



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

KAMYLLE CYNARA TAVARES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS DO
SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Recife
2024



KAMYLLE CYNNARA TAVARES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS DO
SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Msc. Julia Mariana Assis da Silva

Coorientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Kamylye Cynnara Tavares da.

Investigação de mecanismos regulatórios do sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Kamylye Cynnara Tavares da
Silva. - Recife, 2024.

66 p. : il.

Orientador(a): Julia Mariana Assis da Silva

Coorientador(a): Tereza Cristina Leal Balbino

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Bactérias. 2. Genética de microrganismos. 3. Biologia molecular . 4.
Terapias . 5. Expressão gênica. I. Silva, Julia Mariana Assis da . (Orientação). II.
Balbino, Tereza Cristina Leal . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)



KAMYLLÉ CYNARA TAVARES DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS REGULATÓRIOS DO SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 01/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Msc. Julia Mariana Assis da Silva
Instituto Aggeu Magalhães - IAM/ Fiocruz-PE

Dra. Hemilly Rayanne Ferreira da Silva
Instituto Aggeu Magalhães - IAM/ Fiocruz-PE

Msc. Maria Izabely Pimentel
Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana, CCS, UFPE



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me conduzido durante toda a graduação, para que eu pudesse trilhar novos caminhos e celebrar minhas conquistas, sendo também o meu maior sustento nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Msc. Julia Mariana Assis da Silva, agradeço pela paciência e ensinamento durante os anos que trabalhamos juntas. Por ter sido mais que uma orientadora, e sim uma amiga durante esse processo. Registro minha gratidão, carinho e admiração pela excelente profissional que és.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Tereza Cristina Leal Balbino, pela oportunidade que me foi concedida de participar do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e confiança.

Aos meus pais, Regina e Claudio, por serem meu porto seguro e meus maiores apoiadores em todos os momentos da minha vida. Eles, que são minha maior fonte de inspiração e o meu combustível diário para seguir diante de todas as situações. Sem vocês, nada disso seria possível, por isso registro todo o meu amor e gratidão.

Agradeço aos meus irmãos, Manuella, Victor e Zanatha, por celebrarem juntamente comigo cada objetivo alcançado.

Ao meu namorado, Wandemberg, agradeço pelos conselhos, conforto e carinho. Por ter sido essencial nessa jornada e ser um exemplo de biomédico para mim.

Agradeço às minhas avós, Rosa e Marinalva, por serem o exemplo da educação na família e pelo incentivo a sempre persistir nos estudos. Minha avó Rosa, que hoje festeja nos céus a minha vitória, lembrarei sempre de todas as suas ajudas nas minhas tarefas e provas.

Minha eterna gratidão aos meus amigos de curso, Marina, Brenda, Saulo, Larissa e João Victor. Vocês foram imprescindíveis para que eu pudesse ultrapassar diversos obstáculos. Obrigada pelo suporte nos dias difíceis e pelas risadas compartilhadas em inúmeros momentos. E à minha amiga de vida, Ana



Carolina, agradeço por estar presente nos momentos que eu precisei e acreditar no meu potencial.

Gostaria de agradecer ao PET Parasitologia, por ter sido fundamental no meu crescimento profissional e acadêmico. Foi uma experiência maravilhosa trocar ideias e experiências.

Ao órgão de fomento CNPq, pelo oferecimento da bolsa e recursos financeiros para que este trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço a todos os docentes da Universidade Federal de Pernambuco que contribuíram para a minha formação, por toda dedicação em cada aula transmitida. E aos profissionais do Instituto Aggeu Magalhães que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão desse projeto.



SILVA, Kamyllé Cynnara Tavares da. **Investigação de Mecanismos Regulatórios do Sistema CRISPR/Cas em Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2024. 65 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador, responsável por causar uma gama de infecções hospitalares, apresentando como característica sua multirresistência. Pertencente ao grupo de bactérias ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), esse microrganismo possui alta capacidade de adquirir resistência a várias classes de antimicrobianos e de formar biofilmes. O sistema CRISPR/Cas corresponde a uma maquinaria adaptativa de defesa aos procariontos, que fornece imunidade contra a invasão por elementos genéticos móveis (EGMs), a exemplo de bacteriófagos e plasmídeos. O seu funcionamento ocorre diante da incorporação de novas sequências espaçadoras, derivadas dos EGMs invasores, e posterior degradação de sequências correspondentes aos fragmentos adquiridos. Devido aos desafios para o combate das infecções por *P. aeruginosa*, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No entanto, para o desenvolvimento eficaz de tais métodos, é necessário compreender os mecanismos pelos quais as bactérias conseguem se proteger, tais como a detecção de *Quorum sensing* e o sistema CRISPR/Cas. O objetivo deste estudo é investigar mecanismos regulatórios do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso, foram obtidos de trabalhos anteriores cinco isolados clínicos de *P. aeruginosa* portadores dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E em seus genomas. A técnica de RT-PCR foi utilizada para a avaliação qualitativa da expressão de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas, *Quorum sensing* (QS) e ao mecanismo de produção de biofilme. Reações de PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizadas para avaliar os níveis de expressão relativa dos referidos genes sob baixa e alta densidade, bem como na presença de autoindutores e inibidores de QS. A análise de dados foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e os testes estatísticos, T-Student e Anova, foram utilizados para avaliar a significância dos resultados. A análise qualitativa da expressão gênica demonstrou que os cinco isolados estão expressando todos os genes investigados. A análise da expressão relativa de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas, QS e genes de ativação de biofilme, evidenciou nos cinco isolados estudados que esses mecanismos são preferencialmente ativos diante de um aumento populacional bacteriano. No entanto, o perfil da expressão de genes associados aos sistemas CRISPR/Cas e QS foi diverso entre os isolados, mas a maioria dos resultados indicam a atuação de autoindutores na regulação da expressão gênica. Diante disso, estudos adicionais são necessários para esclarecer a atuação dessas moléculas na regulação do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Expressão gênica. *Quorum sensing*. Resistência. CRISPR/Cas. Regulação.



SILVA, Kamylye Cynnara Tavares da. **Investigation of Regulatory Mechanisms of the CRISPR/Cas System in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. 2024. 65 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative, non-fermenting bacillus responsible for causing a wide range of hospital infections, characterized by its multidrug resistance. Belonging to the group of ESKAPE bacteria (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), this microorganism has a high capacity to acquire resistance to various classes of antimicrobials and to form biofilms. The CRISPR/Cas system is an adaptive defense machinery in prokaryotes, providing immunity against the invasion of mobile genetic elements (MGEs), such as bacteriophages and plasmids. Its function involves the incorporation of new spacer sequences, derived from invading MGEs, followed by the degradation of sequences corresponding to the acquired fragments. Due to the challenges in combating *P. aeruginosa* infections, the development of new therapeutic strategies is necessary. However, for the effective development of such methods, it is essential to understand the mechanisms by which bacteria protect themselves, such as Quorum sensing detection and the CRISPR/Cas system. The aim of this study is to investigate the regulatory mechanisms of the CRISPR/Cas system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. For this purpose, five clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying CRISPR/Cas type I-F and I-E systems in their genomes were obtained from previous studies. The RT-PCR technique was used to qualitatively assess the expression of genes related to CRISPR/Cas systems, Quorum sensing (QS), and biofilm production mechanisms. Real-time PCR (qPCR) reactions were performed to evaluate the relative expression levels of these genes under low and high density, as well as in the presence of autoinducers and QS inhibitors. Data analysis was conducted using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and statistical tests, T-Student and ANOVA, were used to assess the significance of the results. The qualitative analysis of gene expression demonstrated that all five isolates expressed the investigated genes. The analysis of the relative expression of genes related to CRISPR/Cas systems, QS, and biofilm activation genes revealed that in all five isolates, these mechanisms are preferentially active in response to an increase in bacterial population density. However, the expression profile of genes associated with CRISPR/Cas systems and QS varied among the isolates, but most results indicate the involvement of autoinducers in gene regulation. Therefore, further studies are necessary to clarify the role of these molecules in regulating the CRISPR/Cas system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Gene expression. *Quorum sensing*. Resistance. CRISPR/Cas. Regulation.



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo do <i>locus</i> CRISPR e seus elementos adjacentes	19
Figura 2 – Sistemas CRISPR/Cas de classes 1 e 2 e sua organização modular	22
Figura 3 – Funcionamento do sistema CRISPR/Cas	23
Figura 4 – Bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em micrografia eletrônica de varredura (MEV) colorida	25
Figura 5 – Sistemas <i>Quorum Sensing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e moléculas associadas à patogênese do biofilme	30
Figura 6 – Circuitos <i>Quorum sensing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figura 7 – Curva de crescimento dos cinco isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figura 8 – Gel representativo dos produtos de RT-PCR para os genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas	41
Figura 9 – Gel representativo dos produtos de RT-PCR para os genes relacionados ao sistema <i>Quorum Sensing</i> e genes de ativação de biofilme	42
Figura 10 – Gráfico de amplificação do gene <i>rpsL</i> em ensaio de padronização	43
Figura 11 – Expressão relativa dos genes <i>cas1f</i> , <i>cas3f</i> e <i>cas8f</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos	44
Figura 12 – Expressão relativa dos genes <i>cas1e</i> , <i>cas3e</i> e <i>cas8e</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos	46
Figura 13 – Expressão relativa dos genes <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> e <i>rhlR</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos	48
Figura 14 – Expressão relativa dos genes <i>amrZ</i> , <i>algB</i> , <i>algR</i> e <i>algU</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos	50
Figura 15 – Expressão relativa dos genes <i>cas1e</i> , <i>cas8e</i> e <i>cas3e</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos na presença de AI e inibidores de QS	52
Figura 16 – Expressão relativa dos genes <i>cas1f</i> , <i>cas3f</i> e <i>cas8f</i> em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CRISPR/Cas positivos na presença AI e inibidores de QS	53



Figura 17 – Expressão relativa dos genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos na presença de AI e inibidores de QS



LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* utilizados no estudo 34

Quadro 2 – Oligonucleotídeos desenhados para os genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas, de Biofilme e *Quorum sensing* utilizados nas reações de qRT-PCR 36



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Autoindutores
BHI	Brain Heart Infusion (Caldo Cérebro Coração)
Cas	<i>CRISPR-associated</i> (Proteína associada ao CRISPR)
cDNA	DNA complementar
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)
crRNA	RNA CRISPR
crRNP	<i>CRISPR Ribonucleoprotein Complexes</i> (Complexo Ribonucleoproteico CRISPR)
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DR	<i>Direct Repeat</i> (Repetição Direta)
eDNA	DNA extracelular
EGM	Elemento Genético Móvel
EPS	Exopolissacarídeos
FC	Fibrose Cística
gDNA	DNA genômico
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
LB	Caldo Luria Bertani
Mpb	Mega pares de bases
LPS	Lipopolissacarídeos
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i> (Motivo Adjacente ao Protoespaçador)
pb	Pares de base



PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i> (PCR quantitativa em Tempo Real)
QS	<i>Quorum sensing</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> (Transcriptase Reversa)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i> (Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase)
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	18
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Tipo de Estudo.....	34
4.2 Coleta de dados.....	34
4.2.1 Amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4.2.2 Curva de crescimento bacteriano.....	35
4.2.3 Extração do RNA total bacteriano e Síntese de cDNA.....	35
4.2.4 RT-PCR e PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	36
4.3 Análise de dados	38
4.3.1 Parâmetros Analíticos da qPCR.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Avaliação do crescimento celular.....	40
5.2 Avaliação qualitativa da expressão de genes envolvidos na produção de biofilme, mecanismo de <i>Quorum sensing</i> e Sistema CRISPR/Cas	40
5.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> cultivados em baixa e alta densidade	43
5.4.1 Expressão relativa dos genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> cultivados sob diferentes densidades	43
5.4.2 Expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de <i>Quorum Sensing</i> em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> cultivados sob diferentes densidades	47
5.4.3 Expressão relativa dos genes de ativação de biofilme em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> cultivados sob diferentes densidades	49



5.5 Avaliação quantitativa da expressão gênica em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> cultivados na presença de AI e inibidores de QS.....	51
5.5.1 <i>Expressão relativa dos genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas subtipo I-E e I-F na presença de substâncias autoindutoras e inibidoras que QS</i>	51
5.5.2 <i>Expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de Quorum Sensing na presença de substâncias autoindutoras e inibidoras de QS</i> ...	53
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador, conhecido por sua alta prevalência em infecções hospitalares, sendo classificado na categoria de maior prioridade, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), na lista de patógenos prioritários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Karruli *et al.*, 2023; Organização Mundial de Saúde, 2024). Esse patógeno oportunista faz parte do grupo ESKAPE, conjunto de seis microrganismos (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), caracterizados pela resistência em evolução e ameaça significativa à saúde global, visto que seus fatores de virulência e de resistência desempenham um papel fundamental na sua patogênese (Karruli *et al.*, 2023).

Devido à ampla variedade de mecanismos de adaptação, sobrevivência, resistência a várias classes de antibióticos, e capacidade em formar biofilmes, o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* é desafiador. Diante disso, é urgente a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas, como a utilização de inibidores de *Quorum sensing* (QS), bem como aprimorar terapias alternativas já existentes, como é o caso da fagoterapia (Pang *et al.*, 2019). No entanto, para o desenvolvimento eficaz de tais métodos de tratamento, é necessário a compreensão dos mecanismos de proteção bacterianos, tais como a detecção de *Quorum Sensing*, e o sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins*) (Hatoum-Aslam e Marraffini, 2014; Mccourt *et al.*, 2014; Moradali, Ghods e Rehm, 2017; Pang *et al.*, 2019).

Quorum sensing é um sofisticado mecanismo de comunicação bacteriana que permite a coordenação de comportamentos coletivos em resposta à densidade populacional, através da produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras chamadas autoindutores (AI) (Miller *et al.*, 2001).

O sistema CRISPR/Cas é considerado uma maquinaria adaptativa de defesa aos procariotos, como arqueas e bactérias, que fornece imunidade específica contra invasão de elementos genéticos móveis estranhos e indesejados, a exemplo de bacteriófagos, plasmídeos e transposons (Devi, Harjai e Chhibber, 2022; Sampson e Weiss, 2014). Esse sistema é composto por dois

componentes: o *locus* CRISPR, que funciona como uma memória genética, e as proteínas Cas, que fornecem a maquinaria necessária ao funcionamento do sistema (Westra, Buckling e Fineran, 2014).

O funcionamento do sistema ocorre em três etapas principais: adaptação, expressão e interferência. A etapa de adaptação é iniciada no primeiro contato entre a bactéria e o elemento genético móvel (EGM) invasor. Nessa etapa, novas sequências espaçadoras, derivadas dos EGMs, são adicionadas ao *locus* CRISPR (Burmistrz e Pyrc, 2015; Dy *et al.*, 2014; Westra, Buckling e Fineran, 2014). Durante a etapa de expressão, acontece a transcrição do *locus* CRISPR em uma grande molécula de RNA, que em seguida é processada e clivada em fragmentos curtos de RNAs CRISPR (crRNAs). Na etapa de interferência, os crRNAs se associam a proteínas Cas, formando o complexo proteico efetor, que atuará no reconhecimento da molécula alvo, ocasionando a sua clivagem (Van Der Oost *et al.*, 2014; Westra, Buckling e Fineran, 2014).

O sistema CRISPR/Cas atualmente é classificado em 6 tipos e 33 subtipos, divididos dentro de duas classes (Makarova *et al.*, 2020). Aproximadamente 30% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* possuem o Sistema CRISPR/Cas, sendo este do Tipo I. Em sua grande maioria, o subtipo presente nos genomas de *P. aeruginosa* é o I-F, seguido pelo subtipo I-E (Cady *et al.*, 2012; Hatoum-Aslam e Marraffini, 2014; Eshoh *et al.*, 2013).

Apesar de amplamente pesquisado ao longo das últimas décadas, o funcionamento do sistema CRISPR/Cas e os mecanismos que regulam sua atividade, até o momento, não foram completamente compreendidos. Em 2017, Høyland-Kroghsbo e colaboradores, observaram que para ativar a expressão, atividade e adaptação do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*, é empregado um processo de comunicação célula-célula, conhecido como *Quorum sensing* (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2017).

Em 2019, Borges e colaboradores descreveram sobre a supressão do sistema CRISPR/Cas por uma via associada à formação do biofilme (Borges *et al.*, 2019). Contudo, o conhecimento existente sobre o funcionamento e regulação do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa* baseia-se, principalmente, em estudos com a cepa UCBPP-PA14, que possui um sistema do subtipo I-F, sendo escassas as informações sobre o sistema subtipo I-E. Diante deste cenário, o presente trabalho propõe avaliar possíveis mecanismos regulatórios para os sistemas

CRISPR/Cas tipos I-F e I-E em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 O SISTEMA CRISPR/Cas

2.1.1 Introdução ao Sistema e sua descoberta

O sistema CRISPR/Cas corresponde a uma maquinaria de defesa que fornece imunidade adaptativa e hereditária contra ácidos nucleicos exógenos (Devi, Harjai e Chhibber, 2022). Devido a essa capacidade de armazenar memória de infecções anteriores, quando submetidos a uma reinfecção, esses sistemas recrutam enzimas que são responsáveis por degradar especificamente ácidos nucleicos de EGMs invasores (Hille *et al.*, 2018).

Em 1987, Ishino e colaboradores identificaram pela primeira vez uma estrutura de nucleotídeos peculiar, localizada adjacente ao gene *iap* em *Escherichia coli* K12. Essa estrutura consistia em repetições palindrômicas separadas por sequências espaçadoras únicas (Ishino *et al.*, 1987). Com o avanço das pesquisas, estruturas semelhantes foram detectadas em uma variedade de espécies bacterianas e arqueas. No entanto, durante esse período inicial de descoberta, a função biológica dessas sequências ainda não era compreendida (Groenen *et al.*, 1993; Hoe *et al.*, 1999; Mojica *et al.*, 1995).

Em uma análise genômica realizada em 2002, Jansen e colaboradores identificaram uma família de sequências repetitivas de DNA, observadas em várias espécies de bactérias e arqueas, e introduziram o termo CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, em inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para descrevê-las (Jansen *et al.*, 2002).

Ao longo dos anos, foram descobertos genes específicos em procariotos que estavam sempre próximos a essas sequências CRISPR, sugerindo uma possível ligação funcional entre eles. Esses genes foram identificados e nomeados como *cas* (genes associados ao CRISPR) (Haft *et al.*, 2005).

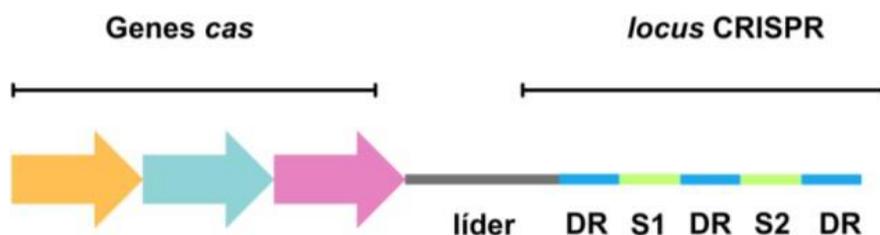
Diante da observação de que as sequências espaçadoras dos *loci* CRISPR se assemelhavam a fragmentos de DNA de origem extracromossômica, especialmente aqueles derivados de fagos e plasmídeos, foi formulada a hipótese de que o sistema CRISPR/Cas serviria como um mecanismo de defesa adaptativo em procariotos e arqueas (Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2005). Estudos subsequentes confirmaram essa hipótese e, desde então, além da imunidade, outras funções têm sido atribuídas ao sistema CRISPR/Cas, como a regulação da expressão gênica endógena (Barrangou *et al.*, 2007; Horvath e Barrangou, 2010; Westra, Buckling e Fineran, 2014).

De acordo com informações de 2022 do banco de dados CRISPR, esse sistema é encontrado no genoma da maioria das espécies de arqueas (87% das espécies analisadas) e em cerca de metade das espécies bacterianas (45% das espécies analisadas) (CRISPRCasdb, 2022).

2.1.1 Componentes do Sistema CRISPR/Cas

O sistema CRISPR/Cas é formado por dois componentes: o *locus* CRISPR, que funciona como um arquivo de informações genéticas, armazenando dados sobre invasões anteriores, e as proteínas Cas, que funcionam como o centro catalítico essencial do sistema. O arranjo CRISPR corresponde a um *locus* de DNA que contém sequências repetidas curtas, altamente conservadas, intercaladas por sequências variáveis derivadas de elementos genéticos móveis invasores (Figura 1) (Burmistrz e Pyrc, 2015; Westra, Buckling e Fineran, 2014).

Figura 1. Esquema ilustrativo do *locus* CRISPR e seus elementos adjacentes



Fonte: a autora.

Legenda: Componentes do *locus* CRISPR: em cinza está a sequência líder (líder); em azul estão

as Repetições Diretas (DR) e em verde os espaçadores (S1 e S2). As setas coloridas representam os genes *cas*.

Os genes *cas* codificam proteínas que fornecem o sistema enzimático necessário para a inserção de novos espaçadores e a eliminação de elementos genéticos invasores. Essa família de proteínas abrange domínios funcionais de polimerases, helicases, nucleases, além de domínios de ligação a RNA e DNA, e também domínios relacionados à regulação da transcrição (Barrangou e Marraffini, 2014; Makarova *et al.*, 2006; Richter, Chang e Fineran, 2012). Esses genes estão localizados adjacentes ao *locus* CRISPR, podendo estar tanto ao seu redor quanto a algumas centenas de pares de bases de distância (Haft *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002; Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008).

Na extremidade do arranjo CRISPR encontra-se a região promotora, denominada sequência líder. Com aproximadamente 200 a 500 pares de base (pb), essa sequência é altamente conservada e rica em adenina e timina. Esse segmento desempenha um papel crucial tanto na transcrição do *locus* CRISPR, quanto na incorporação de novos espaçadores. Usualmente, a primeira Repetição Direta (DR), que é a mais distante da sequência líder e a primeira cronologicamente, apresenta bases nucleotídicas que não seguem o padrão típico em relação à sequência das demais (Jansen *et al.*, 2002; Rath *et al.*, 2015; Richter, Chang e Fineran, 2012).

As Repetições Diretas (DR) são as sequências repetidas curtas presentes nos *loci* CRISPR e têm aproximadamente de 24 a 48 pares de base (pb). Essas DRs possuem uma simetria nas extremidades que geralmente inclui as sequências complementares GTT e AAC, além de trechos de três ou quatro bases idênticas, principalmente resíduos de A ou T. (Jansen *et al.*, 2002; Kunin, Sorek e Hugenholtz, 2007). Dentro de um *locus* CRISPR, as DRs são, em geral, bastante semelhantes, e embora possam apresentar variações entre diferentes espécies, elas são classificadas com base na similaridade das sequências e na capacidade de formar estruturas secundárias estáveis (Sorek, Kunin e Hugenholtz, 2008).

Nos *loci* CRISPR, os espaçadores são sequências únicas, que variam de 21 a 72 pb. Essas sequências demonstram uma elevada semelhança com ácidos nucleicos exógenos, como plasmídeos, genomas de bacteriófagos e outros elementos extracromossômicos. No entanto, a origem de muitos desses

espaçadores ainda é incerta, já que não correspondem a sequências conhecidas em outros organismos (Burmistrz e Pyrc, 2015; Richter, Chang e Fineran, 2012). Dependendo da espécie ou cepa bacteriana, o número de espaçadores presentes em um *locus* é variável (Burmistrz e Pyrc, 2015).

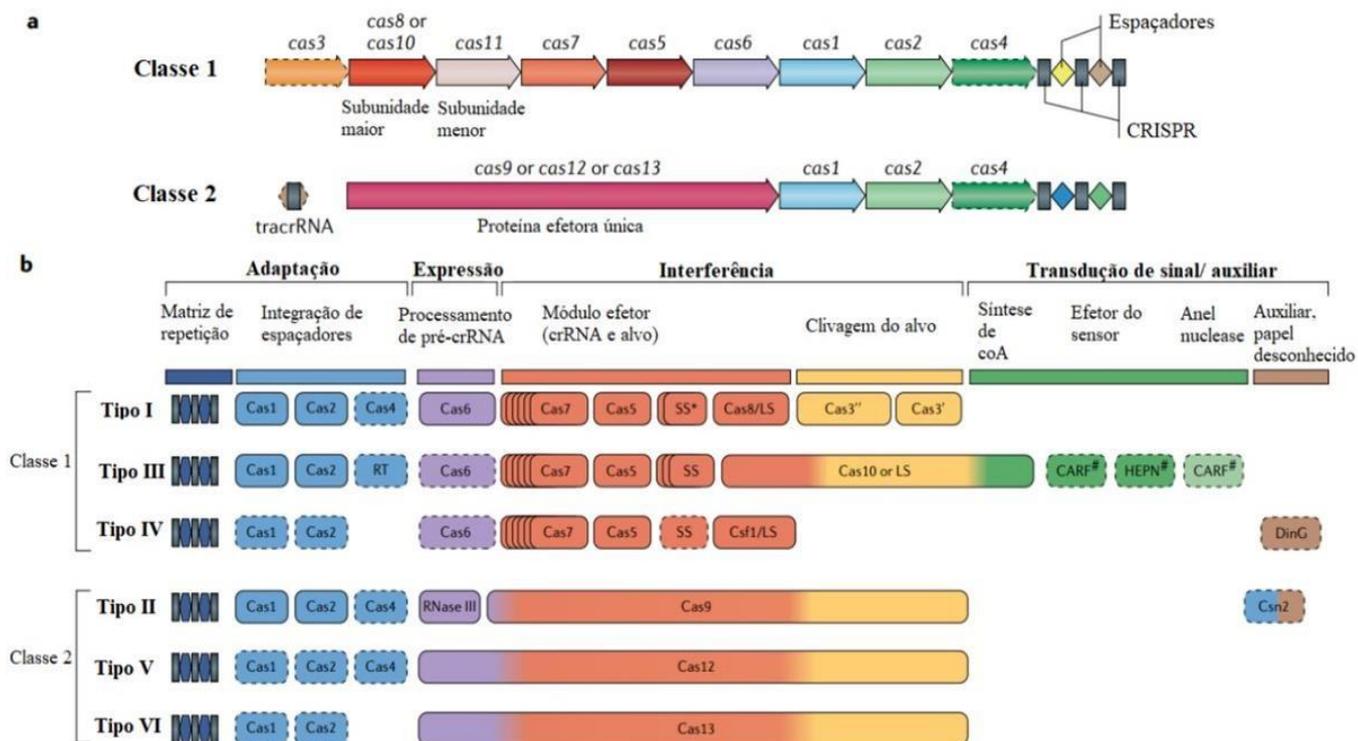
2.1.2 Classificação do Sistema

Inicialmente, o sistema foi classificado em três tipos principais: sistema CRISPR/Cas Tipo I, Tipo II e Tipo III; além de onze subtipos distintos (IA-F, IIA-C e IIIA-B). As proteínas Cas1 e Cas2 são amplamente encontradas em todos os sistemas CRISPR/Cas. Cada tipo e subtipo de sistema possui um gene característico identificado como sua assinatura específica (Makarova *et al.*, 2011; Makarova, Wolf e Koonin, 2013).

Posteriormente, a classificação do sistema CRISPR/Cas passou por uma atualização, resultando na sua divisão em duas categorias principais: Classe I, inclui os sistemas que possuem um complexo efetor formado por várias subunidades de proteínas Cas, e Classe II, os sistemas nos quais o complexo proteico efetor (chamado de *CRISPR Ribonucleoprotein* - crRNP) é constituído por uma única proteína. Além disso, foram incluídos mais dois tipos de sistema CRISPR/Cas (Tipo IV e Tipo V) e mais cinco subtipos, que pertencem à classe 1 e à classe 2, respectivamente (Makarova *et al.*, 2015).

A classificação atual do sistema CRISPR/Cas se fundamenta na estrutura do módulo efetor, que inclui proteínas responsáveis pelo processamento do pré-crRNA e pela identificação e destruição do DNA alvo. Assim, o sistema é atualmente dividido em 6 tipos e 33 subtipos, dentro de duas classes, conforme demonstrado na Figura 2 (Koonin e Makarova, 2017; Koonin, Makarova e Zhang, 2017; Makarova *et al.*, 2020; Wu, Y. *et al.*, 2021).

Figura 2. Sistemas CRISPR/Cas de classes 1 e 2 e sua organização modular



Fonte: Adaptado de Makarova *et al.* (2020, tradução autora).

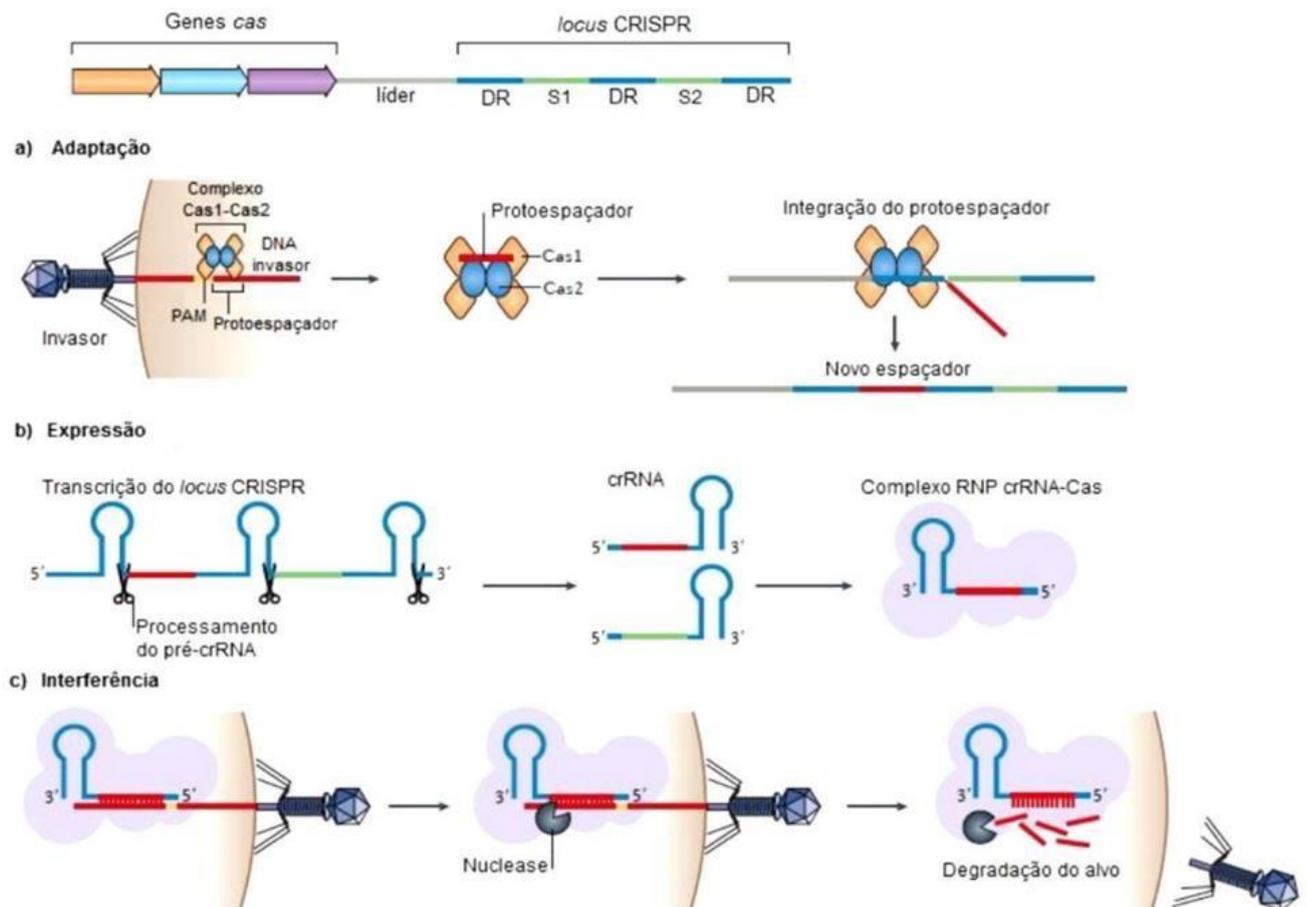
Legenda: (a) Estrutura dos loci CRISPR/Cas das classes 1 e 2, com os genes *cas* representados por setas. (b) Relação entre a organização genômica, funcional e estrutural dos sistemas CRISPR/Cas das classes 1 e 2. Componentes não essenciais estão destacados com contorno tracejado. O símbolo “#” indica componentes que fazem parte da mesma via de sinalização.

Nessa classificação, são identificados genes característicos para cada tipo e subtipo de CRISPR-Cas, além da comparação dos repertórios de genes e da organização dos *loci* genômicos. Também são utilizados o agrupamento por similaridade de sequência e a análise filogenética dos genes conservados em distintos conjuntos de sistemas CRISPR-Cas (Koonin e Makarova, 2017; Koonin, Makarova e Zhang, 2017; Koonin, Makarova e Koonin, 2019; Makarova *et al.*, 2020).

2.1.3 Dinâmica de Funcionamento do Sistema

A defesa imunológica realizada pelo sistema CRISPR/Cas acontece em três etapas principais: adaptação, expressão e interferência. O início do mecanismo de ação ocorre na etapa de adaptação, quando a bactéria tem o primeiro contato com o EGM invasor, podendo ser um bacteriófago (fago) ou plasmídeo. Nesse processo ocorre a aquisição e incorporação de um novo espaçador ao *locus* CRISPR, que serve como um molde para gerar um RNA CRISPR (crRNA). Para isso, as proteínas Cas1 e Cas2 se ligam à molécula de DNA ou RNA alvo (Figura 3) (Amitai e Sorek, 2016; Van Der Oost *et al.*, 2014).

Figura 3. Funcionamento do sistema CRISPR/Cas



Fonte: Adaptado de Amitai e Sorek (2016, tradução autora).

Legenda: Os sistemas CRISPR-Cas funcionam em três etapas principais: a) adaptação, onde ocorre a aquisição do espaçador e inserção na sequência CRISPR; b) expressão, onde o pré-crRNA é transcrito e processado em crRNAs maduros; c) interferência, onde os crRNAs maduros e as proteínas Cas formam um complexo que reconhece e corta o DNA invasor para sua degradação. **DR** - Repetição Direta; **PAM** – Motivo Adjacente ao Protoespaçador; **crRNA** – RNA CRISPR; **RNP** – Complexo efetor formado por proteínas Cas juntamente com o crRNA; **S1** e **S2**

correspondem a diferentes espaçadores.

Ao identificarem uma pequena sequência de 2 a 4 pares de bases conhecida como PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), essas proteínas clivam uma porção dessa sequência alvo, chamada protoespaçador. Em seguida, inserem o espaçador no *locus* CRISPR próximo a sequência líder, como um novo espaçador. Assim, é possível estabelecer um histórico das invasões por elementos genéticos externos (Amitai e Sorek, 2016; Koonin, Makarova e Koonin, 2019; Makarova *et al.*, 2011; Sternberg *et al.*, 2016; Van Der Oost *et al.*, 2014).

Durante a etapa de expressão, o *locus* CRISPR é transcrito, a partir de um promotor, em uma molécula grande de RNA precursora, o pré-crRNA, que posteriormente é clivado e processado em pequenos crRNA. Essas pequenas moléculas de RNA específicas correspondem a um único espaçador flanqueado por duas DRs adjacentes (Horvath e Barrangou, 2010; Westra, Buckling e Fineran, 2014).

Na etapa de interferência, o crRNA maduro se une a uma ou mais proteínas Cas, formando o complexo efetor crRNP. Esse complexo é responsável por identificar e se associar aos ácidos nucleicos complementares nos EGMs invasores, através do pareamento de bases entre o fragmento invasor e o espaçador presente na estrutura do complexo (Nishimasu e Nureki, 2017; Van Der Oost *et al.*, 2014).

Em muitos crRNPs, a identificação do alvo depende da presença da sequência PAM. A hibridização entre o crRNA e o fragmento alvo provoca uma alteração conformacional no crRNP, que desencadeia a ativação de uma nuclease com capacidade de degradar o elemento genético invasor (Nishimasu e Nureki, 2017; Van Der Oost *et al.*, 2014).

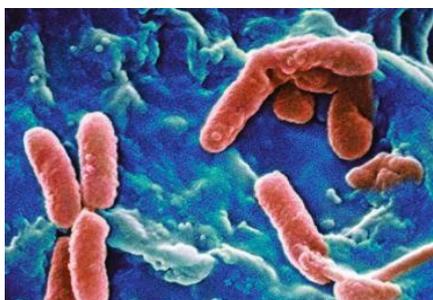
2.2 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

2.2.1 Características de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador, pertencente à família Pseudomonadaceae. Essa bactéria apresenta-se como

móvel, heterotrófica, aeróbio estrito, oxidase-positivo, não fermentadora de lactose, medindo cerca de 0,5-1,0 μm de largura e 1,0-5,0 μm de comprimento (Figura 4) (Bédard, Prévost e Déziel, 2016; Chevalier *et al.*, 2017; Diggle e Whiteley, 2020).

Figura 4. Bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em micrografia eletrônica de varredura (MEV) colorida



Fonte: CDC/Science, 2018.

Por se tratar de um organismo oportunista, essa espécie bacteriana raramente infecta indivíduos saudáveis e está associada a um amplo espectro de infecções nosocomiais em imunodeprimidos (Diggle e Whiteley, 2020; Kerr e Snelling, 2009). Além disso, é correlacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou fibrose cística (FC) (Jurado-Martín, Sainz-Mejías e McClean, 2021; Klockgether e Tümmler, 2017).

Os reservatórios ambientais confirmados de *P. aeruginosa* em hospitais são numerosos e incluem aerossóis, água potável, torneiras, ralos de pias e chuveiros, como também em equipamentos utilizados por pacientes e profissionais (Bédard, Prévost e Déziel, 2016). Diante desse cenário, *P. aeruginosa* é amplamente vinculada a pneumonia associada a ventiladores, infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres centrais, infecções urinárias causadas por cateteres e infecções decorrentes de cirurgias ou transplantes (Moradali, Ghods e Rehm, 2017).

Esse microrganismo é capaz de colonizar uma diversidade de ambientes úmidos em plantas, solos e vários ecossistemas aquáticos. Além disso, pode infectar animais e causar infecções em diversos hospedeiros. Por ser uma

bactéria de fácil adaptação, a obtenção de carbono e nitrogênio provêm de múltiplas fontes, podendo ser encontrada em ambientes com alto ou baixo teor de nutrientes, porém apresenta uma faixa de temperaturas de crescimento bastante restrita (Balasubramanian *et al.*, 2013; De Sousa *et al.*, 2021; Stover *et al.*, 2000).

A progressão da doença causada por esta bactéria está ligada aos fatores de virulência que facilitam a colonização e penetração nos tecidos dos hospedeiros. Entre esses fatores estão o lipopolissacarídeo (LPS), a formação de biofilme, o flagelo, os pili, a produção de pigmentos (piocianina), além da produção de toxinas e enzimas lipolíticas (fosfolipases) e proteolíticas (elastases e proteases) (Jurado-Martín, Sainz- Mejjías e McClean, 2021; Qin *et al.*, 2022; Sultan, Arya e Kim, 2021). As variadas características de virulência e resistência desse patógeno resultam do seu extenso genoma, que varia de aproximadamente 5 a 7 mega pares de bases (Mpb) e codifica cerca de 5.567 genes (Lambert, 2002).

2.2.2 Mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*

Em 2024, a OMS divulgou uma lista de patógenos prioritários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, devido ao aumento da resistência a antimicrobianos, considerado uma ameaça global à saúde humana (Organização Mundial Da Saúde, 2024). Nessa lista, estão incluídos os patógenos do grupo ESKAPE, que são os principais agentes oportunistas em infecções nosocomiais, visto que a maioria de seus isolados clínicos demonstra resistência à terapia antimicrobiana convencional, representando um risco para pacientes imunocomprometidos (Qian *et al.* 2023). O termo ESKAPE é um acrônimo que engloba as seguintes bactérias do grupo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Karruli *et al.*, 2023; Qian *et al.* 2023).

Pseudomonas aeruginosa caracteriza-se por sua resistência intrínseca a uma ampla gama de antimicrobianos e antissépticos, bem como por sua habilidade em adquirir mecanismos de resistência adicionais e sobreviver em ambientes úmidos. Dessa forma, uma das causas aceleradoras do desenvolvimento de cepas multirresistentes é a utilização exacerbada de antimicrobianos durante o tratamento (Hirsch e Tam, 2010). Esta bactéria pode demonstrar resistência tanto

por meio de mecanismos intrínsecos quanto por mecanismos adquiridos e adaptativos (Pachori, Gothwal e Gandhi, 2019; Pang *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos de resistência intrínsecos destacam-se a superexpressão de bombas de efluxo - as quais removem os antibióticos da célula, a baixa permeabilidade da membrana externa, como também a produção de enzimas que inativam esses medicamentos (Pang *et al.*, 2019).

Por outro lado, os mecanismos de resistência adquiridos resultam da aquisição de genes de resistência ou de mutações em genes que codificam porinas, bombas de efluxo, proteínas ligadoras de penicilina e β -lactamases cromossômicas. A resistência adaptativa é caracterizada pela atuação do biofilme nos pulmões de pacientes, servindo como uma barreira que dificulta a penetração dos antibióticos (Pachori, Gothwal e Gandhi, 2019; Pang *et al.*, 2019).

2.2.3 Formação de Biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*

No contexto da patogênese das infecções por *P. aeruginosa*, a capacidade de formar biofilmes é evidenciada como um dos principais determinantes de virulência. Essa espécie bacteriana pode assumir dois modos de vida diferentes: no estado planctônico, como células isoladas, dispersas e autônomas, e na forma agregada, ao aderir ou não às superfícies naturais ou sintéticas. Essa última forma é caracterizada pela formação do biofilme (Sauer *et al.*, 2022; Tuon *et al.*, 2022). Os biofilmes são aglomerados microbianos, compostos por uma mistura de biopolímeros, principalmente polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Tuon *et al.*, 2022; Vu *et al.*, 2009).

A formação de biofilme é multifatorial, influenciada por diversos sinais ambientais e requer múltiplas funções para seu desenvolvimento, que utiliza como mecanismo regulatório o *Quorum sensing* (QS) (Diggle e Whiteley, 2020; Kim *et al.*, 2020; Thi *et al.*, 2020). O biofilme permite que microrganismos sobrevivam em condições adversas e se propaguem em novos ambientes. Desse modo, são responsáveis por infecções persistentes devido à sua resistência antimicrobiana e ao desenvolvimento de variantes fenotípicas (Wei e Ma, 2013). A matriz extracelular dos biofilmes, composta por exopolissacarídeos (EPSs), DNA extracelular (eDNA) e proteínas, mantém a integridade da comunidade

bacteriana, facilita a proximidade das células com nutrientes, e oferece proteção contra estresses e fagócitos (Maurice, Bedi e Sadikot, 2018; Tuon *et al.*, 2022).

Os três principais polissacarídeos encontrados nos biofilmes são Psl, Pel e alginato, que contribuem de maneira distinta para a adesão, estrutura e estabilidade da matriz. O Psl é essencial para a fixação de células a uma superfície, proporciona proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e serve como molécula de sinalização (Thi *et al.*, 2020; Wei e Ma, 2013). Enquanto o Pel é eficaz na defesa contra tratamentos antimicrobianos, visto que atua na preservação da estrutura do biofilme (Thi *et al.*, 2020).

O alginato, por sua vez, é crucial para a estabilidade e proteção dos biofilmes, ajudando a reter água e nutrientes. Além de sua função estrutural, o alginato contribui para a persistência da infecção e evasão imunológica, aumentando a resistência a antibióticos e neutralizando radicais livres produzidos por neutrófilos, além de estimular a atividade de macrófagos (Wei e Ma, 2013). Apesar de não ser essencial para a formação do biofilme, o alginato é um dos polissacarídeos predominantes na matriz do biofilme em cepas mucóides (Davarzani *et al.*, 2021).

A produção e regulação do alginato em *P. aeruginosa* são controladas por dois *operons* distintos. O primeiro *operon* inclui 12 genes (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF*, *algA*) que estão envolvidos na formação e liberação de alginato para o meio extracelular. O segundo *operon* contém o fator sigma AlgU/T, que funciona como regulador positivo da produção de alginato, enquanto os genes *mucA*, *mucB* e *mucD*, que atuam como reguladores negativos. Além desses elementos, a regulação do alginato é influenciada por reguladores transcricionais (AlgB, AlgQ, AlgR e RpoN), bem como por modificações pós-transcricionais e pós- traducionais, incluindo repressão catabólica, atividade da quinase KinB e proteólise intramembranar (Ryan Withers, Yin e Yu, 2014). O regulador AmrZ também contribui para a produção de alginato, ativando a transcrição do gene *algD* de maneira dependente de AlgT (Baynham e Wozniak, 1996).

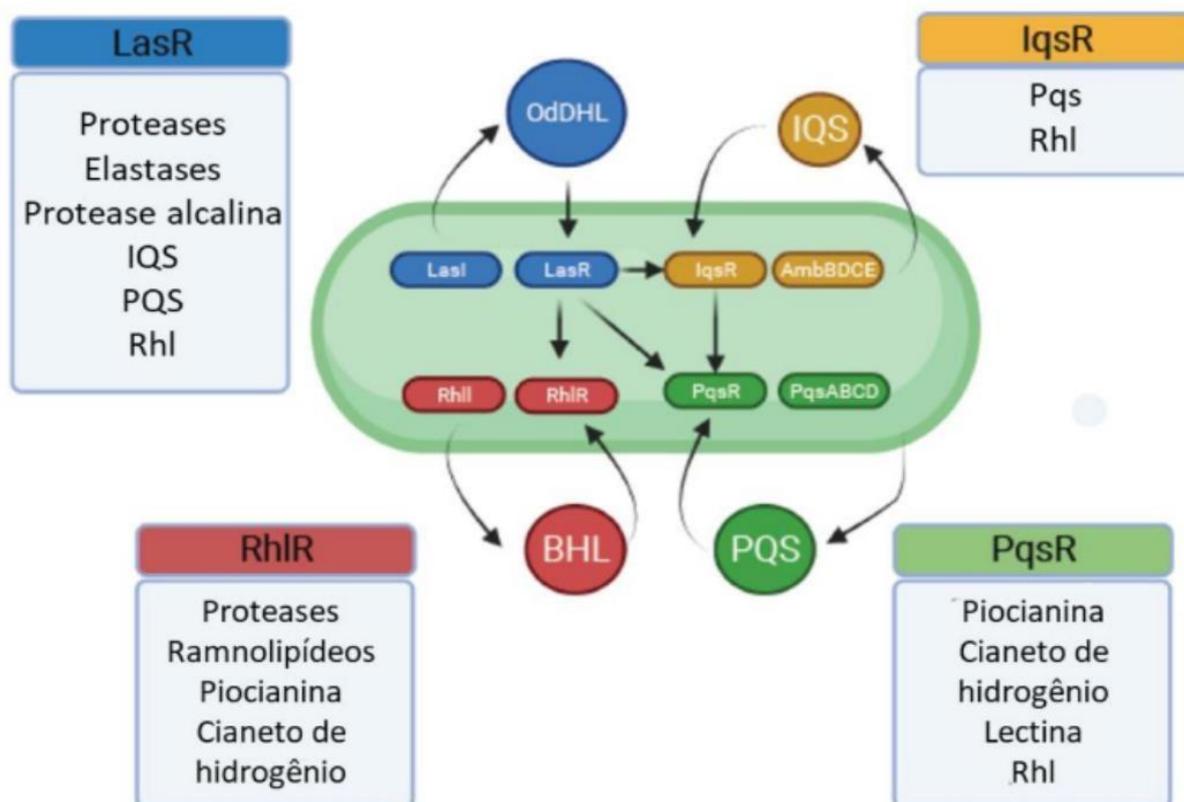
2.2.4 Quorum Sensing em *Pseudomonas aeruginosa*

Quorum Sensing é um processo de comunicação célula-célula utilizado por várias espécies bacterianas, regulando a expressão de genes específicos em resposta à densidade populacional bacteriana. Esse sistema funciona através da síntese, liberação e detecção de sinais extracelulares, denominados autoindutores (AI), que atuam como ativadores transcricionais, permitindo que as células microbianas regulem a expressão gênica com base na densidade celular (Pearson *et al.*, 1995; Vu *et al.*, 2009).

Os AI liberados pelas bactérias durante o QS apresentam dois efeitos principais. Primeiro, a absorção desses sinais pelas células induz uma variedade de comportamentos, como a produção de exofatores que promovem crescimento, motilidade e formação de biofilme. Segundo, essa absorção também aumenta a produção das próprias moléculas sinalizadoras, gerando um feedback positivo em altas densidades celulares e amplificando a produção dos fatores regulados por QS (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Para a regulação da virulência e da formação de biofilme em *P. aeruginosa*, existem quatro vias de QS denominadas Las, Rhl, Pqs e Iqs. Cada uma dessas vias utiliza reguladores transcricionais específicos — LasR, RhlR, PqsR e IqsR —, respectivamente, que se ligam a AIs específicos. A interação desses reguladores com os AIs promove a expressão de genes selecionados, facilitando o desenvolvimento do fenótipo de virulência (Figura 5) (Bhardwaj *et al.*, 2021; Tuon *et al.*, 2022).

Figura 5. Sistemas *Quorum Sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* e moléculas associadas à patogênese do biofilme



Fonte: Tuon et al. (2022, tradução autora).

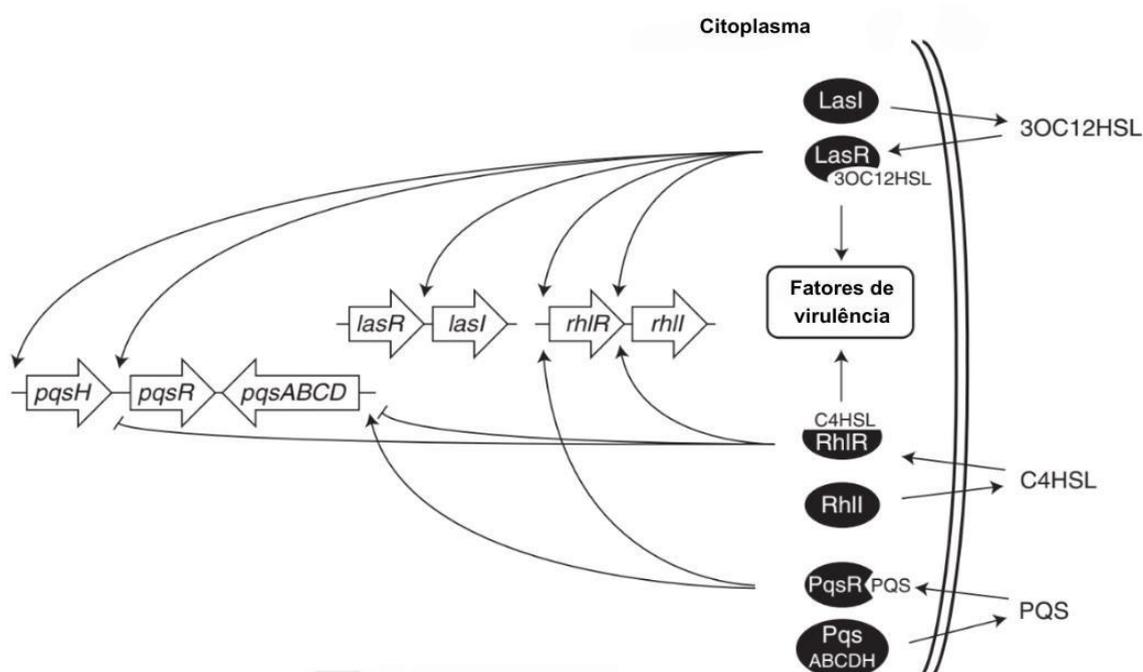
Legenda: O sistema Las, quando ativado por OdDHL, promove a formação de multímeros do complexo LasR-OdDHL, o que, por sua vez, ativa a transcrição dos genes *rhIR*, *rhII* e *lasI*. O complexo RhIR-BHL, por sua vez, estimula a expressão de seu próprio regulon, estabelecendo um segundo ciclo positivo. Além disso, LasR-OdDHL também regula positivamente o PqsR, que é um regulador transcricional da biossíntese de PQS (operon *pqsABCD*). O PQS, por sua vez, melhora a transcrição de *RhII*, afetando a produção de BHL e a expressão geral do sistema Rhl QS, o que modula indiretamente os fenótipos dependentes de Rhl.

Os circuitos QS são organizados em uma hierarquia, com o sistema Las no nível superior da cascata. Os sistemas Las e Rhl são ativados quando há um aumento na densidade celular durante as fases iniciais do crescimento exponencial. Por outro lado, os sistemas PQS e IQS entram em ação nas fases posteriores do crescimento exponencial, particularmente em condições de escassez de ferro e de falta de fosfato, respectivamente (Thi *et al.*, 2020).

Os sistemas LasR/LasI e RhIR/RhII utilizam, respectivamente, as moléculas sinalizadoras N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) e N-

butanoil-L-homoserina lactona (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). LasI é responsável pela produção de 3-oxo-C12-HSL, que ativa o receptor citoplasmático LasR. Esse receptor, por sua vez, regula e induz a expressão dos genes *lasI*, *rhIR* e *rhII*, como também de outros genes associados à virulência (Pesci *et al.*, 1997). A ativação de RhIR controla a expressão de *rhII*, criando um feedback positivo que impulsiona a produção de fatores de virulência como piocianina, ramnolipídeos, proteases e elastases, além de ser responsável por inibir a expressão dos genes *pqsR* e *pqsABCDH* (Thi *et al.*, 2020). O sistema Iqs modula o sistema Pqs, que utiliza moléculas sinalizadoras de quinolonas para estimular a síntese da lectina A (LecA), essencial para a produção de Pqs e a regulação dos genes *rhIR* e *lasR* (Figura 6) (Bhardwaj *et al.*, 2021; Sultan, Arya e Kim, 2021).

Figura 6. Circuitos Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Adaptado de Rutherford e Bassler (2012, tradução autora).

Legenda: As três sintetases de AI - LasI, RhII e PqsABCDH - são responsáveis pela produção dos AIs 3OC12HSL, C4HSL e PQS, respectivamente. Esses AIs são reconhecidos pelos fatores de transcrição citoplasmáticos LasR, RhIR e PqsR. Cada fator de transcrição não apenas regula a expressão de sua sintetase de AI correspondente, mas também influencia outros alvos, conforme indicado pelas setas.

2.3 *Pseudomonas aeruginosa* e o sistema CRISPR/Cas

Cerca de 30% das cepas clínicas de *P. aeruginosa* possuem o Sistema CRISPR/Cas do Tipo I, sendo essa espécie um importante modelo de estudo para esse tipo de sistema CRISPR/Cas (Belkum *et al.*, 2015; Cady *et al.*, 2012; Hatoum-Aslam e Marraffini, 2014). Em *P. aeruginosa*, foram observados três subtipos do sistema: I-F, I-E e I-C. O subtipo I-F é encontrado com maior frequência, seguido do subtipo I-E; enquanto o subtipo I-C é raramente encontrado (Belkum *et al.*, 2015; Luz, *et al.*, 2019).

Em 2017, foi descrito por Høyland-Kroghsbo e colaboradores que um dos mecanismos responsáveis por ativar a expressão, atividade e adaptação do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa* é o *Quorum sensing* (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2017). Esse mecanismo regulador assegura que o sistema CRISPR/Cas opere com sua eficácia máxima em momentos em que as bactérias estão mais expostas a infecções por fagos (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2017).

Ademais, a via KinB do sistema KinB/AlgB associada à formação do biofilme foi relatada por Borges e colaboradores (2019) como repressora do sistema CRISPR/Cas. KinB é uma proteína que atua como quinase e fosfatase nesse sistema de dois componentes com AlgB, crucial na formação de biofilme. Quando KinB não funciona adequadamente, a forma fosforilada de AlgB (P-AlgB) se acumula, estimulando a atividade dos repressores do CRISPR/Cas (Borges *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar mecanismos regulatórios do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar quantitativamente a expressão de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E, *Quorum Sensing* e genes de ativação de biofilme sob baixa densidade em isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Avaliar quantitativamente a expressão de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E, *Quorum Sensing* e genes de ativação de biofilme sob alta densidade em isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Avaliar quantitativamente a expressão de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E e *Quorum Sensing* na presença de AI de QS;
- Avaliar quantitativamente a expressão de genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E e *Quorum Sensing* na presença de inibidores de QS.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Este trabalho caracteriza-se como um estudo experimental, cujo objetivo é investigar os mecanismos regulatórios do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Esse tipo de estudo permite estabelecer relações de causa e efeito e explorar os mecanismos subjacentes ao funcionamento do sistema CRISPR/Cas.

4.2 Coleta de dados

4.2.1 Amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

As amostras de *P. aeruginosa* foram obtidas de projetos anteriores, totalizando 5 isolados clínicos positivos para o sistema CRISPR/Cas e apresentam diferentes características genéticas (Quadro 1). São oriundos de diferentes sítios de infecção e diferentes setores de um hospital público da cidade do Recife-PE e estão conservados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do IAM/Fiocruz. Os estoques foram armazenados em criotubos contendo meio de cultura BHI e glicerol a 30% na proporção de 1:1 e congelados em freezer a -80°C para manutenção das amostras.

Quadro 1. Características dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* utilizados no estudo

Isolado	Tipo de sistema CRISPR/Cas	Informação genética
Pae22	I-F e I-E	- Possui ambos os tipos de sistema;
Pae29	I-F	- Presença de bacteriófago (fago) e espaçador contra o próprio fago
Pae42	I-F	- Presença de bacteriófago e espaçador contra o próprio fago - Gene anti-CRISPR
Pae66	I-F	- Controle do sistema CRISPR/Cas tipo I-F
Pae81	I-E	- Controle do sistema CRISPR/Cas tipo I-E

4.2.2 Curva de crescimento bacteriano

As curvas de crescimento bacteriano foram realizadas com base no estudo realizado por Goldová e colaboradores (2011), para analisar o padrão de crescimento bacteriano dos 5 isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Inicialmente, os isolados foram plaqueados em meio Luria-bertani (LB) ágar e incubados por 24 horas a 37°C. Após esse período, colônias foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido, por 18 horas à 37°C, sob agitação (200 rpm).

Para a construção da curva, as culturas foram diluídas para atingir uma Densidade Óptica a 600nm (DO600) de aproximadamente 0,05 unidades de absorbância em 100mL de meio LB líquido. A primeira medição de DO600 foi realizada no tempo zero (T0) e a cultura foi incubada novamente a 37°C, sob agitação (200 rpm) por 10 horas. As leituras de DO600 foram obtidas a cada 60 minutos até que o terceiro ponto da fase estacionária fosse atingido. Todos os valores foram registrados e posteriormente plotados em gráficos utilizando o programa Excel (Microsoft®).

4.2.3 Extração do RNA total bacteriano e Síntese de cDNA

Para a extração do RNA total bacteriano, as culturas foram cultivadas até atingirem uma DO600 de 0,1 - para análise em baixa densidade celular - e uma DO600 de 1,0 para alta densidade. O processo de extração também foi realizado na presença dos autoindutores de QS 3OC12-HSL e C4-HSL (Sigma), do inibidor de QS Baicaleína (Cayman Chemical) e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) até as culturas atingirem uma DO600 de 1,0, de acordo com Hoyland e colaboradores (2017).

O RNA total foi extraído seguindo as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). A integridade do RNA pôde ser verificada a partir de uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e corrido a 120 Volts e 150 mA durante 30 minutos, sendo posteriormente visualizado e fotografado em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

Após a verificação da integridade, as amostras de RNA foram tratadas com

a enzima TURBO™ DNase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, para remoção de DNA genômico (gDNA) contaminante. A quantificação desse RNA foi avaliada em NanoDrop 2000c (Thermoscientific) e o grau de pureza foi determinado a partir da observação dos parâmetros de absorvância (A260/280).

Posteriormente, a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando a enzima GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, na qual o RNA total foi utilizado como molde para a síntese do cDNA. Um controle negativo foi inserido para todas as amostras de cDNA, no qual a enzima Transcriptase Reversa não foi adicionada. Para utilização nas reações de amplificação, o cDNA foi submetido previamente à quantificação em NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific Inc.), diluído 1:10 em água tratada com DEPC (Invitrogen) e armazenados a -20°C, até o momento da utilização.

4.2.4 RT-PCR e PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

A técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa-PCR) foi realizada para verificar a transcrição dos genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E (*cas1f*, *cas8f*, *cas3f*, *cas1e*, *cas3e* e *cas8e*), *Quorum Sensing* (*lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*) e dos genes de ativação do biofilme (*amrZ*, *algB*, *algU* e *algR*). As seqüências dos oligonucleotídeos podem ser observadas no Quadro 2.

Quadro 2. Oligonucleotídeos desenhados para os genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas, de Biofilme e *Quorum sensing* utilizados nas reações de qRT-PCR

Gene	Primer	Seqüência 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>cas1f</i>	cas1_F	AAGTCGATCCTTCACTCCAAAC	123	Autora
	cas1_R	GATGTTCCAGTAGTGCGAATG		
<i>cas8f</i>	csy1_F	ACAAGCTGGTCAGCGATGTG	112	Autora

	csy1_R	GCACTGTCTTCTGTCAGCCA		Autora
cas3f	cas3F_F	CGACGCAGACGCAAAGAAA	193	Autora
	cas3F_R	GAGCATCAGGATCAGTCGGG		Autora
cas1e	cas1E_F	TGAACACTACAACCTGCTGG	152	Autora
	cas1E_R	GGTACTGTGCAATCAGACTCG		Autora
cas3e	cas3E_F	AGATCAAGACCTCGCGCAA	191	Autora
	cas3E_R	CTCCTCGGGTCCCTGATAA		Autora
cas8e	cse1_F	TGAACACTACAACCTGCTGG	152	Autora
	cse1_R	GGTACTGTGCAATCAGACTCG		Autora
algU	algU_F	GCTGTATCGGATCGCCATCA	195	Autora
	algU_R	AACTGCTGGATGGTCTGGTG		Autora
algR	algR_F	ATTGCCGACCACAAGTACGT	193	Autora
	algR_R	GGCCTTTCAGGTAGAGCTGG		Autora
algB	algB_F	CCCCAGGTCACCATCAACTG	152	Autora
	algB_R	ATCTCGTCGAGGAACAGGGT		Autora
amrZ	amrZ_F	GCCGTACCGCTGACAAATTC	159	Autora
	amrZ_R	CACCGAGATTGTCTTGCAGC		Autora
lasI	lasI_F	CTACAGCCTGCAGAACGACA	178	Autora
	lasI_R	GTAAAGCGCGATCTGGGTCT		Autora
lasR	lasR_F	GGCCTTGGTTGACGGTTTTTC	168	Autora
	lasR_R	GGGTAGTTGCCGACGATGAA		Autora
rhII	rhII_F	TGCTCTCTGAATCGCTGGAA	154	Autora
	rhII_R	GTTTGCGGATGGTCGAACTG		Autora
rhIR	rhIR_F	ACCAGCAGAACATCTCCAGC	157	Autora
	rhIR_R	CATTGCAGGATCTCGCGTTC		Autora

Fonte: A autora.

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25µL, contendo 2,5µL de dNTP na concentração de 2,5mM; 1µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 20nM; 2,5µL de MgCl₂ a 25nM; 1µL de cDNA diluído 1:10 e 1 U de Taq DNA polimerase (Promega). As reações foram submetidas à termociclagem em T3000 thermocycler (Biometra), com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto (cada ciclo), seguidos por uma extensão final a 72°C. Para garantir a confiabilidade dos resultados da RT-PCR, foram incluídos controles positivo, como o gene *rpsI* de *P. aeruginosa*, e negativo em todas as reações.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), corridos a 120 Volts e 150 mA durante 45 minutos, sendo posteriormente visualizados e fotografados em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

Foi realizada a técnica de qRT-PCR (Real Time Quantitative PCR) para avaliar possíveis diferenças nos níveis de expressão dos genes envolvidos nos sistemas CRISPR/Cas, QS e produção de biofilme. A quantificação da transcrição foi realizada com o Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Nas reações de qRT-PCR para os genes alvo foram utilizados 5µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µl de cada primer (100 nM), 1 µl de cDNA (150 ng) e água DEPC para um volume final de 10 µl. Nas reações para o gene endógeno foram utilizados 5µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 2 µl de cada primer (100 nM), 2 µl de cDNA (150 ng) e água DEPC para um volume final de 10 µl.

Como controle endógeno da reação, foi utilizado o gene constitutivo *rpsL* de *P. aeruginosa*. A reação de PCR em tempo real foi realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM/Fiocruz, em ABI 7500 (Applied Biosystems).

4.3 Análise de dados

4.3.1 Parâmetros Analíticos da qPCR

A expressão relativa dos genes foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método tem por base comparar a expressão de um gene alvo com a de um controle endógeno, normalmente um gene que está sendo expresso constitutivamente. Como controle endógeno da reação, utilizou-se o gene constitutivo *rpsL* de *P. aeruginosa*. Dessa forma, o C_t (*cycle threshold*) é o número de ciclos no qual a curva da qPCR atinge o limiar de detecção fluorescente, que ocorre durante a fase exponencial; o ΔC_t é a diferença de expressão entre o gene alvo e controle endógeno de determinada amostra; e o $\Delta\Delta C_t$ corresponde a diferença entre o ΔC_t da amostra e o ΔC_t do controle.

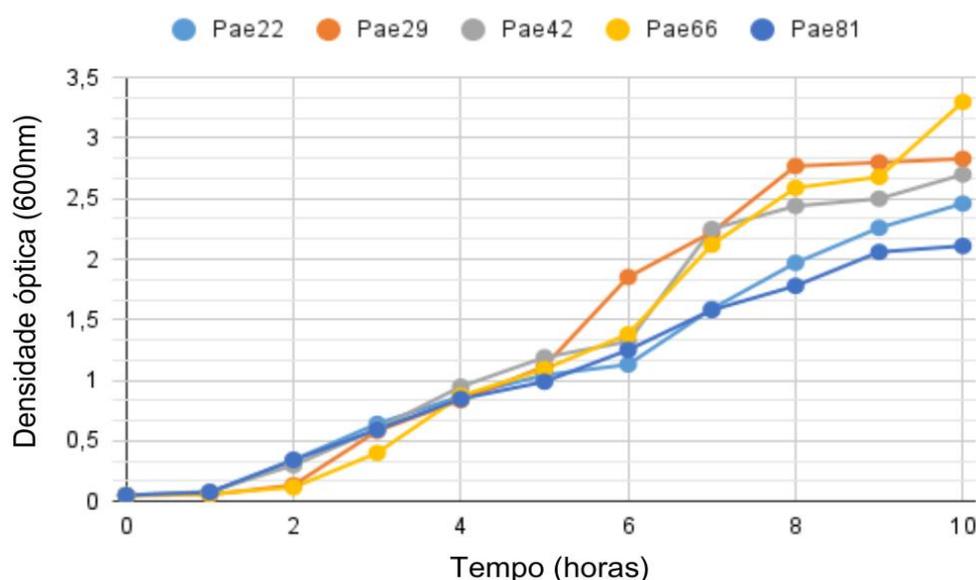
Ao final das reações de amplificação, os dados obtidos foram utilizados para os cálculos de quantificação relativa com o auxílio do programa Excel (Microsoft®) e os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad prisma 5 (GraphPad Software). Para análise estatística foram aplicados os testes de T-Student e Anova, e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento celular

De acordo com os dados obtidos através das curvas de crescimento, foi possível observar que os isolados Pae22, Pae29, Pae42, Pae66 e Pae81 atingiram uma DO600 de 0,1 após 2 horas de crescimento. Enquanto isso, a DO600 de 1,0 foi atingida com uma média de 5 horas de crescimento (Figura 7).

Figura 7. Curva de crescimento dos cinco isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: A autora.

Com base nesses resultados, foi determinado o tempo necessário para o crescimento das culturas bacterianas, visando a extração de RNA total em densidades celulares baixa e alta. Essas condições representam momentos em que as bactérias estão expostas a menor e maior probabilidade de infecções por fagos, respectivamente (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2017).

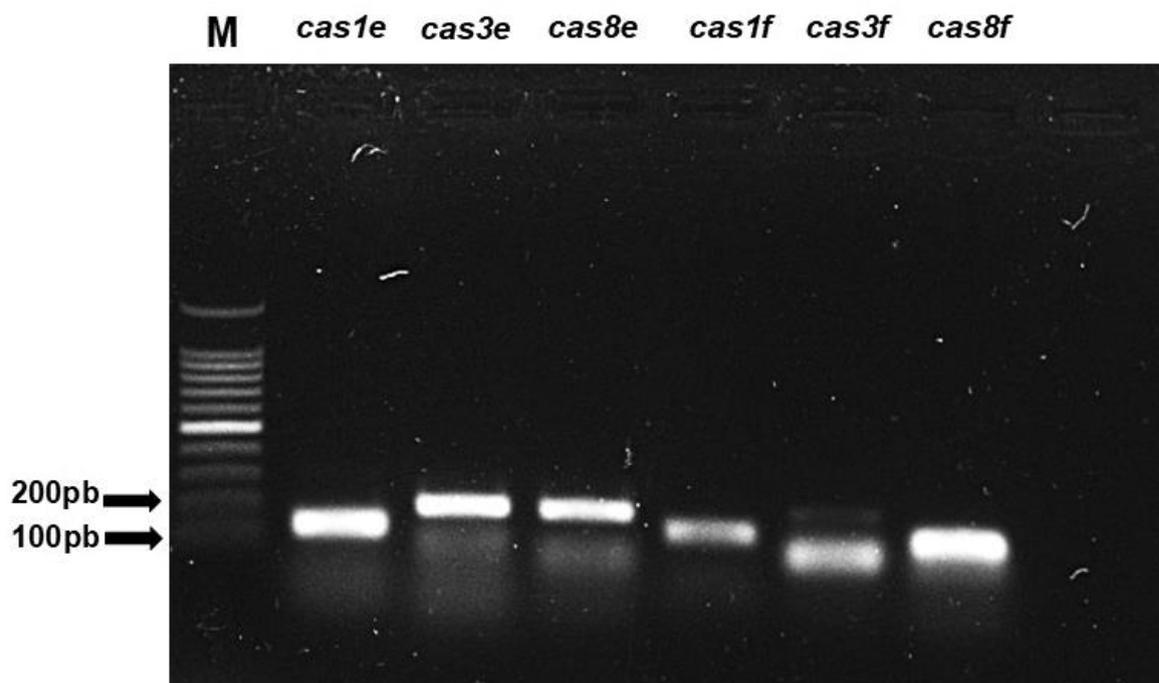
5.2 Avaliação qualitativa da expressão de genes envolvidos na produção de biofilme, mecanismo de *Quorum sensing* e Sistema CRISPR/Cas

Os cinco isolados do presente estudo foram submetidos à técnica de RT-PCR para avaliação qualitativa dos genes envolvidos na produção de biofilme pela via KinB/algB (*amrZ*, *algB*, *algU* e *algR*), genes envolvidos no mecanismo de *quorum*

sensing (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*) e genes pertencentes ao sistema CRISPR/Cas tipos I-F e I-E, envolvidos nas etapas de adaptação, formação do complexo efetor e clivagem do alvo (*cas1*, *cas8* e *cas3*) (Figura 8 e 9).

A partir dos resultados qualitativos, foi possível observar que todos os cinco isolados expressam todos os genes investigados, com exceção do isolado Pae22 que não expressa o gene *cas1* do sistema tipo I-E. A partir de análises no genoma desse isolado, realizadas pelo grupo de pesquisa, foi constatado que a proteína Cas1 no isolado Pae22 é 193 aminoácidos menor do que a Cas1 convencional para este tipo de sistema, apresentando uma grande deleção interna em sua sequência. Esse dado sugere que, possivelmente, esse subtipo de sistema esteja inativo para esse isolado. Os resultados da avaliação qualitativa indicam que todos os isolados, possivelmente, tenham os mecanismos de *quorum sensing*, produção de biofilme e CRISPR/Cas ativos.

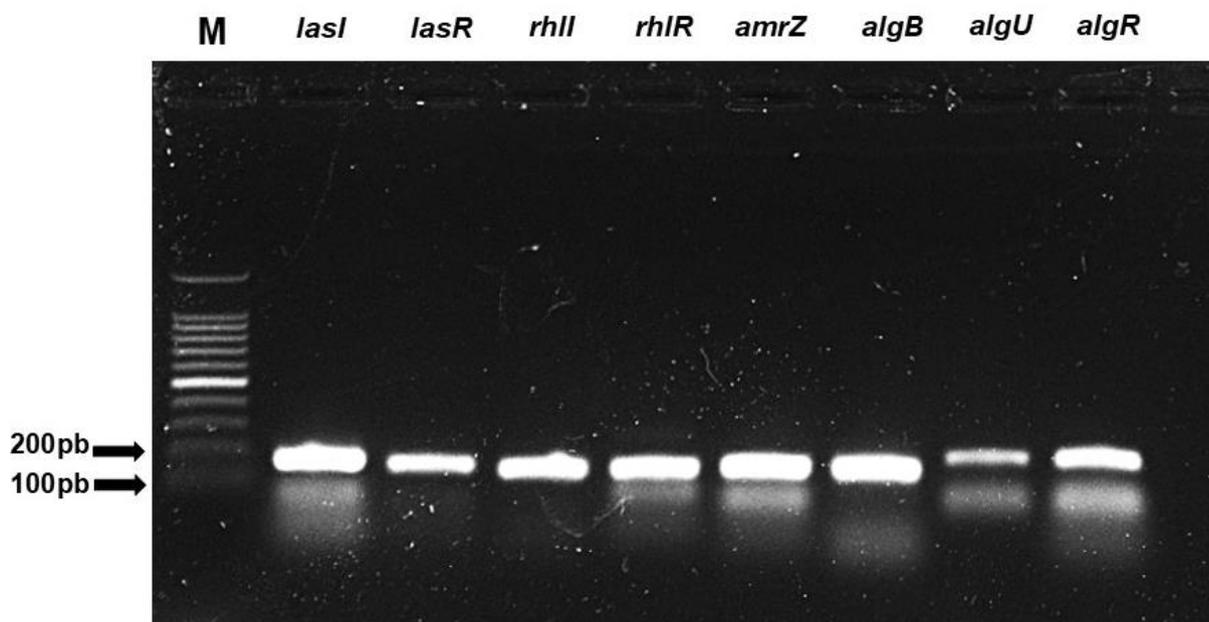
Figura 8. Gel representativo dos produtos de RT-PCR para os genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas



Legenda: **M** – Ladder 100pb; **cas1e** - 152pb; **cas3e** – 191pb; **cas8e** – 152pb; **cas1f** – 123pb; **cas3f** – 193pb; **cas8f** – 112pb; **pb** – pares de base.

Fonte: A autora.

Figura 9. Gel representativo dos produtos de RT-PCR para os genes relacionados ao sistema *Quorum Sensing* e genes de ativação de biofilme



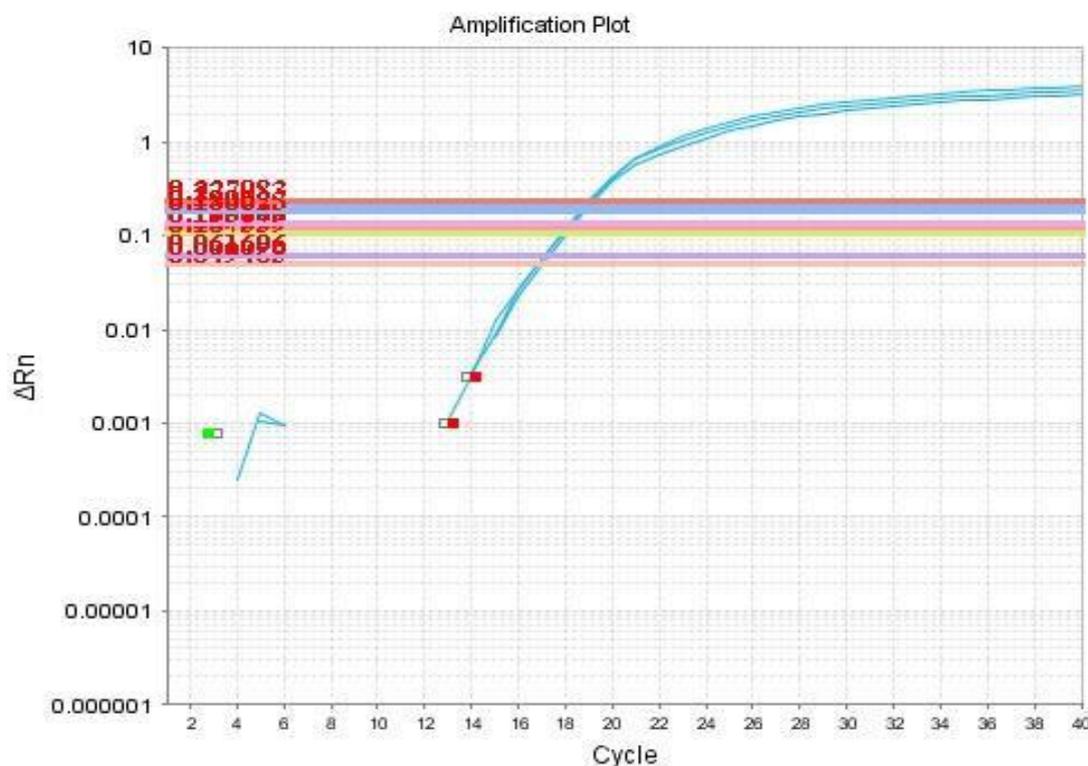
Legenda: **M** – Ladder 100pb; *lasI* - 178pb; *lasR* – 168pb; *rhII* – 154pb; *rhIR* – 157pb; *amrZ* – 159pb; *algB* – 152pb; *algU* – 195pb; *algR* – 193pb; **pb** – pares de base.

Fonte: A autora.

5.3 Validação do controle endógeno

Os testes realizados para avaliar a adequação do gene *rpsL* como controle endógeno neste estudo revelaram sua expressão uniforme em todas as amostras analisadas. A análise das curvas de amplificação demonstrou que o gene *rpsL* manteve variações mínimas ou inexistentes no valor do Cycle threshold (Ct), indicando sua viabilidade para ser utilizado nos ensaios de qRT-PCR (Figura 10).

Figura 10. Gráfico de amplificação do gene *rpsL* em ensaio de padronização



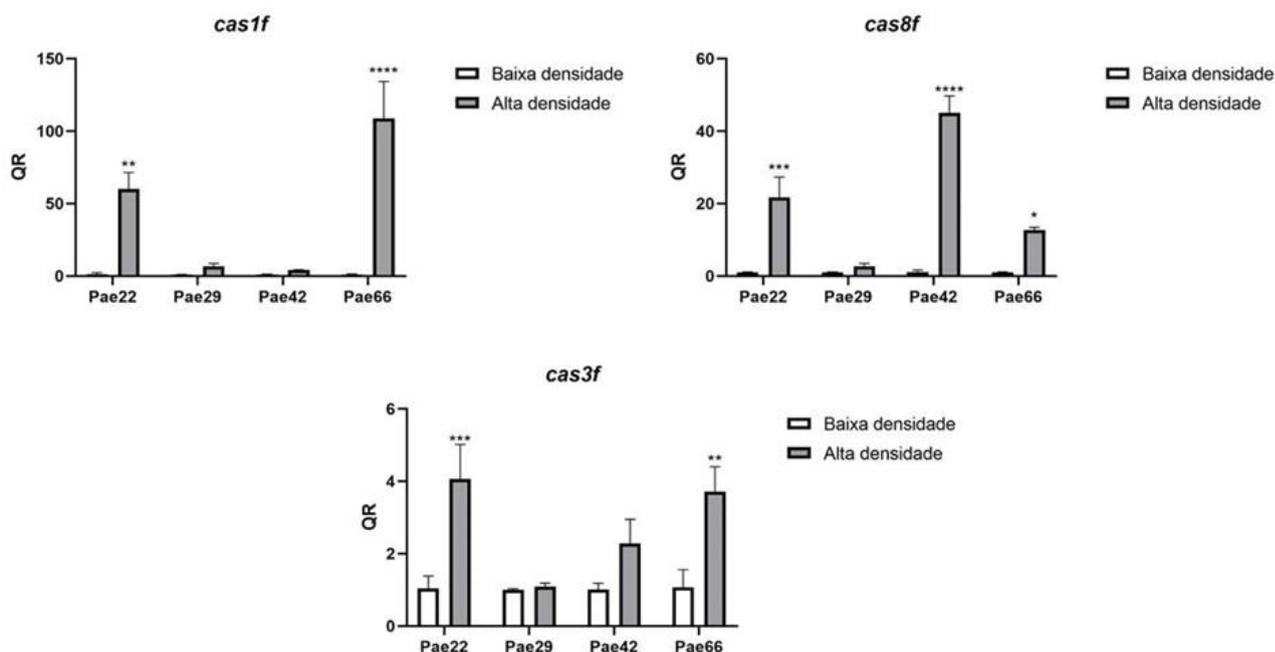
Legenda: Gráfico gerado pelo software SDS v2.0.6 da (Applied Biosystems) em um ensaio de padronização do controle endógeno *rpsL*. *rpsL*. No eixo X encontra-se o número de ciclos da reação de PCR, enquanto no eixo Y é apresentado o sinal de fluorescência após uma quantidade de ciclos (ΔRn).

5.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica em isolados clínicos de *P. aeruginosa* cultivados em baixa e alta densidade

5.4.1 Expressão relativa dos genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas subtipos I-F e I-E em isolados clínicos de *P. aeruginosa* cultivados sob diferentes densidades

A análise da expressão relativa do gene *cas1f* foi conduzida nos isolados Pae22, Pae29, Pae42 e Pae66. Verificou-se um aumento significativo na expressão deste gene em alta densidade, como mostrado na Figura 11.

Figura 11. Expressão relativa dos genes *cas1f*, *cas3f* e *cas8f* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *cas1f*, *cas3f* e *cas8f* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em baixa e alta densidade. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se a baixa densidade como referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Com base nos resultados obtidos, foi observada uma superexpressão gênica em alta densidade de até 50 vezes no isolado Pae22 e até 100 vezes no isolado Pae66, em comparação com a condição de baixa densidade. De acordo com Yosef *et al.* (2012), a proteína Cas1 desempenha um papel fundamental na fase de adaptação do sistema CRISPR/Cas, sendo responsável pela integração de espaçadores mesmo na ausência de todas as outras proteínas Cas (Yosef *et al.*, 2012).

A avaliação da expressão relativa para o gene *cas8f* manteve o padrão dos resultados encontrados para o gene *cas1f*. Dentre os resultados obtidos, os isolados Pae22 e Pae66 apresentaram níveis de expressão em até 20 e 10 vezes, respectivamente. Em relação ao isolado Pae42, curiosamente, houve uma superexpressão do gene em até 40 vezes, considerando que esse isolado apresenta

como característica genética a presença do gene anti-CRISPR *acrIF3* inserido em seu genoma.

A proteína AcrIF3 atua no bloqueio do sistema tipo I-F na etapa de interferência, através da interação com a nuclease Cas3, impedindo o seu recrutamento pelo complexo efetor (Ren *et al.*, 2022). Porém, como demonstrado por Bondy-Denomy e colaboradores (2013), esses genes anti-CRISPR não são capazes de reduzir os níveis de transcrição dos *loci* CRISPR ou dos genes *cas*, atuando em uma etapa após a formação do complexo crRNA-Cas (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Portanto, mesmo apresentando elevados níveis de expressão do gene *cas8f*, é possível que o isolado Pae42 apresente uma inatividade ou falha no sistema CRISPR/Cas na etapa de interferência.

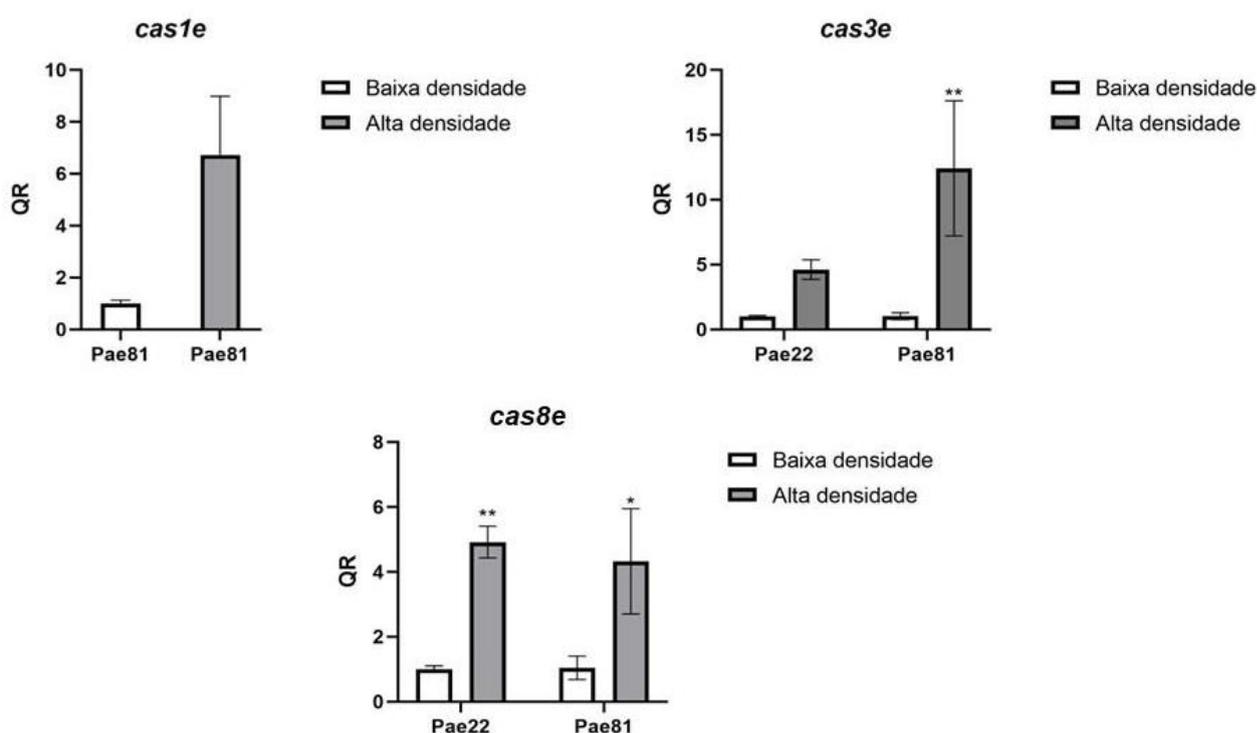
Curiosamente, a avaliação da expressão relativa para o gene *cas3f* foi realizada também nos quatro isolados em estudo e foi possível observar em todos eles maiores níveis de expressão em alta densidade, em relação a baixa densidade. O gene *cas3* é responsável por codificar uma proteína com atividade de helicase, sendo assim, está envolvido no funcionamento do complexo efetor (Makarova *et al.*, 2015). Esse resultado sugere que, possivelmente, esses isolados estejam ativos contra invasões por elementos genéticos exógenos, exceto o isolado Pae42, pois essa proteína atua quando a bactéria está sofrendo um ataque.

A análise da expressão dos genes *cas* subtipo I-E apresentou um padrão semelhante ao observado para os genes do subtipo I-F. Em ambos os subtipos, os níveis de expressão gênica foram mais elevados em condições de alta densidade bacteriana. A avaliação da expressão gênica de *cas1e* foi realizada apenas no isolado Pae81, visto que Pae22 não expressa esse gene, com a quantificação relativa em torno de 6 vezes comparado à baixa densidade. Dessa forma, é possível postular que novos espaçadores estão sendo incorporados no *locus* CRISPR do referido isolado.

Para o gene *cas3e*, o isolado Pae81 exibiu uma expressão gênica significativa em condições de alta densidade, com uma elevação superior a 10 vezes na quantificação relativa. Conforme citado anteriormente acerca da função do gene *cas3*, os dados apontam eficácia na defesa contra elementos genéticos exógenos durante o período de ataque à bactéria.

A expressão gênica do *cas8e* nos isolados Pae22 e Pae81 aumentou com o crescimento populacional bacteriano, exibindo características semelhantes em ambos os isolados (Figura 12). O gene *cas8e* codifica a proteína Cas8, uma proteína integrante de um complexo do subtipo I-E chamado Cascade (*CRISPR-associated complexo antiviral defence*) (Nishimasu e Nureki, 2017).

Figura 12. Expressão relativa dos genes *cas1e*, *cas3e* e *cas8e* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *cas1e*, *cas3e* e *cas8e* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em baixa e alta densidade. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se a baixa densidade como referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

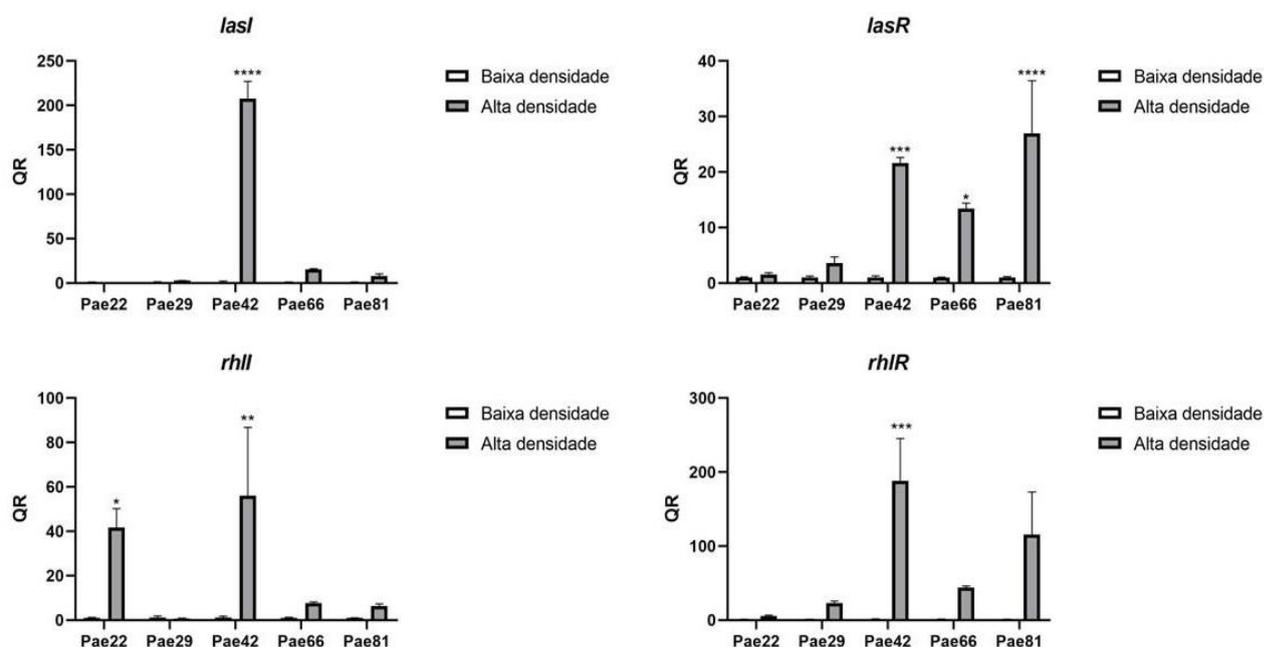
A expressão dos sistemas imunes CRISPR/Cas apresenta elevado custo energético para a bactéria, portanto, alguns sistemas são induzidos apenas após a infecção (Hoyland-Kroghsbo, *et al.*, 2017). No entanto, diante de situações nas quais ocorre um aumento na densidade populacional bacteriana, o risco de infecções por fagos é aumentado devido a maior chance de ocorrer interações fagos-bactérias (Dela Ahator *et al.*, 2022). Dessa forma, quando a bactéria está sob um alto risco de infecção, em alta densidade, é necessário uma função máxima do seu sistema de

defesa, logo, é possível associar com a superexpressão dos genes *cas* envolvidos em todas as etapas de funcionamento do sistema encontrada nesse estudo.

5.4.2 Expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de *Quorum Sensing* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* cultivados sob diferentes densidades

A avaliação da expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de QS foi realizada nos cinco isolados. Foi possível observar que todos os isolados apresentaram maiores níveis de expressão em alta densidade (Figura 13). Dados da literatura demonstram que diante do aumento no risco de infecção imposta pelo aumento populacional bacteriano, os sistemas QS desencadeiam a transcrição de vários genes, que irão atuar na expressão de fatores de virulência, na redução dos receptores de fagos, aumentando a resistência contra essas infecções, bem como atuam na ativação do sistema de defesa CRISPR/Cas através do sistema *las* e *rhl* (Hoyland-Kroghsbo *et al.*, 2017; Dela Ahator *et al.* 2022; Soukarieh *et al.*, 2018). Dessa forma, os resultados encontrados para os cinco isolados desse estudo, em relação aos genes envolvidos no mecanismo de *quorum sensing* corroboram com os achados da literatura.

Figura 13. Expressão relativa dos genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em baixa e alta densidade. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se a baixa densidade como referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Curiosamente, o único isolado a apresentar um aumento significativo na expressão dos quatro genes foi o isolado Pae42. Para o gene *lasI*, foi demonstrada uma superexpressão em até 200 vezes em alta densidade, quando comparado a baixa densidade. Nos isolados Pae22 e Pae29 não foi possível verificar diferença significativa nos níveis de expressão nas duas condições avaliadas. Para o gene *lasR*, todos os isolados clínicos apresentaram maior nível de expressão gênica em alta densidade, no entanto, os isolados Pae42 e Pae81 apresentaram níveis mais significativos do que os outros isolados.

Os genes *rhlI* e *rhlR* apresentaram o mesmo perfil de expressão dos genes *lasI* e *lasR*, com exceção do isolado Pae22 que apresentou um aumento no nível de expressão em até 40 vezes para o gene *rhlI*.

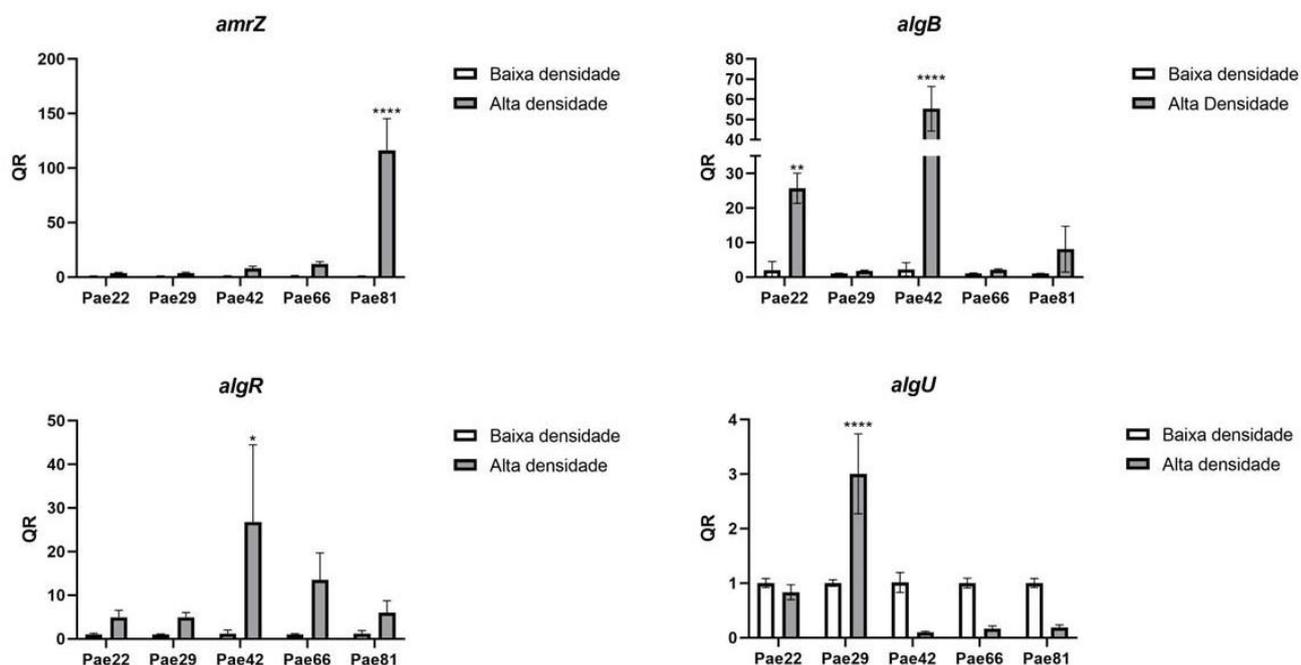
Os genes *lasI* e *rhIR* apresentaram resultados marcantes em relação a quantificação relativa, com níveis de expressão em torno de 200 vezes. Esse desempenho pode estar relacionado a mecanismos reguladores desses genes, visto que reguladores transcricionais, como o LasR e RhIR, se ligam a autoindutores específicos para intensificar a expressão de genes determinados a causar virulência (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas tem sido direcionada a inibição de fatores de virulência na busca pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos. Dessa forma, o sistema Las de QS têm sido o mais investigado para o desenvolvimento de drogas antivirulência. Contudo, não houve o avanço necessário para o sucesso terapêutico (Soukariéh *et al.*, 2018). Diante disso, a busca por conhecimento sobre as propriedades desse sistema deverá facilitar descobertas para o desenvolvimento de uma terapêutica eficiente combinando a utilização de inibidores de *quorum sensing* com a terapia fágica.

5.4.3 Expressão relativa dos genes de ativação de biofilme em isolados clínicos de *P. aeruginosa* cultivados sob diferentes densidades

Os genes *amrZ*, *algB* e *algR* apresentaram um padrão semelhante no nível de expressão nos cinco isolados, os quais foram mais expressos diante do aumento populacional bacteriano. Entretanto, a expressão gênica de *amrZ* no isolado Pae81 e de *algB* no isolado Pae42 foi significativa, em mais de 100 e 50 vezes, respectivamente, quando comparada a baixa densidade (Figura 14). É importante a associação dos resultados da expressão desses genes, pois a regulação e produção de alginato, um dos principais constituintes do biofilme, é mediada através dos reguladores AlgR e AmrZ, logo representa possivelmente um mecanismo de proteção enquanto a bactéria está com risco de infecção em alta densidade (Baynham; Wozniak, 1996; Ryan Withers; Yin; Yu, 2014).

Figura 14. Expressão relativa dos genes *amrZ*, *algB*, *algR* e *algU* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *amrZ*, *algB*, *algR* e *algU* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em baixa e alta densidade. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se a baixa densidade como referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Outrossim, a expressão de *algB* pode estar ligada ao sistema dois componentes KinB/AlgB, que apresenta um papel importante na regulação da formação de biofilme, apontando eventualmente a regulação do alginato como fator de virulência e mecanismo de defesa, diante de um aumento populacional bacteriano (Borges *et al.*, 2020) A superexpressão de *algB* no isolado Pae42 pode ser um indicativo de que essa via está especialmente ativa, provavelmente como uma resposta ao ambiente de maior densidade celular.

De forma notável, todos os isolados, com exceção do Pae29, apresentaram um menor nível de expressão do gene *algU* em alta densidade. AlgU é um fator sigma alternativo fundamental na regulação de vários genes associados à produção de biofilme. De acordo com Borges e colaboradores (2019), quando *algU* é removido, há eliminação da repressão transcricional do sistema CRISPR-Cas, resultando no aumento dessa resposta imunológica (Borges *et al.*, 2019). Essa dinâmica pode sugerir um mecanismo específico que reprime a atuação de *algU* em alta densidade, para a seleção de defesa mediada por CRISPR.

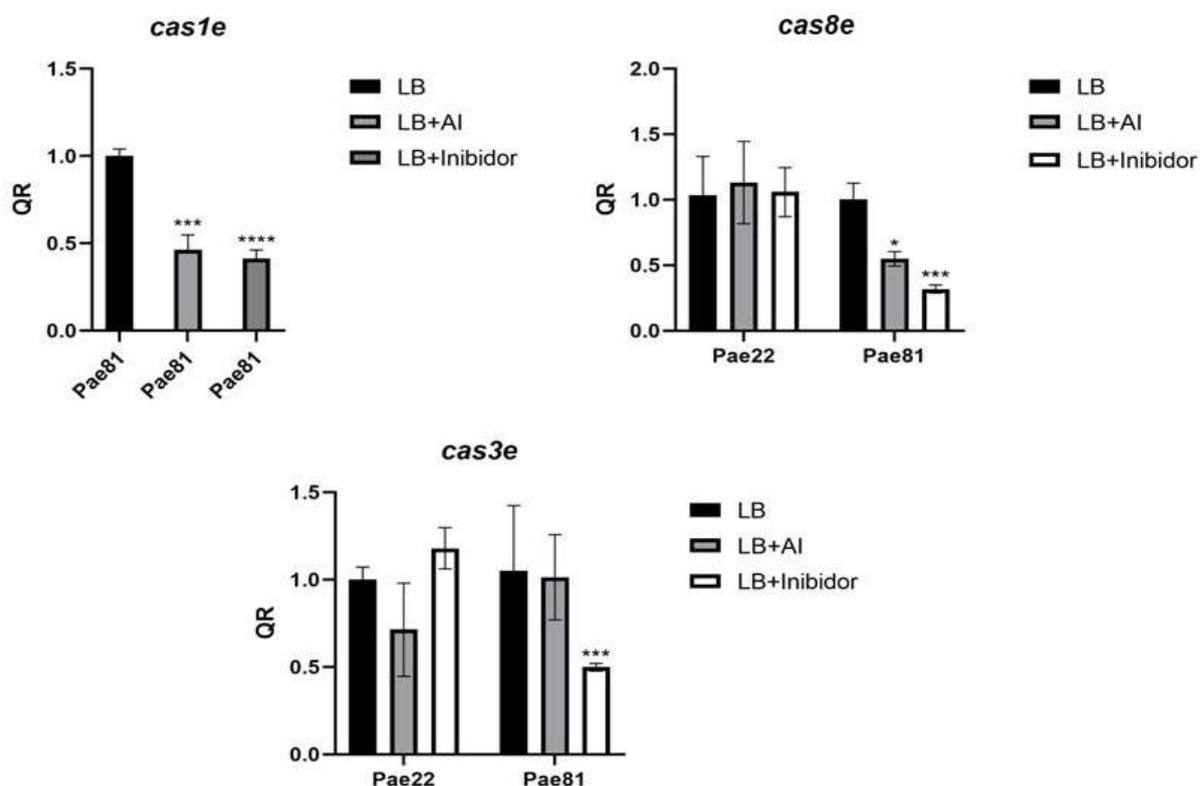
5.5 Avaliação quantitativa da expressão gênica em isolados clínicos de *P. aeruginosa* cultivados na presença de AI e inibidores de QS

5.5.1 Expressão relativa dos genes relacionados ao sistema CRISPR/Cas subtipo I-E e I-F na presença de substâncias autoindutoras e inibidoras que QS

Os dados experimentais revelam variações significativas na expressão dos genes *cas* do subtipo I-E entre os diferentes isolados (Figura 15). O isolado Pae81 apresentou uma diminuição da expressão de *cas1e* e *cas8e* na presença tanto de AIs quanto de inibidores de QS, o que sugere que esses compostos podem inibir a atividade desses genes em condições específicas. Esse achado é consistente com o conhecimento de que o QS pode afetar a regulação de fatores de virulência e, indiretamente, de sistemas associados, como o CRISPR-Cas (Dela Ahator *et al.*, 2022).

A redução da expressão observada pode estar ligada a uma regulação via intermediários, como o regulador de fator de virulência, previamente descrito como um regulador positivo do sistema CRISPR-Cas tipo I-F em *P. aeruginosa* (Dela Ahator *et al.*, 2022). De acordo com Dela Ahator e colaboradores, o regulador de fator de virulência poderia regular a expressão do sistema CRISPR-Cas independentemente dos sinais gerados pelo QS, indicando que existem outras vias regulatórias que o ligam ao controle desse sistema, sem a necessidade de coordenação baseada em densidade celular (Dela Ahator *et al.*, 2022).

Figura 15. Expressão relativa dos genes *cas1e*, *cas8e* e *cas3e* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos na presença de AI e inibidores de QS



Fonte: A autora.

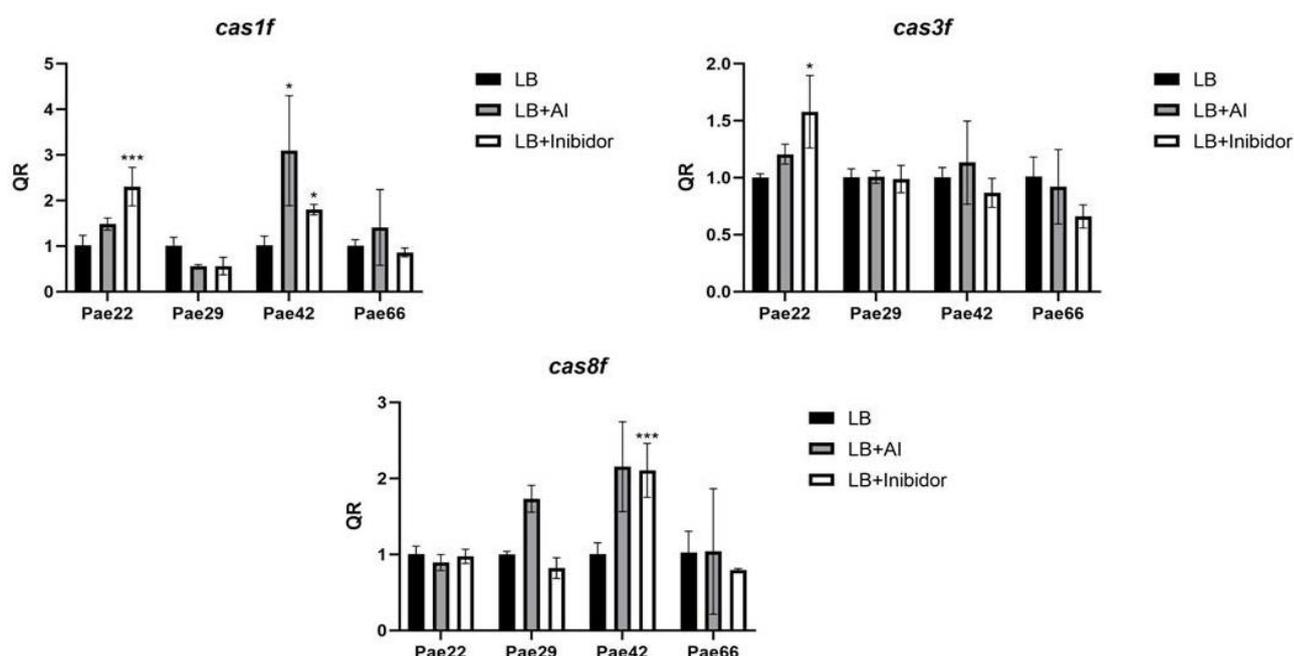
Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *cas1e*, *cas8e* e *cas3e* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em meio LB, meio LB+Als e meio LB+Inibidor de QS. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se o meio LB como referência. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Por outro lado, o isolado Pae22, que não expressa *cas1e*, exibiu uma expressão aumentada de *cas3e* na presença de inibidor de QS. Esse resultado pode indicar que, embora o QS tenha impacto em diversos genes *cas*, diferentes genes respondem de maneira distinta aos inibidores de QS, possivelmente por meio de vias alternativas ou reguladores independentes dos principais reguladores QS, como LasR e RhIR (Høyland-Kroghsbo *et al.*, 2017).

No isolado Pae42, a presença de Als levou a um aumento significativo na expressão dos genes *cas1f* e *cas8f*, sugerindo que os Als podem, de fato, estimular a atividade de genes CRISPR/Cas, mas de forma seletiva dependendo do isolado.

Contudo, de forma interessante, o isolado Pae22 foi o único que apresentou maior nível de expressão gênica na presença de inibidor para todos os genes *cas* do subtipo I-F investigados (Figura 16). A resposta diferencial entre os isolados reforça a complexidade da regulação QS sobre o sistema CRISPR/Cas.

Figura 16. Expressão relativa dos genes *cas1f*, *cas3f* e *cas8f* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos na presença de AI e inibidores de QS



Fonte: A autora.

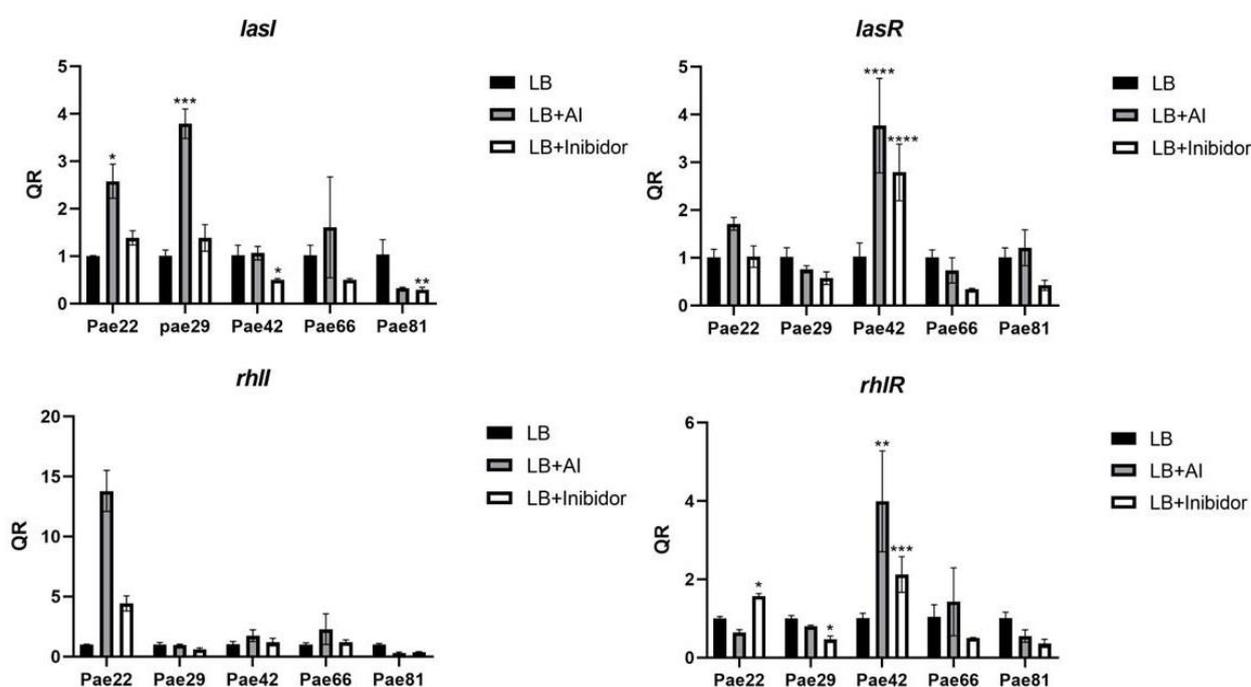
Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *cas1f*, *cas3f* e *cas8f* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em meio LB, meio LB+AIs e meio LB+Inibidor de QS. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se o meio LB como referência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.5.2 Expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de Quorum Sensing na presença de substâncias autoindutoras e inibidoras de QS

A avaliação da expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de QS foi realizada nos cinco isolados (Figura 17). Foi possível observar que para os genes dos sistemas Las, quase todos os isolados apresentaram um maior nível de

expressão na presença de AI quando comparados apenas ao meio controle, com exceção do isolado Pae81 para o gene *lasI* e dos isolados Pae29 e Pae66 para o gene *lasR*. Curiosamente, os isolados Pae29 e Pae42 apresentaram um perfil de expressão gênica semelhante para os genes *lasI* e *lasR*, respectivamente, em até 4 vezes.

Figura 17. Expressão relativa dos genes *lasI*, *lasR*, *rhII* e *rhIR* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas positivos na presença de AI e inibidores de QS



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação relativa (QR) dos níveis de expressão dos genes *lasI*, *lasR*, *rhII* e *rhIR* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em meio LB, meio LB+AIs e meio LB+Inibidor de QS. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, utilizando-se o meio LB como referência. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Para o gene *lasI*, os isolados Pae42 e Pae81 apresentaram resultados significativos na presença de inibidores de QS. Em relação ao perfil de expressão gênica, a presença de inibidores proporcionou um menor nível de expressão comparado ao meio referencial.

Os isolados clínicos apresentaram um padrão na expressão gênica para o gene *rhII*, com exceção do isolado Pae22. Nesse isolado, o gene *rhII* foi expresso em quase

15 vezes na presença de AI, em comparação ao controle. Interessantemente, esse mesmo isolado apresentou uma expressão gênica diferente para o gene *rhIR*. A inclusão de inibidores resultou em um maior nível de expressão do gene, enquanto a adição de AI gerou um menor nível de expressão gênica.

Notavelmente, para o gene *rhIR*, o isolado Pae42 demonstrou resultados significativos e semelhantes ao do gene *lasR*, visto que na presença de AI foi expresso 4 vezes, comparado ao meio controle.

Os resultados obtidos revelam um panorama complexo sobre o papel dos sinais ou moléculas autoindutoras na regulação da expressão. Em geral, é relatado que a produção de sinais autoindutores pode resultar em um feedback positivo, promovendo um aumento significativo na produção de fatores controlados por sinais e QS (Bhardwaj *et al.*, 2021). No entanto, é importante destacar que nem todos os achados do presente trabalho corroboram com essa dinâmica.

Enquanto a maior parte dos resultados corroboram a ideia de que a detecção de AIs facilita a produção de AIs adicionais e potencializa a expressão gênica, outros resultados indicam que o efeito não é abrangente. Em certos casos, a presença de AIs não levou ao aumento esperado na expressão de genes. Estes achados sugerem que a relação entre a produção de AIs e a amplificação da expressão gênica pode ser influenciada por outros fatores ou condições experimentais que não foram completamente controlados neste estudo.

Portanto, os resultados em geral afirmam a hipótese de AIs e a amplificação da expressão de genes do mecanismo de QS, mas é crucial considerar que o QS é um mecanismo complexo, envolvido com diversas outras vias e possui diversos mecanismos de regulação que podem influenciar esses processos.

Em relação aos inibidores de QS, os dados encontrados no presente trabalho indicam a redução de forma significativa da expressão do gene *lasI*, comparado ao meio de referência. Esse achado está alinhado com o que é descrito na literatura, que inibidores de QS têm um efeito de redução sobre a produção de sinais autoindutores (Luo *et al.*, 2016). No entanto, a resposta do gene *rhIR* apresentou um padrão inesperado: a presença de inibidores aumentou a expressão deste gene, enquanto a adição de autoindutores causou uma diminuição. Essa divergência pode refletir a presença de mecanismos regulatórios adicionais.

Essas diferenças ressaltam a complexidade do sistema de sinalização QS e indicam a necessidade de estudos adicionais para compreender melhor como

diferentes inibidores e autoindutores influenciam a expressão gênica.

6 CONCLUSÕES

- a) Nos isolados clínicos estudados, o sistema CRISPR/Cas demonstrou ser mais ativo em alta densidade, quando comparado a baixa densidade, corroborando com os achados da literatura;
- b) Todos os genes associados ao mecanismo de QS apresentaram maiores níveis de expressão, diante do aumento na concentração populacional bacteriana;
- c) Os genes *amrZ*, *algB* e *algR* apresentaram um padrão semelhante no nível de expressão nos cinco isolados, os quais foram mais expressos em alta densidade;
- d) Com exceção do Pae29, todos os isolados clínicos utilizados demonstraram menor expressão de *algU* em alta densidade;
- e) Os genes relacionados aos sistemas CRISPR/Cas e QS apresentaram maiores níveis de expressão na presença de autoindutores na maioria dos isolados clínicos estudados;
- f) No isolado Pae22, a presença de inibidores resultou em um aumento na expressão de todos os genes *cas* do subtipo I-F, assim como do gene *rhIR*.

REFERÊNCIAS

- CRISPRCas database (2022). Disponível em: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>. Acesso em 04/09/2024.
- OMS – Organização Mundial de Saúde (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. Acesso em: 30/08/2024.
- AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 67–76, 2016.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–20, 2013.
- BARRANGOU, R. *et al.* Against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234–244, 2014.
- BAYNHAM, P. J.; WOZNIAK, D. J. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* algD transcription. **Molecular Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 97–108, 1996.
- BÉDARD, E.; PRÉVOST, M.; DÉZIEL, E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. **MicrobiologyOpen**, v. 5, p. 937–956, 2016.
- BELKUM, A. VAN *et al.* Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 6, n. 6, p. 1–13, 2015.
- BHARDWAJ, S. *et al.* Growing emergence of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and attenuation of its virulence using quorum sensing inhibitors: A critical review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 6, p. 699–719, 2021.
- BORGES, A. L. *et al.* CRISPR-Cas Immunity Repressed by a Biofilm-Activating Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. **bioRxiv**, 2019.
- BORGES, A. L. *et al.* Bacterial alginate regulators and phage homologs repress CRISPR-Cas immunity. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 679–687, 2020.
- BOLOTIN, A. *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005.

BONDY-DENOMY, J. *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 429–432, 2013.

BURMISTRZ, M.; PYRĆ, K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 193–202, 2015.

CADY, K. C. *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.

CENDRA, M. DEL M.; TORRENTS, E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. **Biotechnology Advances**, v. 49, 2021.

CHEVALIER, S. *et al.* Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 5, n. 41, p. 698–722, 2017.

DAVARZANI, F. *et al.* Different effects of sub-minimum inhibitory concentrations of gentamicin on the expression of genes involved in alginate production and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 808–816, 2021.

DE SOUSA, T. *et al.* Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12892, 2021.

DEVI, V.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. CRISPR-Cas systems: role in cellular processes beyond adaptive immunity. **Folia microbiologica**, v. 67, n. 6, p. 837–850, 2022.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51–65, 2018.

DELA AHATOR, S. *et al.* The virulence factor regulator and quorum sensing regulate the type I-F CRISPR-Cas mediated horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 987656, 2022.

DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology (Reading)**, v. 166, n. 1, p. 30–33, 2020.

DY, R. L. *et al.* Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 307–331, 2014.

ESSOH, C. *et al.* The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

GOLDOVÁ, J. *et al.* A Eukaryotic-Type Signalling System of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Oxidative Stress Resistance, Intracellular Survival and Virulence. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 437, 2011.

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

- HAFT, D. H. *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 6, p. 0474–0483, 2005.
- HATOUM-ASLAM, A.; MARRAFFINI, L. A. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 320–331, 2014.
- HILLE, F. *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 2018.
- HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 10, n. 4, p. 441–451, 2010.
- HOE, N. *et al.* Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 254–263, 1999.
- HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 167–170, 2010.
- HØYLAND-KROGHSBO, N. M. *et al.* Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 1, p. 131–135, 2017.
- ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.
- JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002.
- JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.
- KARRULI, A. *et al.* Evidence-Based Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Critical Reappraisal. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 399, 2023.
- KERR, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 338–344, 2009.
- KIM, S. *et al.* Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 22, p. e01584-20, 2020.
- KLOCKGETHER, J.; TÜMMLER, B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 1261, 2017.
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 10, p. 2812–2825, 2017.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 347, p. 20180087, 2019.

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.

KUNIN, V.; SOREK, R.; HUGENHOLTZ, P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. **Genome Biology**, v. 8, n. 4, p. R61, 2007.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 41, p. 22–26, 2002.

LUO, J. *et al.* Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFκB signal-transduction pathways. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 183–203, 2016.

LUZ, A. C. de O. *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: MGG**, v. 294, n. 5, p. 1095–1105, 2019.

MA, L. *et al.* Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, 2009.

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

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

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

MAKAROVA, K. S. *et al.* Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 18, n. 2, p. 67–83, 2020.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 6, p. 1392–1400, 2013.

MAURICE, N. M.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 4, p. 428–439, 2018.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual review of microbiology**, V. 55(1), p. 165–199, 2001.

- MCCOURT, J. *et al.* Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. **FEMS microbiology**, v. 353, n. 2, p. 157–164, 2014.
- MOJICA, F. J. M. *et al.* Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 85–93, 1995.
- MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.
- 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. Pt 4, p. 1113, 2017.
- NISHIMASU, H.; NUREKI, O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 43, p. 68–78, 2017.
- PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit: a critical review. **Genes & Diseases**, v. 6, n. 2, p. 109–119, 2019.
- PANG, Z. *et al.* Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.
- PEARSON, J. P. *et al.* A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, n. 5, p. 1490–1494, 1995.
- PESCI, E. C. *et al.* Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 10, p. 3127–3132, 1997.
- QIAN, Y. *et al.* Application of CRISPR-Cas system in the diagnosis and therapy of ESKAPE infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1223696, 2023.
- QIN, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 199, 2022.
- RATH, D. *et al.* The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, p. 119–128, 2015.
- REN, J. *et al.* Structural and mechanistic insights into the inhibition of type I-F CRISPR-Cas system by anti-CRISPR protein AcrIF23. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 7, p. 102124, 2022.
- 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.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427, 2012.

RYAN WITHERS, T.; YIN, Y.; YU, H. D. Identification of novel genes associated with alginate production in *Pseudomonas aeruginosa* using Mini-Himar1 mariner transposon-mediated mutagenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 85, p. 2–7, 2014.

SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, n. April, p. 37, 2014.

SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

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

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

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959–964, 2000.

SULTAN, M.; ARYA, R.; KIM, K. K. Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 12152, 2021.

THI, M. T. T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

TUON, F. F. *et al.* Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. **Pathogens**, v. 11, n. 3, 2022.

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

VU, B. *et al.* Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535–2554, 2009.

WEI, Q.; MA, L. Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 20983–20995, 2013.

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.

WU, Q. *et al.* CRISPR-Cas systems target endogenous genes to impact bacterial physiology and alter mammalian immune responses. **Molecular Biomedical**, v. 3, n. 1, p. 22, 2022.