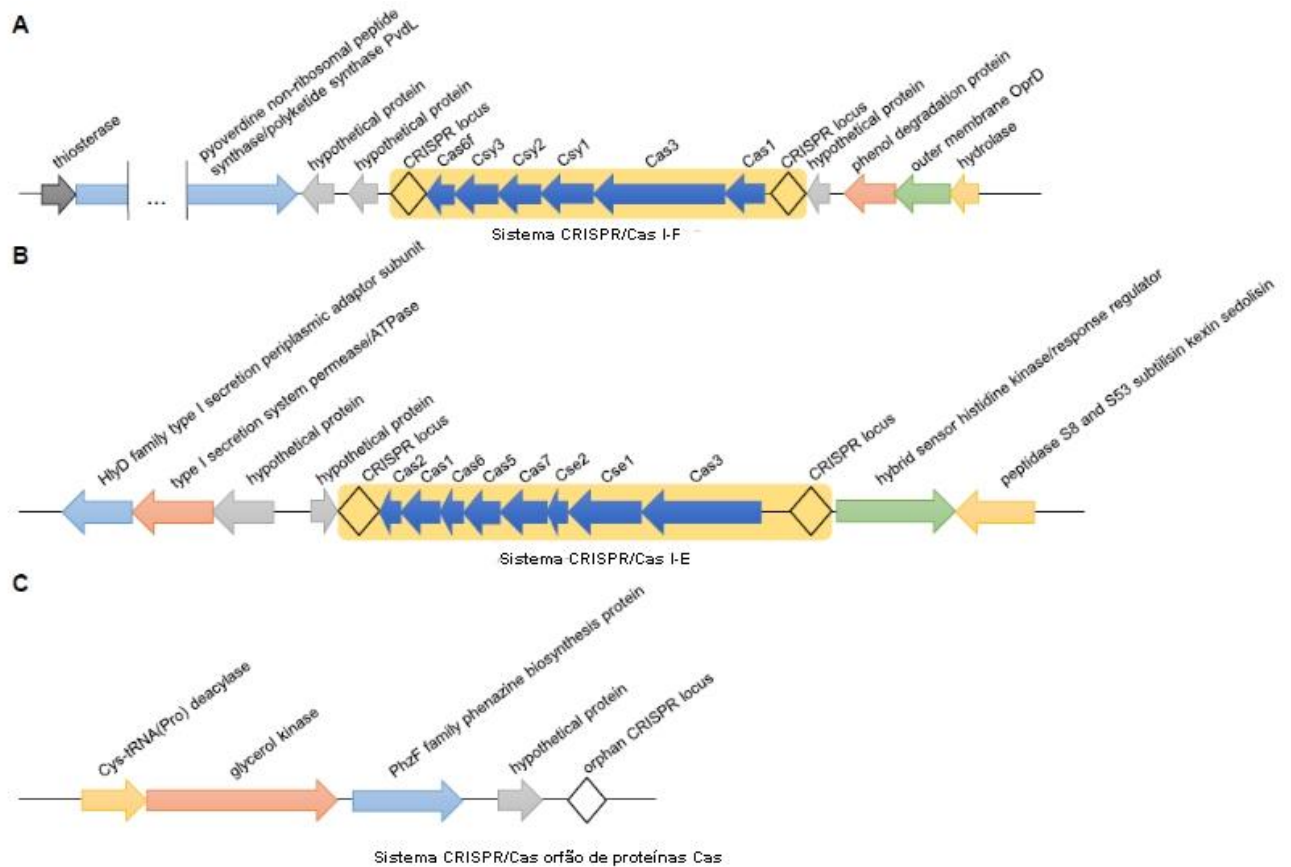


Figura 10: Contexto genético do Sistema CRISPR/Cas em *Pseudomonas aeruginosa*. A) Sistema CRISPR/Cas do tipo I-F; B) Sistema CRISPR/Cas do tipo I-E; C) Sistema CRISPR/Cas órfão de proteínas Cas, em *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Luz et al (2021).

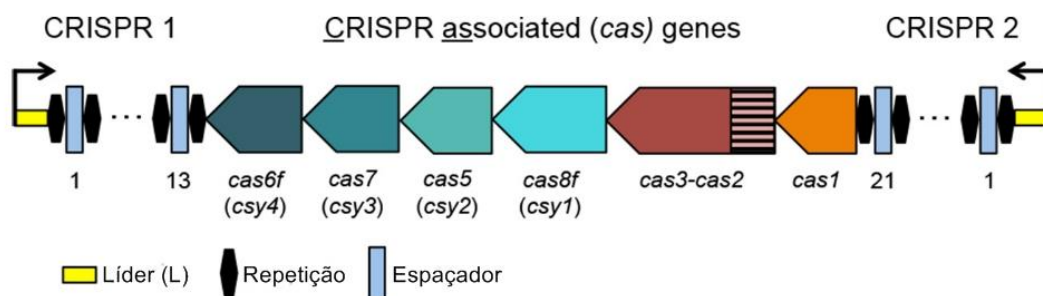


Figura 11: Esquematização do sistema CRISPR I-F presente na cepa UCBPP-PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Heussler et al (2017).

Análises dos genomas de *P. aeruginosa* que apresentam o sistema CRISPR/Cas completo e sem genes anti-CRISPR mostram um tamanho menor de seu genoma em relação aquelas que não possuem, o que está relacionado com o papel que o sistema exerce, o bloqueio da transferência horizontal de genes (Van Belkum et al., 2015). Entretanto, estima-se que 64% do sistema tipo I-F em *P.aeruginosa* estão inativados por genes *acrs*, o que sugere uma forma de adaptação às pressões exercidas pelo meio ambiente (Stanley and Maxwell 2018).

Em uma análise realizada por Weinberger et al (2012) a presença do loco CRISPR está bastante relacionada a condições ambientais. Concomitante, Westra e colaboradores (2015) relatam que o sistema CRISPR/Cas confere vantagem ao hospedeiro em meios nutricionalmente pobres.

Em um estudo realizado por Heussler et al (2015) foi observado que cepas de *P. aeruginosa* que apresentavam genes do fago DMS3 integrados no seu genoma, apresentavam uma limitação de motilidade dentro do hospedeiro e na formação do biofilme. Uma vez que houvesse a exclusão desses genes, o sistema CRISPR/Cas voltava a ser funcional, ocorrendo a restauração da motilidade e produção de biofilme.

Essoh et al (2013) observaram que o sistema CRISPR/Cas não estava associado à resistência de fagos líticos. Cady et al (2011) relataram a presença de espaçadores similares a bacteriófagos integrado no genoma do hospedeiro, amplamente associados a fatores de virulência, sugerindo que o sistema permite uma interação clinicamente importante entre o genoma bacteriano e os elementos genéticos móveis.

Nesse contexto, é possível inferir que o sistema CRISPR/Cas apresenta diferentes vertentes ao seu funcionamento, podendo exercer outras funções dentro

do genoma bacteriano. Entretanto, devido ao grande número de bactérias e arqueias que possuem esse tipo de sistema em seu genoma, a compreensão e o entendimento dessas funções é de tamanha complexidade, pois cada organismo irá se adaptar ao meio sobre pressões seletivas diferentes, interferindo e gerando diversidade funcional do sistema CRISPR/Cas (Viswanathan et al., 2007; Hale et al., 2009; Westra; Buckling; Fineran, 2014)

2.8 LOCO CRISPR COMO FERRAMENTA DE GENOTIPAGEM

A tipagem molecular é uma ferramenta fundamental nas análises clínicas e epidemiológicas para a individualização de amostras semelhantes na investigação de genes de virulência e identificação de surtos (Chen et al., 2018). A tipagem de isolados bacterianos tem como aporte algumas técnicas moleculares que permitem sua identificação e comparação, como a técnica por Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (MLVA), Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), Tipagem de Sequências Multilocus (MLST), entre outras (Filloux & Walker, 2014).

A caracterização por MLST é uma das técnicas mais utilizadas na microbiologia, uma vez que fornece um panorama evolutivo, populacional e epidemiológico das linhagens bacterianas, através da análise de pequenos fragmentos de nucleotídeos curtos, pertencentes a sete genes constitutivos. Por meio de ferramentas computacionais online, como o banco de dados Web PubMLST (<https://pubmlst.org/>), é possível obter os perfis alélicos ou *Sequence Type* (ST) de cada isolado, gerando uma linguagem universal para a comparação direta dos isolados (Maiden, 2006; Filloux & Walker, 2014).

O sistema CRISPR/Cas tem a capacidade de adquirir novos espaçadores, que atuam na defesa contra os MGEs. Esse mecanismo fornece um conjunto específico e único de sequências de DNA, obtidos de forma organizada e cronológica, podendo ser uma ferramenta interessante em genotipagens bacterianas (figura 12), pois permite inferir sua origem, suas relações genéticas, sua história evolutiva e seu fluxo de dispersão (Barrangou & Dudley, 2016).

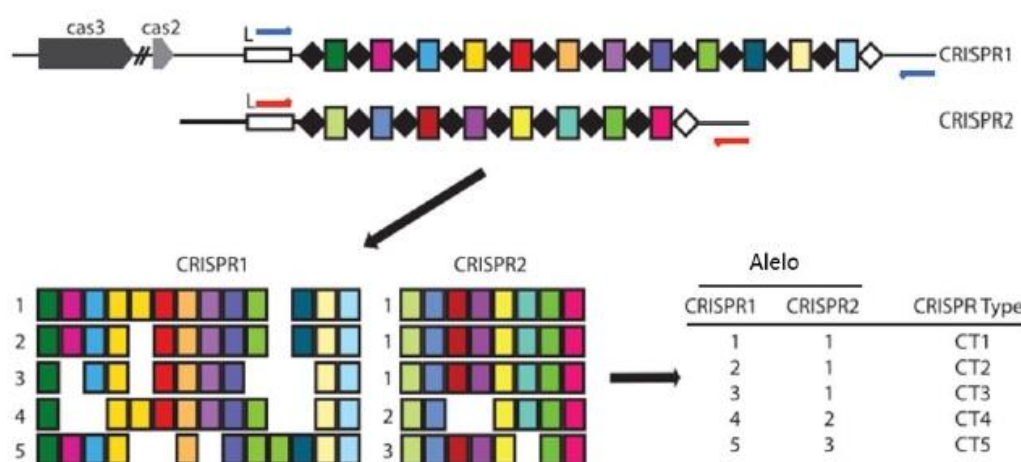


Figura 12: Esquema utilizado para a tipagem molecular através da análise do loco CRISPR. Cada retângulo colorido corresponde a um espaçador diferente. De acordo com o conteúdo de espaçadores e a sua ordem de incorporação, é possível estabelecer perfis para cada um, e, ao final, estabelecer um tipo CRISPR único. Fonte: adaptado de Shariat e Dudley (2014).

Apesar de existirem diferentes técnicas moleculares aplicadas a identificação e comparação de isolados bacterianos, o loco CRISPR por ser uma região hipervariável, baseada na predição e modulação de resistência ao fago, permite uma análise tanto do teor como da variabilidade dos espaçadores, mesmo em isolados geneticamente relacionados, tornando-se alvo para estudos de tipagem molecular (Barrangou & Dudley 2016; Shariat & Dudley, 2014).

Em estudo realizado por Pourcel e colaboradores (2015) foi comparado técnicas de genotipagem por CRISPR e por MLVA em *Yersinia pestis*. Nesta pesquisa, o loco CRISPR foi capaz de distinguir as cepas entre as três matrizes

CRISPR, Ypa, Ypb e Ypc, enquanto por MLVA, algumas estirpes não foram diferenciadas (Pourcel et al., 2015).

Apesar do sucesso do loco CRISPR como uma ferramenta de tipagem molecular em patógenos bacterianos, a exemplo em *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993), *Yersinia pestis* (Barros et al., 2014), *Salmonella typhimurium* (Fu et al., 2017), *Helicobacter cinaedi* (Tomida et al., 2017) e *Streptococcus agalactiae* (Beauruelle et al., 2017), até o momento, os resultados obtidos para *P. aeruginosa*, baseado no sistema CRISPR/Cas, não permitem inferir se este sistema também seria eficiente para sua tipagem, mas fornecem dados e hipóteses sobre a atuação do sistema e suas possíveis aplicações (Luz et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Análise comparativa de dados genômicos dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comportando o sistema CRISPR/Cas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar e confirmar o sistema CRISPR/Cas no genoma dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
2. Identificar o conteúdo espaçador dos isolados e comparar com os espaçadores depositados no banco de dados públicos;
3. Investigar possíveis bacteriófagos integrados nos genomas das *P. aeruginosa*;
4. Pesquisar possíveis genes anti-CRISPR nos genomas dos isolados em estudo;
5. Realizar um estudo epidemiológico-molecular dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE *P. AERUGINOSA*

Foram sequenciados 12 genomas de isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de diferentes origens de infecção e setores de dois hospitais públicos da cidade do Recife/PE (Tabela 1). Os isolados estão estocados em criotubos contendo meio de cultura BHI e glicerol a 30% na proporção de 1:1 em freezer a -80°C, na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz/PE.

Tabela 1: Informações sobre os isolados do presente estudo

Isolado	Ano de coleta	Setor Hospitalar	Amostra Clínica	Hospital
Pae90	2016	Enfermaria	Urina	H1
Pae93	2016	Enfermaria	Urina	H1
Pae94	2016	UTI	Aspirado traqueal	H1
Pae104	2010	Cirurgia geral	Sangue	H2
Pae105	2010	Cardiologia	Urina	H2
Pae107	2010	UTI	Sangue	H2
Pae108	2010	Cardiologia	Aspirado traqueal	H2
Pae110	2010	Clínica	Secreção de ferida	H2
Pae114	2010	Clínica	Secreção de ferida	H2
Pae115	2010	Clínica cirúrgica	Urina	H2
Pae116	2010	Cardiologia	Secreção de ferida	H2
Pae127	2010	Clínica vascular	Ponte de cateter	H2

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os isolados clínicos em estudo foram obtidos em trabalho anterior (Luz et al., 2019), por demanda espontânea de hospitais públicos da cidade do Recife. O projeto não apresenta implicações éticas considerando que, os resultados não

serão vinculados ao nome dos pacientes e nem aos hospitais de obtenção das amostras.

4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS

O DNA genômico dos 12 isolados foi extraído com o DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram obtidas com Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina) e quantificadas através de uma reação de PCR em tempo real utilizando o NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England Biolabs) no equipamento QuantStudio (Thermo Fisher Scientific). As bibliotecas foram sequenciadas no MiSeq (Illumina) usando o MiSeq Reagent Kit V3 with 600 cycles (Illumina).

4.3.1 Montagem e anotação dos genomas

A qualidade do sequenciamento foi avaliada através do *software* FastQC (Andrews, 2010). A montagem dos genomas utilizou o Unicycler, que consiste em um *pipeline* de montagem de genomas otimizado para os genomas bacterianos, tendo como base, o *software* SPAdes (Bankevich et al., 2012). A anotação foi realizada localmente através do *software* Prokka (Seemann, 2014). Os genomas foram visualizados através do *software* Artemis (Rutherford et al., 2020), e proteínas de interesse foram comparadas pela ferramenta BLAST com o banco de dados do Uniprot para confirmação de sua identidade.

4.4 PESQUISA DO SISTEMA CRISPR/CAS

A confirmação da presença do sistema CRISPR/Cas no genoma dos isolados estudados foi realizada utilizando a ferramenta *online* CRISPRCasFinder (Couvin et al., 2018) e a organização dos locos CRISPR confirmados foi visualizada

através do software Artemis (Rutherford et al, 2000). Em seguida, os achados foram comparados com isolados brasileiros já estudados pelo grupo de pesquisa, os quais passaram pelos mesmos processos de investigação dos sistemas (uso do software CRISPRCasFinder e análise do genoma no Artemis) (Luz et al., 2019) e com isolados depositados no banco de dados do NCBI.

4.5 ANÁLISE DOS ESPAÇADORES

Os espaçadores encontrados nos locos CRISPRs dos isolados tiveram sua possível origem determinada de acordo com a ferramenta *online* CRISPRtarget (Biswas et al., 2013). Nossos espaçadores foram comparados com os disponíveis em uma biblioteca de espaçadores publicada por Luz et al (2019), contendo espaçadores de isolados clínicos brasileiros específicos de *P. aeruginosa*, além de espaçadores de outros países. Além disso, foram utilizados o BLAST e o Uniprot pra confirmação da origem.

4.6 INVESTIGAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E GENES ANTI-CRISPR

A busca pelos bacteriófagos nos 12 genomas dos isolados de *P. aeruginosa* foi realizada utilizando a ferramenta *online* PHASTER (<http://phaster.ca/>) e BLAST (NCBI) (Johnson et al. 2008) para confirmação usando a região do fago desenhada por PHASTER e os genomas do primeiro e segundo fagos mais comuns dos resultados do PHASTER. O PHASTER considera vários critérios como comprimento geral do fago, estruturas relacionadas como cauda, capsídeo e a partir disso, os fagos recebem pontuações. Os profagos só foram considerados presentes se 1) os resultados do PHASTER considerarem a integridade do fago intacta ou 2) os resultados do PHASTER considerarem a integridade questionável,

mas os resultados do BLAST retornarem uma porcentagem de cobertura de alinhamento de 50% ou mais.

Os resultados foram comparados com a origem dos espaçadores obtidos para determinar se os isolados em questão possuem espaçadores contra os fagos incorporados, contrariando o princípio do sistema CRISPR/Cas.

As possíveis proteínas anti-CRISPR advindas desses profagos foram investigadas usando BLAST (Banco de dados NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) através da comparação entre as nossas sequências com as sequências de 14 proteínas anti-CRISPR previamente descritas (Pawluk et al. 2014, 2016, 2018) contra cada genoma estudado.

4.7. DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS

Os perfis genéticos foram determinados de acordo com a técnica de MLST (*Multilocus Sequencing Typing*) através das ferramentas online do banco de dados específico para *P. aeruginosa* do PubMLST (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>) (Jolley; Bray; Maiden, 2018). Assim, a partir da análise dos sete genes constitutivos de *Pseudomonas aeruginosa*, é possível observar padrões, chamados de *sequence typing* (ST), os quais já podem ter sido descritos, ou pode-se observar novos perfis. Os novos alelos gênicos (perfis genéticos) observados nos isolados foram submetidos ao banco de dados.

4.8 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Em estudo previamente desenvolvido e publicado pelo grupo de pesquisa, 13 isolados de *P. aeruginosa*, coletados nos mesmos hospitais alvos do estudo, pertencentes aos anos de 2015 e 2016 foram sequenciados e caracterizados pela técnica do MLST (Luz et al., 2019). A partir dos STs pré-estabelecidos, juntamente

com os STs obtidos dos 12 isolados no presente trabalho, foi possível traçar rotas de disseminação, sob um aspecto espaço-temporal, dos 25 isolados, entre os dois hospitais analisados.

Para traçar a rota de disseminação com base no CRISPR foram utilizados apenas os isolados que apresentaram o sistema I-F dentre os 25 isolados. Assim, os espaçadores do loco CRISPR nos isolados de *P. aeruginosa* foram classificados previamente em Luz e colaboradores (2019) e organizados em subclassificações dentro de grupos através da ordem dos espaçadores (anexo 1). Os genótipos foram estabelecidos a partir da sequência dos espaçadores, onde apenas um espaçador diferente indicaria um novo genótipo (Luz et al., 2019).

5. RESULTADOS

5.1 PESQUISA DO SISTEMA CRISPR/CAS

A identificação e confirmação dos tipos de locos CRISPR por meio do CRISPRCasFinder revelou a presença do tipo I-F (83%) e I-E (17%) no genoma dos 12 isolados estudados (Tabela 2 e Figura 13). Os tipos I-F e I-E geralmente carregam em seu genoma locos CRISPR (Tabela 2 e Figura 13). Nesse contexto, os isolados Pae90, Pae93, Pae107 e Pae108 apresentaram, além de um conjunto CRISPR completo, um segundo loco CRISPR, porém sem os genes *cas* (Figura 13).

Tabela 2: Tipos de CRISPR/Cas dos isolados brasileiros de *Pseudomonas aeruginosa* estudados.

Isolado	Tipo CRISPR/Cas
Pae90	I-F e LES
Pae93	I-E e Orfão
Pae94	I-E
Pae104	I-F
Pae105	I-F
Pae107	I-F e LES
Pae108	I-F e LES
Pae110	I-F
Pae114	I-F
Pae115	I-F
Pae116	I-F
Pae127	I-F

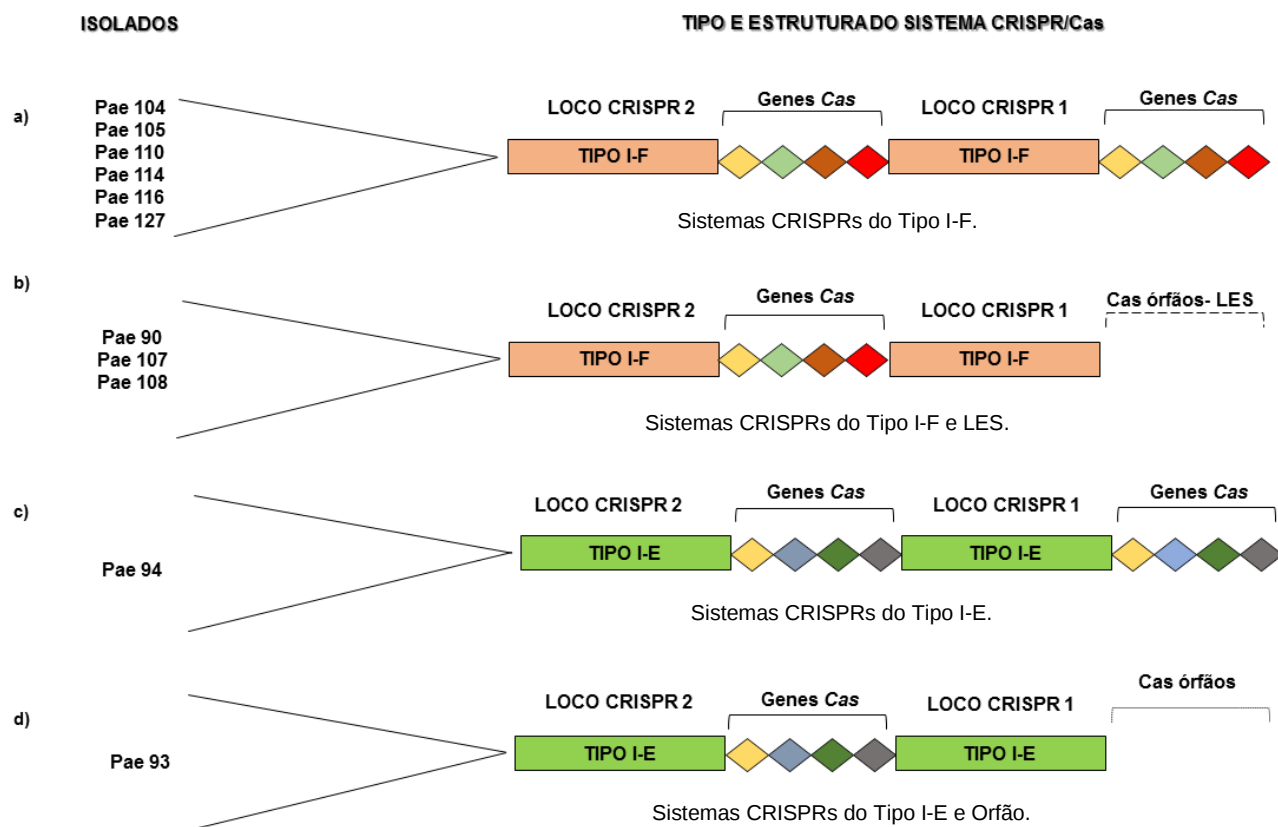


Figura 13: Tipos de CRISPR/Cas e estrutura observada nos isolados brasileiros de *Pseudomonas aeruginosa* estudados.

Ao investigar o loco CRISPR sem genes cas (CRISPR órfão), foi observado que os isolados apresentam um conteúdo genético em comum, exceto o isolado pae93, que apresentou uma constituição gênica diferente dos demais (Figura 14).

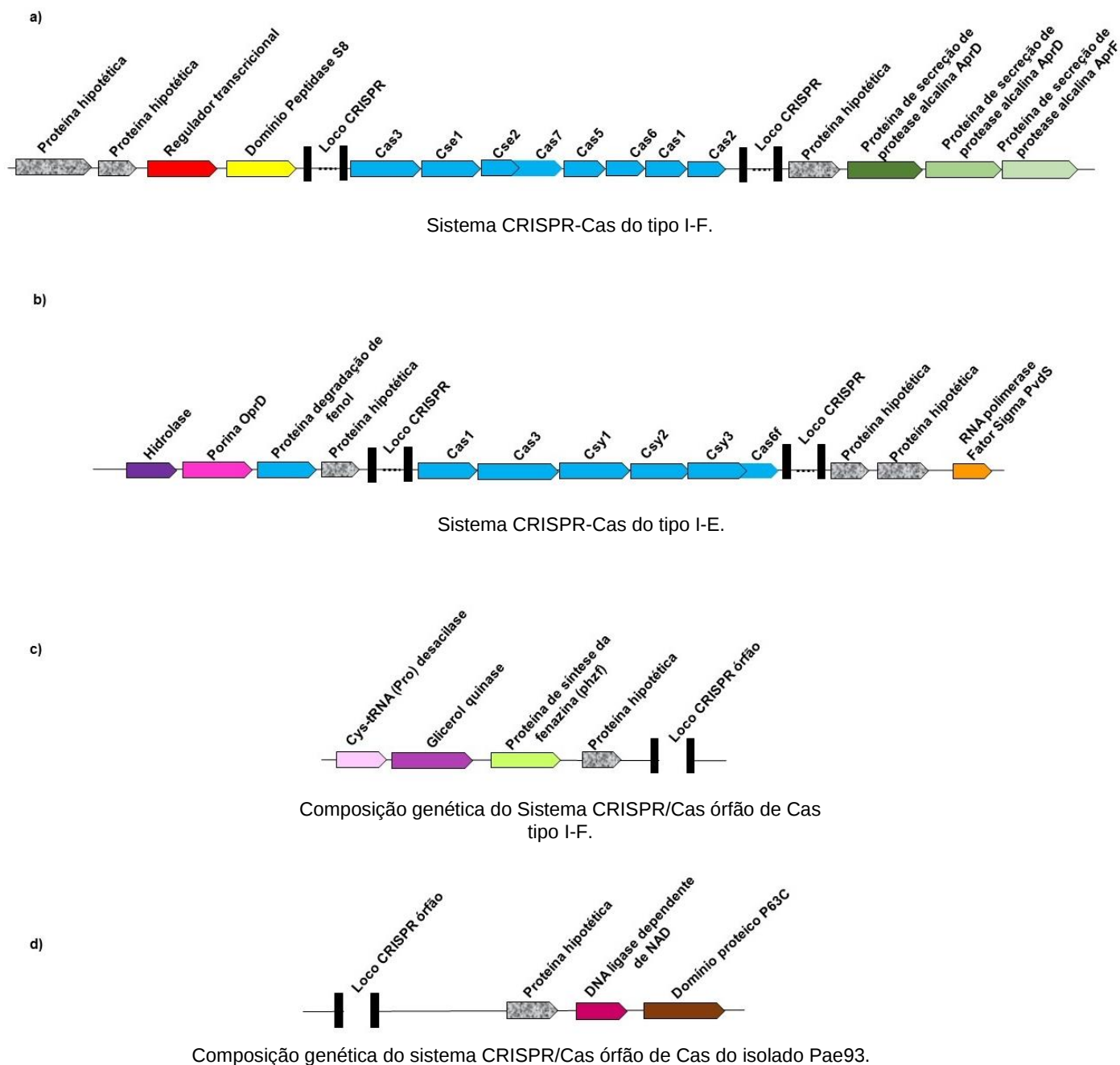


Figura 14: Contexto genético do CRISPR/Cas observados nos genomas estudados. Proteínas hipotéticas são proteínas não caracterizadas. Fonte: Própria autora.

Esse contexto genético observado nos isolados Pae90, Pae107 e Pae108 sugere uma relação com as cepas epidêmicas de Liverpool (LES) de *Pseudomonas aeruginosa* (England et al., 2018).

5.2 ANÁLISE DOS ESPAÇADORES

Os espaçadores encontrados nos genomas no presente estudo foram comparados e inseridos em uma biblioteca de espaçadores desenvolvida e publicada por Luz e colaboradores (2019). Para a criação da biblioteca de espaçadores realizada por Luz e colaboradores (2019), além dos espaçadores identificados em seus isolados clínicos brasileiros, a biblioteca conta com espaçadores previamente descritos por Cady e colaboradores (2011) e Essoh e colaboradores (2013), reunindo assim, espaçadores tanto de isolados brasileiros, como de outros países.

Juntamente com os dados disponibilizados por Luz e colaboradores (2019) e do presente trabalho, a atual biblioteca de espaçadores está formada por 1203 espaçadores (Material suplementar 1), sendo 281 encontrados em nossos isolados. Destes, 132 já haviam sido descritos nos trabalhos anteriores e, 149 foram descritos pela primeira vez no presente estudo (Material suplementar 2).

Com base no CRISPRTarget, na biblioteca de espaçadores publicada por Luz et al (2019) e em comparações no BLAST e Uniprot foi determinado as origens dos espaçadores observados nos isolados e, o que podem proteger. Dos 281 espaçadores encontrados nos locos CRISPR dos 12 isolados do presente estudo, foram observados espaçadores desconhecidos que não apresentaram homologia com elementos genéticos móveis (MGEs) conhecidos; Espaçadores que apresentaram homologia com fagos e plasmídeos simultaneamente e; Espaçadores com similaridade de sequencias à fagos ou plasmídeos. A relação entre as sequências espaçadoras e seus possíveis alvos mostrou ao comparar as sequências espaçadoras, com as sequências disponíveis nos bancos de dados,

que a maioria das sequências espaçadoras encontradas não apresentaram homologia com as sequências depositadas (figura 15).

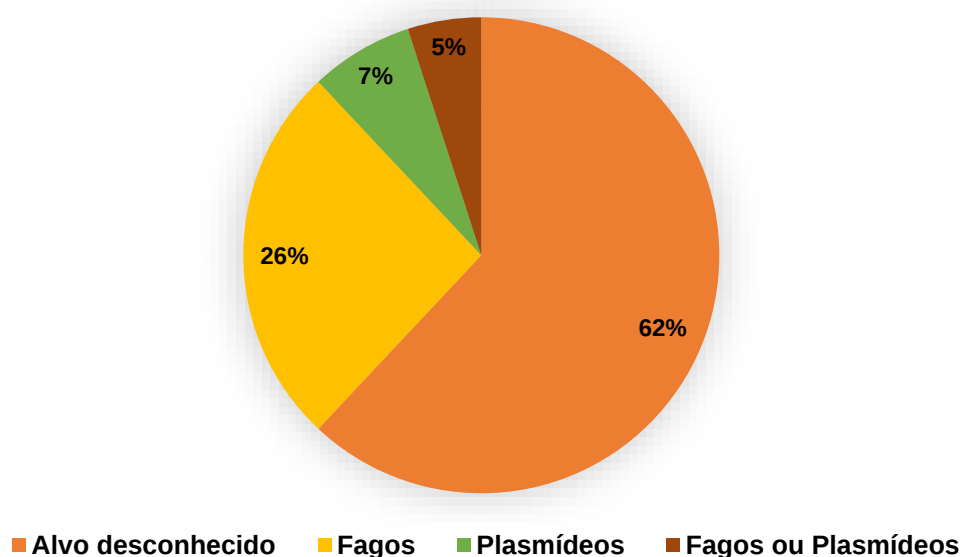


Figura 15: Relação entre as sequências espaçadoras e seus possíveis alvos. 62% das sequências espaçadoras apresentaram alvos desconhecidos. 26% sequências espaçadoras apresentaram homologias aos fagos; 7% apresentaram homologia à plasmídeos, 5% apresentaram homologias tanto a fagos como a plasmídeos, simultaneamente. Fonte: Própria autora.

Os 149 espaçadores descritos pela primeira vez, são espaçadores nunca observados em outros genomas. Dessa forma, a fim de estabelecer a possível origem dessas sequências espaçadoras, as mesmas foram submetidas a alinhamentos em diferentes programas, a exemplo do CRISPRTarget, Blastn (NCBI) e Uniprot (Tabela 3).

Tabela 3: Panorama dos novos espaçadores identificados no presente estudo. Destacado em azul os espaçadores com similaridades com MGE.

Espaçador	Sequência	Origem
s1055	AAAAATCACGTTTCATCGAAAATCACACGTGAT	Desconhecido
s1056	AAAACGAGCCACGGGTGTCGGCCTTCGACTCA	Desconhecido
s1057	AACATCCAGCCCGAGCTGAGCGATATCCCCCG	Fago
s1059	AACCATGCGCTGCGGCTGGTCATCAGCGAGCA	Desconhecido
s1060	AAGCTGGCCGGGTGATCTGCGCAGGCCCGGAT	Desconhecido
s1061	AATGCCCCGGAATTGCCGGGCTAATGAGGGGTA	Desconhecido
s1062	ACCAATGGACCAGCAATCGAACTCAAGAACGA	Desconhecido

s1063	ACCCGAATGCATCACCAACCCACGGCGTGCCC	Desconhecido
s1064	ACCGAATCCGCGACTCGTACCGAGTCGCAAAC	Desconhecido
s1065	ACCGGGAAGTGGGCGACGGACCAGAACCTCCT	Fago
s1066	ACCTTAGAACTGGATGACGAATTCGAACTGCT	Desconhecido
s1067	ACGAACAGCGCTGCGAACTCGCCAAGGTCTGG	Fago
s1068	ACGAACGAACAGTTTTTTCAGGTTTTTCATAG	Desconhecido
s1069	ACGACGACGAGAAGGATGGCAACCGGCGTTTG	Fago
s1070	ACGCTACAAAGTCGACGTTGGCACTTTTATGC	Fago
s1071	ACGTCGGAACGCAACTACCTGACCGCGTTGGT	Plasmídeo
s1072	ACTCTGCGCCTCGACGTCGGGATCTACGAAAA	Fago
s1073	ACTTGCGAGAAGCCCCAGGACTTGAAGCCACTG	Desconhecido
s1074	ACTTGGGCGGCCTTGGTCAGGTCGATGGTGAT	Fago
s1075	AGAACGAGCCCCGTGTATCGGCTTTGGACTCA	Desconhecido
s1076	AGATACCTATCGAGGGGTGCTGAGGACAGATC	Desconhecido
s1077	AGCGTGCCATGGCGGCGGTAAGTCAAACCGTT	Desconhecido
s1078	AGCTGGTTGTAGACGGCGATGCACTGCTCGAT	Fago
s1079	AGGAATCGCCACGCGGTAACACACTTCATAC	Fago
s1080	AGGACTCAGCGAGCCTTCACAAGACGCCTCCA	Desconhecido
s1081	AGTCAGCGATGAGTGACGTAACCATGGCGATA	Desconhecido
s1082	AGTGCGGGGTTGAAAAGTGGCTGGGGCGTGAT	Desconhecido
s1083	AGTTCGGGACACTGCTCCAGCAGCAGGACGCA	Desconhecido
s1084	ATAAGGCTGTCGTCACAGCGCTGCATGGCTGA	Fago
s1085	ATACTGACTCAGCCAGGGAAGTCACTTGGA	Fago
s1086	ATATCCAACACCGGGACGGGAGTCCGATCCTA	Fago
s1087	ATCACACGTGATGGCGAGGTGAAATCACACAT	Desconhecido
s1088	ATCCGTCACCGGAATTTGCGCGTTGGCCGTGC	Plasmídeo
s1089	ATCGAGCAGTGCATCGCCGTCTACAACCAGCT	Fago
s1090	ATGAAGGCCAGCAGGCCGAACACGATTGCGAT	Plasmídeo
s1091	ATGCACACGACGTTTCGAGTTCTGCATTGACGT	Desconhecido
s1092	ATGCAGCGATCCGGCCGGCGGAGCCGAAGGA	Fago
s1093	ATGGGGTCTACATCAGCGATGCGGCTCTGTCC	Desconhecido
s1094	ATTGGCCGTGCAAGGTCCACCAGTCGATGCTT	Fago
s1095	CAACTGGCGGCCGGCGCTCGGCAGTCCATTCT	Fago
s1096	CAGGCAGGTGGCTCCGGCCTGGAGGCGGGGTC	Desconhecido
s1097	CAGTATCCGGGCCTTGACGGGTTTCCCATGCT	Desconhecido
s1098	CCGGCATCACCTGGGAAGAAGCCGGCGCCTGG	Desconhecido
s1099	CCGGGGCATCGAGGACAACGAAATGAGCCTGA	Desconhecido
s1100	CGATACGAGCGCGGGGACTGATTTCACTGGGT	Desconhecido
s1101	CGATCTGCTCCGCGCGTTCCGGCGGGCGTCGCA	Fago
s1102	CGCAACGTTTCGTGATCTGCCGTTTCGCCGCCA	Plasmídeo
s1103	CGCGCTATTCTCTACTCCTACCTTTTCTTTGA	Fago
s1104	CGCTTGTGGTCCAGCGACTGGCCCTTCGCCGG	Fago
s1105	CGGGCCTTCGCTTCGGCATCGACACGCTGGTT	Plasmídeo
s1106	CGTCCAGTCGGGCTGTTGAGTTTCTCTGCTAC	Desconhecido
s1107	CGTCGCGACTTGTCGCGTCGAACGGAGCGCCG	Desconhecido

s1108	CGTCGGTCGGTGATCCCGCGCCACGACCAGTT	Fago
s1109	CTAAAAGGCCTTTTAAAGCCTTTTAAAGGTAA	Desconhecido
s1110	CTCTCCTGAGCGCTGAGGATGCAAGAGCCCGC	Fago
s1111	CTGAAACTCGGTGTGTTTGAGATACGCCTTCA	Desconhecido
s1112	GAAAAACTTCACAACCGCAGAAGTCATCCTAT	Desconhecido
s1113	GAAATGCTGGCTCGGCTGACAAAACCTTGAGGA	Fago
s1114	GAAGCTTTTCTCCCCCTGCCCTCTGACCCCCT	Desconhecido
s1115	GAAGTTCACCGACGACAGCGGTTCAACGCGTT	Desconhecido
s1115	GACAACCAGCTGGCTCAGCCGTTGTGCTCAA	Desconhecido
s1116	GACGTGTGCAGGATCTCGCCGGCGCCGGCAAT	Desconhecido
s1117	GAGCAGATCCGCTATGGCATTAGCAATGCCG	Desconhecido
s1118	GCATGCTGTCCGGCCTGTTGATCGGCCCGCTG	Fago
s1119	GCCACCAGTTGCTTCACCTGGGAATTGACCTT	Desconhecido
s1120	GCCAGCAGGCCGACATGATGATCGTGCTCACT	Desconhecido
s1121	GCCCTGGCGCTCCTCGACGCTCACAATCCCTAC	Desconhecido
s1122	GCCGTCTGCTTGAACCGGAGCCGCCCGGCACT	Desconhecido
s1123	GCGAGCATTTACACGTAATGCCATTATGCGA	Desconhecido
s1124	GCGAGGGTGGCGGGGCTGAAAAGTCGGGTATA	Desconhecido
s1125	GCGCAGGGTACGCCGGTAGGCCTGCAGTGCCT	Fago
s1126	GCGCTGGCTTTTCGGATCGGCGCCGGACACTTT	Desconhecido
s1127	GCGGCCTCTGTGGGCGTTCTGATGTGATCA	Fago
s1128	GCGTGATGAAACGTCTGCGCTGCCCTCTTTGT	Desconhecido
s1129	GGCAAGCCATTGATCAGCAGGCCGGTATTCGG	Fago
s1130	GGCACCACGTTGGTCGAGCTGTTAGCTCGTT	Fago
s1131	GGCCAACTGAGCCAGACCATGGAGGGCGGCGA	Desconhecido
s1132	GGCCTGGGCCGGGCTGAGGCGTGGCCGTCGAA	Desconhecido
s1133	GGCGAGCTACCGCCGACGTGGGGCCACTACGA	Desconhecido
s1134	GGGCACGCCGTGGGTTGGTGATGCATTCGGGT	Desconhecido
s1135	GGGCAGGCGATCTACCAGACCCTCGCCGTGAA	Desconhecido
s1136	GGGTGGCGGAACCGACTGCCGAATATCACTCC	Desconhecido
s1137	GGGTTTTGACTATTGTGCGACCCGCTCTGGAG	Desconhecido
s1138	GTCGGCGCGAGACATCATTCCGCCGCGATCCT	Desconhecido
s1139	GTCTCGCGCGTGATGCCGTGCTCGATCGCCCA	Fago
s1140	GTGACTATCGATCCTGAGCTTCAACAGCCAAT	Desconhecido
s1141	GTGCGGGGCGAACGGCTGCTATCAGACACTAC	Desconhecido
s1142	GTTTTACCGATGGTCATGGTCTCTTTCCCGA	Desconhecido
s1143	TACCAGGAGCCAACAGCGATGTGCCGCCACAA	Desconhecido
s1144	TACGTACCTGGGAACGTTTCGAGAAGGTCGTGA	Fago
s1145	TACTGGTTCTTCGCCAACGGCCGGCGCTTCTG	Fago
s1146	TAGGGTTCAGCCGGTGGCTGCGAGTGTGATT	Desconhecido
s1147	TATCCGAGTTTCCCAGACCTACGAAATAGTCA	Desconhecido
s1148	TATCGAAGAGTGATCTGCGCTGCTGTGGCGCA	Desconhecido
s1149	TATGCCGCCAGCGTGCCGCCAGGGCGCCGC	Plasmídeo
s1150	TCAAAGCGCGAACCATCCAACGGCAGTTTCGCA	Plasmídeo
s1151	TCAAGTTCGGGTCCGAGCTGGCCGCACACACC	Desconhecido

s1152	TCGAGCAGCGGCCCGAGGAGTCCGAAGACTTG	Fago
s1153	TCGATCACAGCAAGCCCTACCTGACGGTCGAT	Plasmídeo
s1154	TCGATGAAATACTGGCCGTCGAAACAGAGCTT	Fago
s1155	TCGCCCCGAAGCCCGCTTATGAACTTCGAGAC	Desconhecido
s1156	TCGCCCCGAAGCCCGCTTATGAACTTCGGGACA	Desconhecido
s1157	TCGCCCTAAGCCCGCTTATGAACTTCGCGAC	Desconhecido
s1158	TCGGACAAAGACAGCCTCCGGTCATAGGGTAG	Desconhecido
s1159	TCGGCGAGGCGATCGATCATGCGAATCAGCAA	Plasmídeo
s1160	TCGGTGACGCTGGACTGGTCGAGGGGCGTAGA	Fago/Plasmídeo
s1161	TCGTAATCATTGAAGCCCCGGGCAAGCTGAAA	Plasmídeo
s1162	TCGTCTGGTTGTAGGCCGCCTGCCACGTCTT	Desconhecido
s1163	TCTTCTGGTGTGGTCGACTCGGTGACAGACAA	Desconhecido
s1164	TGAACAACCCGGCGCTGCGCGACTATCTGCCG	Plasmídeo
s1165	TGATCGACATCAGGAACGCCACAGAGGCCGC	Fago
s1166	TGATGGTTTGCCTGCGTATGCCGCCAGATTCA	Fago
s1167	TGCAGACGTTACGTTAGGCGCAGCCCGACCGA	Desconhecido
s1168	TGCCAGGCGCTGGCAAGACCCTGAACGCGATT	Fago
s1169	TGCCGATCGCGCCGGAAGCGGTGAGCCAGTTC	Desconhecido
s1170	TGCGACCAGGTCCGCGGTAATCCCTTCTGACA	Desconhecido
s1171	TGGAACCCGGAGAAGGACGGCAGCCCCACCGA	Fago/Plasmídeo
s1172	TGGAGAAAAGCAATGCGAGTGGTGCGAGGCCA	Fago
s1173	TGGAGGCGTCTTGTGAAGGCTCGCTGAGTCCT	Desconhecido
s1174	TGGGCCGGCGCCTACGCGGCGCATCAGCCGGT	Fago
s1175	TGCCAGGCGCTGGCAAGACCCTGAACGCGATT	Fago
s1176	TGCCGATCGCGCCGGAAGCGGTGAGCCAGTTC	Desconhecido
s1177	TGCGACCAGGTCCGCGGTAATCCCTTCTGACA	Desconhecido
s1178	TGCTGGTTGAAGCGGACGAGCGCCTGGTGCCC	Fago
s1179	TGGAACCCGGAGAAGGACGGCAGCCCCACCGA	Fago
s1180	TGGAGAAAAGCAATGCGAGTGGTGCGAGGCCA	Fago
s1181	TGGAGGCGTCTTGTGAAGGCTCGCTGAGTCCT	Desconhecido
s1182	TGGGCCGGCGCCTACGCGGCGCATCAGCCGGT	Fago/Plasmídeo
s1183	TGGGTGGCCGACATCGTTGCGTCGAACTCGTA	Fago
s1184	TGGTCGAACAGATGGCGGTCTTCGGCCAACTG	Desconhecido
s1185	TGGTGATCTTTCCGTTGTTTGCCTGGGTCATT	Fago
s1186	TGGTTCTTCGCCAACGGCCGCAGGTTCTGGAT	Fago
s1187	TGTCCCAGGCGCAGATACACCTGCCCGTCCAG	Desconhecido
s1188	TGTCTCGAAGTTCATAAGCGGGCTTCGGGCGA	Desconhecido
s1189	TGTGCCGGTTGAGGAGTGGTATTCGCTTCATC	Desconhecido
s1190	TTACCAGTCGCTCCAGGCCCTTCTTTTCCGTC	Desconhecido
s1191	TTCATCAGGATGCCGCCAAGGGTCCGCATAAT	Desconhecido
s1192	TTCCGCCAGTTGCCGAAGCGCCCGAAATAGAG	Desconhecido
s1193	TTCCGGGTCGATATCTACAACGGCGTGGCCAA	Desconhecido
s1194	TTCGAATACTTTTTTGACATCCATTTGCCCCT	Fago
s1195	TTGAGCTTGTCGTTGTACTCGTCGAGGCTCAT	Fago
s1196	TTGATCAATGCACTTCCGGTTCCGCAGTTTCT	Desconhecido

s1197	TTGATCCAGGCGCTTATCCGACGCTGGCACTC	Desconhecido
s1198	TTGATGGGTTTCGTA CT CAGGCCCGGAAACTC	Desconhecido
s1199	TTGCTCCCCTTGTCGGTCTGGCCAATCATCCA	Fago
s1200	TTGGACGAACCCCTTTTCTTCAAGCACAGCAA	Desconhecido
s1201	TTTCGAATGCGAAATTCGGGTCGCATCATGTA	Fago
s1202	TTTTCGTAGATCCCGACGTCGAGGCGCAGAGT	Fago
s1203	TTTTGGACAGGCCGAGGGGCCGTATCGACGGT	Desconhecido

MGE: elementos genéticos móveis.

A porcentagem sobre o conteúdo espaçador observado nos 149 espaçadores nunca observados pode ser visualizado na figura 16.

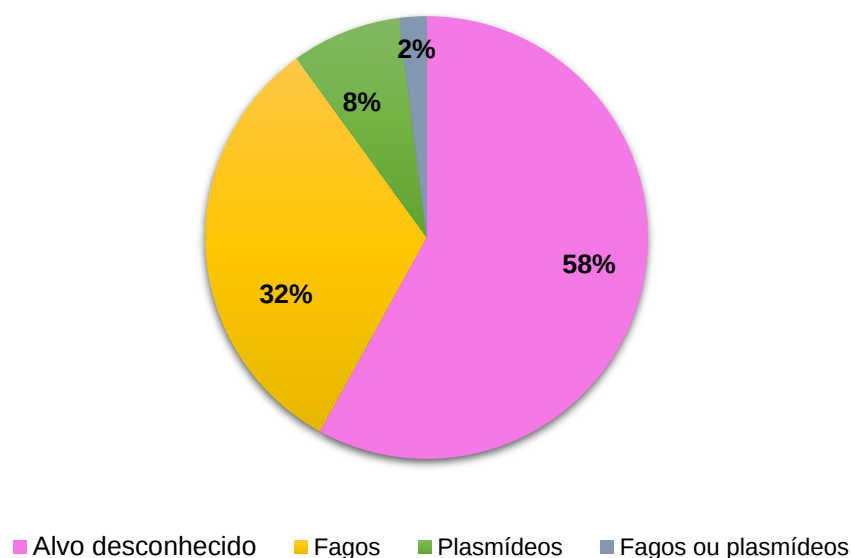


Figura 16: Relação entre as 149 sequências espaçadoras nunca observadas e seus possíveis alvos. 58% das sequências espaçadoras apresentaram alvos desconhecidos. 32% sequências espaçadoras apresentaram homologias aos fagos; 8% apresentaram homologia à plasmídeos, 2% apresentaram homologias tanto a fagos como a plasmídeos, simultaneamente. Fonte: Própria autora.

5.3 BACTERÍÓFAGOS E ANTI-CRISPR INTEGRADOS NO GENOMA

Na tentativa de identificar possíveis profagos inseridos no genoma dos 12 isolados clínicos brasileiros, foi feita uma comparação entre o conteúdo de profagos (analisado através do Phaster) e o conteúdo espaçador do CRISPR, a fim de estabelecer similaridades entre ambos. Dessa forma, pôde-se observar a presença

de espaçadores contra os profagos incorporados nos genomas (Tabela 4), o que parece contrariar o princípio CRISPR/Cas, como um sistema de proteção contra MGEs. No entanto, pode-se observar também que todos os 10 isolados comportam um ou mais profagos sem espaçador similar em seu genoma.

Tabela 4: Descrição dos Profagos inseridos nos genomas de *Pseudomonas aeruginosa* em estudo. Destacam-se em amarelo, profagos com espaçadores alvo e em verde, presença de profagos sem espaçadores alvo.

Profago	Isolados									
	Pa90	Pa104	Pa105	Pa107	Pa108	Pa110	Pa114	Pa115	Pa116	Pa127
Pf1	X			X	X	X				X
JBD44	X									
YMC11	X	X	X						X	X
JBD25		X	X				X	X	X	
F10		X	X						X	X
PAJU2				X						
PHAGE_Escher_vB_EcoM				X			X	X		
PHAGE_Shigel_SfII					X					
phi2					X					
phiCTX					X	X			X	
phi297						X			X	
PHAGE_Shigel_Sf6						X	X	X	X	
MD8								X		
phi3										X

Para melhor compreender a inserção dos fagos nos genomas bacterianos, foi investigado a presença de genes *acrs* ou anti-CRISPR (advindos desses profagos inseridos) nos isolados de *P. aeruginosa*, possíveis responsáveis pela

inativação do sistema CRISPR/Cas. Foram encontrados dois genes em três isolados de *P. aeruginosa* que inativam o sistema CRISPR/Cas (Tabela 5).

Tabela 5: Descrição dos genes anti-CRISPR nos genomas dos isolados de *P. aeruginosa* em estudo. Em azul, destaca-se as proteínas anti-CRISPR observadas. Em amarelo destaca-se em quais isolados essas proteínas foram encontradas.

Genes anti-CRISPR	Isolados									
	Pae90	Pae104	Pae105	Pae107	Pae108	Pae110	Pae114	Pae115	Pae116	Pae127
AcrE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrE2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrE3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrE4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AcrF6	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-
AcrF7	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
JBD24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Status de Função CRISPR/Cas	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Ativo	Inativo	Inativo	Inativo	Ativo

A presença dos genes anti-CRISPR no genoma de *P. aeruginosa*, sugere uma pressão seletiva entre fagos e bactérias. Apesar da identificação de fagos nos genomas, alguns espaçadores contra eles, bem como a presença de genes *acrs*, responsáveis pela inativação do sistema CRISPR, a estrutura do loco se apresenta intacta nos genomas.

5.4 MLST

A análise dos 12 genomas por meio da técnica de MLST identificou nove tipos diferentes de perfis genéticos (STs), onde sete destes estavam descritos no banco de dados PubMLST: 1239, 620, 244, 1076, 2234, 850 e 360. Dois (3383 e 3384) STs são novos, descritos pela primeira vez neste estudo e foram submetidos

ao banco de dados. Entre os 12 isolados, foi observado uma possível dispersão clonal de dois STs, em três isolados do ST 244 e em dois do ST 850 (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização do perfil genético dos isolados brasileiros de *P. aeruginosa*. Destaca-as na tabela em cores, os isolados que apresentaram o mesmo ST, respectivamente.

Isolado	ST
Pae90	1239
Pae93	3383
Pae94	620
Pae104	244
Pae105	244
Pae107	3384
Pae108	1076
Pae110	2234
Pae114	850
Pae115	850
Pae116	360
Pae127	244

5.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Baseado nas informações na tabela 7, isolados pertencentes ao **ST 244** foram observados no hospital 1 (H1), em 2015 e 2016, e no hospital 2 (H2) em 2010. No H1, no ano de 2015, o **ST 244** foi observado na enfermaria e, em 2016, na UTI, oriundos de fragmentos de tecidos mole e osso e de secreções, respectivamente. No H2, os isolados foram coletados nos setores de cirurgia, cardiologia e clínica vascular, que fazem parte do setor de enfermaria e em amostras de sangue, urina e ponte de cateter. Assim, os isolados pertencentes ao **ST 244** apresentaram uma disseminação intra-hospitalar, inicialmente no H2 em 2010, e em seguida no H1 nos anos de 2015 e 2016. Como também foi observado

uma disseminação inter-hospitalar desse clone entre setores de amostras clínicas, nos dois hospitais estudados.

Tabela 7: Isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa* caracterizados pela técnica de MLST. Destaca-se na tabela, os isolados que apresentaram os mesmos STs com cores iguais, respectivamente.

Isolado	ST	Ano	Hospital	Setor Hospitalar	Amostra Clínica
Pae 12	244	2015	H1	Enfermaria	Fragmento ósseo e tecidos moles
Pae 21	1394	2015	H1	Enfermaria	Urina
Pae 22	252	2015	H1	UTI	Escarro
Pae 28	3079	2015	H1	Enfermaria	Material cirúrgico
Pae 29	357	2015	H1	UTI	Escarro
Pae 39	3079	2015	H1	UTI	Escarro
Pae 42	357	2016	H1	UTI	Escarro
Pae 66	3078	2016	H1	Enfermaria	Fragmento ósseo
Pae 70	275	2016	H1	Enfermaria	Urina
Pae 74	244	2016	H1	UTI	Escarro
Pae 81	3080	2016	H1	Enfermaria	Urina
Pae 83	3079	2016	H1	UTI	Fragmento de tecido
Pae 90	1239	2016	H1	Enfermaria	Urina
Pae 93	3383	2016	H1	Enfermaria	Urina
Pae 94	620	2016	H1	UTI	UTI
Pae 104	244	2010	H2	Cirurgia geral	Sangue
Pae 105	244	2010	H2	Cardiologia	Urina
Pae 107	3384	2010	H2	UTI	Sangue
Pae 108	1076	2010	H2	Cardiologia	Aspirado Traqueal (STB)
Pae 110	2234	2010	H2	Clínica	Secreção de ferida
Pae 113	3137	2010	H2	Enfermaria	Fragmento de tecido
Pae 114	850	2010	H2	Clínica	Secreção de ferida
Pae 115	850	2010	H2	Clínica cirúrgica	Urina
Pae 116	360	2010	H2	Cardiologia	Secreção de ferida
Pae 127	244	2010	H2	Clínica vascular	Ponte de cateter

No ano de 2010, os isolados do H2 apresentaram possíveis dispersões clonais dos **STs 244 e ST 850**. O **ST 850** foi encontrado no setor de clínica e cirurgia, oriundos de secreções de ferida e urina, respectivamente.

O **ST 3079** foi observado no H1, no ano de 2015, nos setores de enfermaria e UTI, provenientes de material de cirurgia e escarro, respectivamente e em 2016, esse mesmo clone continuava presente em escarros de pacientes na UTI, também sugerindo uma dispersão intra-hospitalar.

Na tentativa de observar como o loco CRISPR se comporta como uma ferramenta de tipagem molecular, em *P. aeruginosa*, dezessete dos vinte e cinco isolados (os quais apresentaram o sistema tipo I-F) foram agrupados previamente pelo grupo de pesquisa (Anexo I) a partir da ordem de inserção de seus espaçadores. Com a formação dos grupos, foi possível caracterizar as cepas em genótipos, por meio da diferenciação entre os espaçadores do mesmo grupo, onde apenas um espaçador diferente já seria suficiente para estabelecer um novo genótipo (G). As informações sobre as análises e separação dos isolados estão disponíveis na tabela 8 e no Anexo 1.

Tabela 8: Caracterização genética com base no sistema CRISPR/Cas dos isolados locais de *Pseudomonas aeruginosa*.

Isolado	Genótipo CRISPR	Grupo	ST
Pae12	G9	E	244
Pae28	G6	D	3079
Pae29	G3	B	357
Pae39	G7	D	3079
Pae42	G16	B/E	357
Pae66	G1	A	3078
Pae74	G11	E	244
Pae83	G8	D	3079
Pae104	G12	E	620
Pae105	G13	E	244
Pae107	G17	E/D	3384
Pae110	G15	E	2234
Pae113	G2	A	3137
Pae114	G4	C	850
Pae115	G5	C	850
Pae116	G14	E	360
Pae127	G10	E	244

Apesar de alguns isolados comportarem os mesmos genes constitutivos, a exemplo da Pae12, Pae74, Pae105, e assim, serem considerados clones (ST 244), a história evolutiva de cada microrganismo é diferente, e o estudo do Sistema CRISPR/Cas nessa perspectiva permite conhecer e inferir as relações desses microrganismos junto aos MGEs, em uma visão mais individual.

A análise dos espaçadores gerou 17 genótipos, um para cada isolado de *P. aeruginosa*. Diante do resultado, foi observado que a análise do loco CRISPR na tipagem molecular, através dos seus espaçadores, não apresentou uma boa correlação com o método de MLST para *P. aeruginosa*.

Os grupos representados pelo Grupo E, reúnem quatro STs diferentes (244, 360, 620, 2234), Tabela 9 e 8. O Grupo A reúne dois STs (3078,3137), Tabela 8 e 10. Os demais Grupos, são representados por um ST cada (Tabela 8). Todos os isolados pertencentes ao ST 244 estão reunidos no grupo E; o ST 3079 pertence ao grupo D e o ST 850 ao grupo C. Ao comparar os STs entre si que compõe o grupo E, e os dois STs do grupo A, observou-se que os alelos gênicos do MLST não apresentaram semelhanças entre os grupos formados com base no CRISPR para *P. aeruginosa*.

Tabela 9. Comparação dos alelos gênicos avaliados no esquema de MLST para *P. aeruginosa* dos ST 244, 360, 620 2234, pertencentes ao grupo E. Cores iguais representam alelos gênicos iguais entre os STs.

Grupo E							
	Genes avaliados no MLST						
ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
244	17	5	12	3	14	4	7
360	15	5	36	11	27	4	2
620	9	7	63	13	8	7	8
2234	28	206	11	3	4	6	1

Tabela 10. Comparação dos alelos gênicos avaliados no esquema de MLST para *P. aeruginosa* dos ST 3137 e 3078, pertencentes ao grupo A. Cores iguais representam alelos gênicos iguais entre os STs.

Grupo A							
	Genes avaliados no MLST						
ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
3137	5	16	25	5	1	104	47
3078	18	4	134	33	1	6	4

As variações de bases entre os alelos dos STs do grupo E e do grupo A, respectivamente, podem ser visualizadas nas Tabelas 11 e 12 a seguir.

Tabela 11. Comparação do número de variações entre alelos gênicos dos STs do Grupo E.

Grupo E							
ST versus ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
224 x 360	Varia 1 base	Não variou	Varia 1 base	Varia 3 bases	Varia 5 bases	Não vario	Varia 1 base
244 x 2234	Varia 1 base	Varia 6 bases	Varia 2 bases	Não variou	Varia 3 bases	Varia 2 bases	Varia 1 base
360 x 2234	Varia 2 bases	Varia 6 bases	Varia 1 base	Varia 3 bases	Varia 2 bases	Varia 2 bases	Varia 2 bases

Tabela 12: Comparação do número de variações entre alelos gênicos dos STs do Grupo A.

Grupo A							
ST versus ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
3137 x 3078	Varia 2 bases	Varia 6 bases	Varia 3 bases	Varia 2 bases	Não vario	Varia 3 bases	Varia 7 bases

Diante da grande hipervariabilidade dos espaçadores dentro dos grupos, foi possível estabelecer 17 genótipos diferentes. A análise feita por MLST infere que os isolados que comportam os STs 244 e 850, pertençam aos mesmos clones, respectivamente. Entretanto, com base na tipagem por CRISPR, todos esses STs

apresentaram genótipos diferentes entre si, mesmo apresentando os mesmos genes constitutivos.

Não foi possível determinar uma possível rota de disseminação dos isolados caracterizados com base no CRISPR, como representado nas figuras 17 e 18 para os hospitais 1 e 2, respectivamente. Além disso, não foi possível estabelecer uma relação espaço-temporal, diferentemente do que foi observado com base na técnica de MLST.

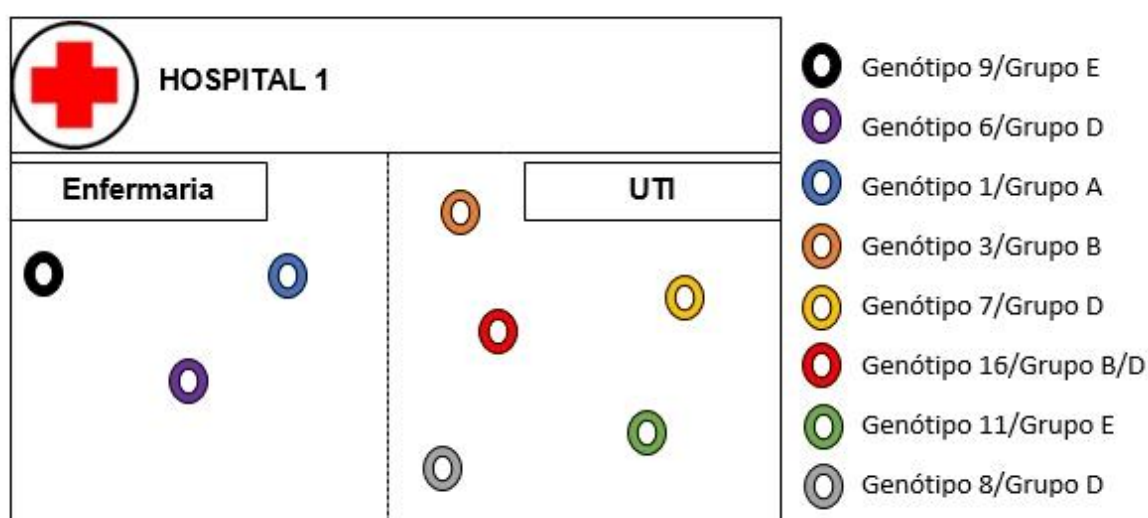


Figura 17: Mapa epidemiológico baseado na tipagem CRISPR para as cepas isoladas no Hospital 1.

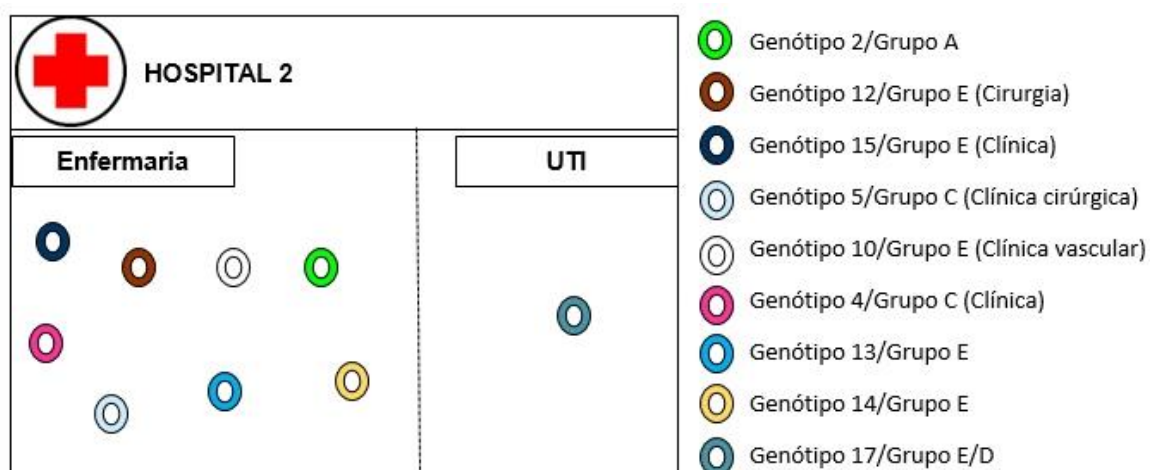


Figura 18: Mapa epidemiológico baseado na tipagem CRISPR para as cepas isoladas no Hospital 2.

Na figura 17, os genótipos 9, 6 e 1 encontrados na enfermaria pertencem a grupos diferentes, enquanto os genótipos encontrados na UTI compartilham grupos em comum. O genótipo 6, pertence ao mesmo grupo e ao mesmo ST do genótipo 7 e apesar de estarem em ambientes diferentes, foi observado uma dispersão não clonal e atemporal desses isolados.

Na figura 18, os setores de clínica, cirurgia e cardiologia, fazem parte da enfermaria e por isso foram agrupados como um só setor. Apesar de observamos isolados pertencentes ao grupo E/D tanto na UTI quanto na enfermaria, eles não pertencem aos mesmos genótipos. Na enfermaria, os genótipos 5 e 4 compartilham o grupo em comum (Grupo C), apresentam o mesmo ST, porém por apresentarem espaçadores diferentes entre si não pertenceram ao mesmo genótipo. Assim como no hospital 1, foi não possível inferir a possível rota de disseminação desses isolados no hospital 2, além de não ter sido observado uma disseminação inter-hospitalar dos isolados.

6. DISCUSSÃO

O sistema CRISPR/Cas se apresenta como um sistema imunológico bacteriano, o que torna fundamental seu estudo a fim de compreender suas relações evolutivas, funções e aplicações. Em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentam o sistema CRISPR/Cas, a prevalência do sistema I-F é difundido mundialmente, o que pode estar relacionado ao papel de proteção contra fagos lisogênicos e a inserção de espaçadores contra vírus líticos (Cady et al., 2012; England; Kim;Whitaker,2018).

A estrutura genética dos dois locos CRISPR (tipo I-F e tipo I-E) em *P. aeruginosa* já está bem estabelecido, bem como a presença de CRISPR órfão. Em particular, a cepa epidêmica Liverpool (LES), mundialmente conhecida devido a sua presença na América do Norte e Europa por infectar pacientes com fibrose cística, apresenta um arranjo CRISPR intacto do tipo I-F, bem conservado, mas não comportam genes *cas* associados, sugerindo uma perda ancestral parcial do sistema, tornando-o não funcional. O CRISPR ausente ou não funcional pode permitir que as cepas adquiram e mantenham a virulência (Van Belkum; England; Parkins, 2015).

No presente estudo, isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentaram CRISPR órfão e um isolado tipo I-E (Pae93) com características genéticas diferentes. A presença de CRISPR órfãos também foi observada em isolados clínicos brasileiros comportando o sistema I-F por Luz et al (2021), mas não foi possível estabelecer se esse contexto genético está intrinsecamente ligado ao sistema I-F.

England, Kim e Whitaker (2018) observaram que o uso do sistema CRISPR como defesa é mais frequentemente utilizado contra fagos lisogênicos do que contra fagos líticos, o que estaria relacionado ao tipo de pressão seletiva exercida entre bactéria e fago, a fim de desenvolver uma dinâmica evolutiva mais vantajosa, garantindo o *fitness* bacteriano em ambos os casos.

Na bactéria *Francisella novicida*, comportando o sistema tipo II, que inclui um loco CRISPR e a proteína Cas9, foi observado que esse sistema estaria atuando como regulador em processos de estresse à membrana bacteriana, promovendo resistência a determinados antibióticos, além de intensificar a

proteção do envelope celular. Esse papel alternativo do sistema CRISPR/Cas tem como consequência, a perda da função de imunidade adaptativa, gerando conhecimento sobre o sistema em diversos mecanismos essenciais para a adaptação bacteriana (Sampson et al., 2014).

Outros estudos realizados com bactérias patogênicas modelo foi possível observar que o sistema CRISPR/Cas apresenta funções variantes, as quais influenciam processos biológicos, muitos relacionados à fisiologia e regulação de genes (Westra; Buckling; Fineran, 2014).

Diante dessa variabilidade de função, a autoimunidade contra genes de virulência foi observada em bactérias como *Clostridium botulinum*, *Enterobacter* spp, entre outras, através do direcionamento de cRNAs, o que pode resultar em perdas cromossômicas. Uma vez que o sistema CRISPR/Cas encontra-se inativado, essa autoimunidade pode ser tolerada, impedindo a clivagem de seu próprio material genético (Sampson; Weiss, 2013).

Em relação a presença dos fagos inseridos nos genomas dos isolados, acredita-se que todos eles estejam lisogênicos, apesar de apenas os isolados Pae 114, Pae115 e Pae116 apresentarem genes anti-CRISPR, provavelmente advindo dos fagos JBD25, YMC11 e Phi297. As proteínas anti-CRISPR AcrF6 e AcrF7 pertencem à classe do genes *aca1*, que apresentam um mecanismo de inativação do sistema CRISPR/Cas na fase de interferência (Pawluk et al., 2016), havendo assim, a incorporação dos espaçadores específicos para os fagos, o que corrobora com os nossos dados, uma vez que a cepa Pae116 apresentou espaçadores específicos para os bacteriófagos JB25, YMC11 e Phi297 e a cepa Pae115 apresentou para o fago JBD25.

Em relação aos outros fagos encontrados no genoma bacteriano, já foi observado que fagos que não apresentam a capacidade de inativar o sistema CRISPR/Cas, através dos genes anti-CRISPR, podem se aproveitar dos fagos que possuem, por meio de uma reatividade cruzada, uma vez que, os espaçadores apresentam homologias a um determinado número de alvos, comumente relacionados, mas também podendo ser geneticamente distantes (Chevallereau et al., 2020).

Borges e Colaboradores (2018) mostraram que, por mais que existam fagos capazes de inativar o sistema CRISPR/Cas, inicialmente o resultado pode não ser eficaz. Dessa forma, é preciso uma concentração de tentativas abortivas fágicas, até que a quantidade de genes *acrs* seja suficiente para a inativação do mecanismo de defesa.

Em um estudo feito com cepas clínicas brasileiras de *P. aeruginosa* foi observado a presença de genes anti-CRISPR nos genomas analisados, inferindo que o sistema nesses isolados estaria ineficiente, devido a presença de fagos inseridos no genoma, além da presença de um espaçador com homologia a um gene próprio da bactéria, responsável pela codificação da proteína coproporfirinogênio oxidase III independente de oxigênio (Luz, 2019).

A análise por MLST evidenciou que os 12 isolados compreenderam nove diferentes genótipos, apresentando assim, uma população com distribuição não-clonal entre as cepas de *P. aeruginosa* em isolados brasileiros, o que corroborou com os estudos de Middleton e colaboradores (2018), Van Belkum e colaboradores (2015), Parkins e colaboradores (2018) e Feng e colaboradores (2017), com a presença de poucos complexos clonais.

Diante dos nossos resultados, o sistema CRISPR não se mostra efetivo na caracterização desses isolados, uma vez que a formação dos grupos, com base na análise do loco CRISPR foi composto por mais de um ST (grupos A e E) de maneira que os dados, além de não fornecerem um padrão de distribuição entre os STs de um mesmo grupo, não evidenciam subgrupos dentro de STs específicos.

Entretanto, em diversas outras espécies patogênicas de interesse médico, o CRISPR tem se mostrado eficaz, como observado no estudo realizado por Tomida e Colaboradores (2017), para a bactéria *Helicobacter cinaedi*, a qual está associada a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS). Através da análise dos espaçadores, foi possível inferir um perfil epidemiológico desses isolados, sua dispersão, além de apresentar um caráter discriminatório maior do que o observado com o MLST, contribuindo, assim, no controle de disseminação desse patógeno.

Em isolados clínicos brasileiros de *Acinetobacter baumannii*, o loco CRISPR foi utilizado para fins de tipagem molecular e comparação epidemiológica. Diante dos resultados, a técnica se mostrou eficiente para a caracterização dos isolados de *A. baumannii*. Entretanto, vale ressaltar que, dos 14 isolados clínicos analisados, 13 pertenciam ao mesmo ST (ST 113), e apenas um pertencia ao ST 25 e, apesar da pouca variabilidade de STs entre os isolados, foi possível evidenciar a presença de subgrupos entre os isolados que apresentaram o mesmo ST (Alves, 2019).

A descrição epidemiológica com base no loco CRISPR para *Pseudomonas aeruginosa* não se mostra efetiva como uma ferramenta molecular. Esta conclusão parte do fato de que dois dos cinco grupos formados são compostos por isolados que apresentam dois ou mais STs diferentes, além de não pertencerem ao mesmo

complexo clonal, ou seja, os grupos não compartilham, pelo menos, cinco ou mais alelos entre si, como observado nas tabelas 8 e 9 (Giske et al, 2006).

A comparação entre a técnica do MLST e as matrizes de espaçadores CRISPR apresentaram resultados muito divergentes, o que pode estar relacionado a uma distribuição não-uniforme do sistema CRISPR/Cas na espécie de *Pseudomonas aeruginosa* (Cady et al., 2011; Luz et al., 2019).

A fim de compreender melhor a atuação do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa*, o trabalho corroborou com outros achados na literatura em relação a prevalência dos tipos de sistemas CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*, sendo o tipo I-F, o mais difundido entre os isolados. Além disso, foi possível conhecer mais um pouco dessa grande diversidade de espaçadores presentes nesses isolados, contribuindo com a inserção de espaçadores não relatados em bibliotecas já publicadas. Foi possível estabelecer uma rota de disseminação a partir do MLST, reforçando a distribuição não-clonal das populações dessa espécie bacteriana.

7. CONCLUSÕES

- a) Nossos resultados demonstram que o sistema CRISPR/Cas tipo I-F foi o mais observado nos isolados clínicos locais de *Pseudomonas aeruginosa* estudados;
- b) A identificação das sequências espaçadoras presentes no genoma de isolados clínicos brasileiros, juntamente com a descrição de espaçadores nunca antes observados, reflete a grande diversidade de MGEs predatórios de *P. aeruginosa*.
- c) A presença de fagos incorporados nos genomas dos isolados de *P. aeruginosa* e a presença de proteínas anti-CRISPR, juntamente com a estrutura do loco intacta, sugerem uma possível inatividade do sistema ou desvantagem para bactéria;
- d) O uso do loco CRISPR/Cas como ferramenta de genotipagem para *P. aeruginosa* não se mostrou efetivo, uma vez que não foi possível estabelecer um padrão de individualização dos isolados.

Referências

- ANDREANI, N. A; FASOLATO, L. *Pseudomonas* and Related Genera. In: **The microbiological quality of food**. Woodhead Publishing, 2017. p. 25-59.
- BARR, H. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, v. 46, n. 4, p. 1046-1054, 2015.
- BARRANGOU, R; HORVATH, P. CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 143–162, 2012.
- BARROS, M. P. S.; FRANÇA, C. T.; LINS, R. H. F.B.; *et al.* Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- BEAURUELLE, C; PASTUSZKA, A; HORVATH, P; *et al.* CRISPR: A useful genetic feature to follow vaginal carriage of group B *Streptococcus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2017.
- BELKUM, A. V; SORIAGA, L. B; *et al.* Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-. v. 6, n. 6, p. 1–13, 2015.
- BHAYA, D; DAVISON, M; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea : Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. **Annual review of genetics**, 2011.
- BLAIR, J. M. A; WEBBER, M. A; BAYLAY, A. J; *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.
- BOLOTIN, A; QUINQUIS, B; SOROKIN, A; *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 1066, p. 2551–2561, 2005.
- BONDY-DENOMY, J; PAWLUK, A; MAXWELL, K. L.; *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 429–432, 2013.
- BORGES, A. L; DAVIDSON, A. R; BONDY-DENOMY, Joseph. The Discovery , Mechanisms , and Evolutionary Impact of anti-CRISPR. **Annual review of virology** 2017.
- BORGES, A.L; ZHANG, J. Y; *et al.* Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR- Article Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 917-925.e10, 2018.
- BURMISTRZ, M; PYRĆ, K. CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. **Polish journal of microbiology** v. 64, n. 3, p. 193–202, 2015.
- CADY, K. C.; BONDY-DENOMY, J; HEUSSLER, G. E.; *et al.* The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, p. 5728–5738, 2012.
- CADY, K. C.; WHITE, A. S.; HAMMOND, J. H.; *et al.* Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 430–437, 2011.
- CHARPENTIER, E; RICHTER, H; VAN DER OOST, J; *et al.* Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 3, p. 428–441, 2015.
- CHEN, J; LAU, Y. Y; KRISHNAN, T; *et al.* Recent Advances in Molecular Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* Infection by State-of-the-Art Genotyping

Techniques. **Frontiers in microbiology** v. 9, n. May, p. 1–8, 2018.

CHEVALLEREAU, A; MEADEN, S; *et al.* Exploitation of the Cooperative Behaviors of Anti- Article Exploitation of the Cooperative Behaviors of Anti-CRISPR Phages. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 2, p. 189-198.e6, 2020.

CHYLINSKI, K; MAKAROVA, K. S; CHARPENTIER, E; *et al.* Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. **Nucleic acids research** v. 42, n. 10, p. 6091–6105, 2014.

Crispr still needs microbiologists. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 641, 2018.

DEBARBIEUX, L; LEDUC, D; MAURA, D; *et al.* Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 7, p. 1096–1104, 2010.

DELTCHEVA, E; CHYLINSKI, K; SHARMA, C. M.; *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 2011.

ENGLAND, E.; KIM, T; WHITAKER, R. J. Metapopulation structure of CRISPR-Cas immunity in *Pseudomonas aeruginosa* and its viruses. **MSystems**, v. 3, n. 5, p. e00075-18, 2018.

ESSOH, C; BLOUIN, Y; LOUKOU, G; *et al.* The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages. **PLoS One** v. 8, n. 4, 2013.

FENG, W SUN, F; WANG, Q; *et al.* Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 8, p. 142–147, 2017.

FILLOUX, Alain; WALKER, John M. *Pseudomonas* IN Series Editor. [s.l.: s.n., s.d.].

FU, S; HILEY, L OCTAVIA, S; *et al.* Comparative genomics of Australian and international isolates of *Salmonella Typhimurium*: Correlation of core genome evolution with CRISPR and prophage profiles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

GRISSA, I; VERGNAUD, G; POURCEL, C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. **BMC bioinformatics** v. 10, p. 1–10, 2007.

GROENEN, P. M A; BUNSCHOTEN, A. E; SOOLINGEN, D. V; *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, p. 1057–1065, 1993.

HALE, C. R; ZHAO, P; OLSON, S; *et al.* RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 945–956, 2009.

HEUSSLER, E; CADY, K. C; KOEPPEN, K; *et al.* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Dependent , Biofilm-Specific Death of *Pseudomonas aeruginosa* Mediated by Increased Expression of Phage-Related Genes. **Mbio**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 2015.

HEUSSLER, G. E.; MILLER, J. L.; PRICE, C. E.; *et al.* Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Type I-F CRISPR-Cas Adaptation Determined Using a Biofilm Enrichment Assay. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 22, p. 3080–3090, 2016.

HILLE, F; CHARPENTIER, E. CRISPR-Cas : biology , mechanisms and relevance. **Philosophical transactions of the royal society B: biological science**, v. 371, n. 1707, p. 20150496, 2016.

KAKASIS, A; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for

- human infections. A comprehensive review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 1, p. 16–21, 2019.
- KHALIFA, L; SHLEZINGER, M; BEYTH, S; *et al.* Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. **Journal of Oral Microbiology**, v. 8, n. 1, 2016.
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 67–78, 2017.
- LANDSBERGER, M; GANDON, S; MEADEN, S; *et al.* Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 908-916.e12, 2018.
- LI, R; FANG, Lizhu; TAN, Shirui; *et al.* Type I CRISPR-Cas targets endogenous genes and regulates virulence to evade mammalian host immunity. **Nature Publishing Group**, p. 1273–1287, 2016.
- LUZ, A. C. O; DA SILVA, J. M. A; REZENDE, A. M; *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**, n. 0123456789, 2019.
- MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. 2006.
- MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; WOLF, Yuri I.; *et al.* Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biology Direct**, v. 6, p. 1–27, 2011.
- MAKAROVA, K. S.; HAFT, D. H.; BARRANGOU, Rodolphe; *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 2011.
- MAKAROVA, K. S.; WOLF, Yuri I.; ALKHNBASHI, Omer S.; *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722–736, 2015.
- MAKAROVA, K.S; GRISHIN, N. V; SHABALINA, Svetlana A; *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. 26, p. 1–26, 2006.
- MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55–61, 2015.
- MIDDLETON, M. A.; LAYEGHIFARD, M; KLINGEL, M; *et al.* Epidemiology of clonal *pseudomonas aeruginosa* infection in a canadian cystic fibrosis population. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 15, n. 7, p. 827–836, 2018.
- MORADALI, M. F; GHODS, S; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. February, 2017.
- PARKINS, M. D.; SOMAYAJI, R; WATERS, V. J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–38, 2018.
- PAWLUK, A; BONDY-DENOMY, J; CHEUNG, V. H W; *et al.* RESEARCH ARTICLE A New Group of Phage Anti-CRISPR Genes Inhibits the Type I-E CRISPR-Cas System of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mbio**, v. 5, n. 2, p. 1–7, 2014.
- PAWLUK, A; DAVIDSON, A. R.; MAXWELL, K. L. Anti-CRISPR: Discovery, mechanism and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12–17, 2018.
- PAWLUK, A; STAALS, R. H.J.; TAYLOR, C; *et al.* Inactivation of CRISPR-Cas

- systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 8, p. 1–6, 2016.
- PEIX, A; RAMÍREZ-BAHENA, M.H; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1132–1147, 2009.
- RELLO, J; PARISELLA, F.R; PEREZ, A. Alternatives to antibiotics in an era of difficult-to-treat resistance: new insights. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 7, p. 635–642, 2019.
- RICHTER, C; CHANG, J. T.; FINERAN, P. 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.
- ROSENTHAL, V. D; AL-ABDELY, H. M.; EL-KHOLY, A. A; *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010–2015: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, 2016.
- SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. Alternative Roles for CRISPR/Cas Systems in Bacterial Pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 9–11, 2013.
- SAMPSON, T. R; NAPIER, B. A; SCHROEDER, M. R; *et al.* A CRISPR-Cas system enhances envelope integrity mediating antibiotic resistance and inflammasome evasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. 11163–11168, 2014.
- SAMSON, J. E.; MAGADÁN, A. H.; SABRI, M; *et al.* Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 675–687, 2013
- SASHITAL, D. G; WIEDENHEFT, B; DOUDNA, J.A. Article Mechanism of Foreign DNA Selection in a Bacterial Adaptive Immune System. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 606–615, 2012.
- SHMAKOV, S; SMARGON, A; SCOTT, D; *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Publishing Group**, 2017.
- SILBY, M. W.; WINSTANLEY, C; GODFREY, S. A C; *et al.* *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652–680, 2011.
- SOREK, R; LAWRENCE, C. M; WIEDENHEFT, B. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. 2013.
- STANLEY, S. Y; MAXWELL, K. L. Phage-Encoded Anti-CRISPR Defenses. 2018.
- TOMIDA, J; MORITA, Y; SHIBAYAMA, K; *et al.* Diversity and microevolution of CRISPR loci in *Helicobacter cinaedi*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2017.
- TRASANIDOU, D; GERÓS, A. S; MOHANRAJU, P; *et al.* Keeping crispr in check: diverse mechanisms of phage-encoded anti-crisprs. **FEMS microbiology letters**, v. 366, n. 9, 2019.
- TURNER, K. H.; EVERETT, J; TRIVEDI, U; *et al.* Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 7, 2014.
- VAN BELKUM, A; SORIAGA, L. B; LAFAVE, M. C; *et al.* Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 6, n. 6, p. 1–13, 2015.
- VISWANATHAN, P; MURPHY, K; JULIEN, B; *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, n. 10, p. 3738–3750, 2007.

- VÍTOR, J. M.B.; VALE, F. F. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: Probiotics and phytomedicine. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 153–164, 2011.
- WEINBERGER, A. D; WOLF, Y. I; LOBKOVSKY, A.E; *et al.* Viral Diversity Threshold for Adaptive Immunity in Prokaryotes. **Mbio**, v. 3, n. 6, p. 1–10, 2012.
- WESTRA, E. R; DOWLING, A. J; BRONIEWSKI, J. M; *et al.* Evolution and Ecology of CRISPR. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 47, p. 307-331, 2016.
- WESTRA, E.R.; BUCKLING, A; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas systems: Beyond adaptive immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 317–326, 2014.
- YOSEF, I; GOREN, M. G; QIMRON, U; *et al.* Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 12, p. 2–5, 2012.

Apêndices

APÊNDICE 1. Material suplementar – Biblioteca de espaçadores formadas pelos 1203 espaçadores observados em *Pseudomonas aeruginosa*.

Disponível em:

<https://drive.google.com/file/d/1GgdYRPeH9xobHkjb6RWwHL0rJX3GyjNa/view?usp=sharing>

APÊNDICE 2. Espaçadores encontrados nos 12 isolados do presente estudo.

Disponível em:

<https://drive.google.com/file/d/1J0sbFEvy2IUNoluj2tcF5T50vXZX5w-w/view?usp=sharing>.

Anexos

ANEXO 1. isolados de *P. aeruginosa* classificados previamente por Luz e colaboradores (2019) e organizados em subclassificações dentro de grupos através da ordem dos espaçadores.

Disponível em: <https://drive.google.com/drive/folders/1ZoqoWMpwumV-glTeuH3G82WOC3EOcW5X?usp=sharing>