

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

JULIA MARIANA ASSIS DA SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

RECIFE

2020

JULIA MARIANA ASSIS DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Coorientador(a):

Dr. Danilo Elias Xavier

Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- S586a Silva, Julia Mariana Assis da.
Análise da expressão gênica do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*/Julia Mariana Assis da Silva. - Recife: [s.n.], 2020.
84 p.: il., graf.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.
Orientadora: Tereza Cristina Leal Balbino; coorientadores: Danilo Elias Xavier, Ana Carolina de Oliveira Luz.
1. Sistemas CRISPR-Cas. 2. Expressão gênica. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Xavier, Danilo Elias. III. Luz, Ana Carolina de Oliveira. I. Título.

JULIA MARIANA ASSIS DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA CRISPR/CAS EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 05/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos – Titular Interno
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana – Titular externo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho aos que sempre acreditaram em mim, e em especial à minha mãe, irmã e sobrinho, que sempre com muito amor e paciência, me deram forças para enfrentar os meus medos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Tereza Cristina Leal Balbino, toda minha admiração e gratidão. Agradeço não apenas pela orientação, mas por todo o incentivo, confiança e amizade ao longo desses anos. Obrigada por todos os ensinamentos e pelo exemplo profissional.

À minha coorientadora Dra. Ana Carolina Luz, por todo o conhecimento compartilhado, pelo apoio e incentivo. Seu carinho e paciência durante todo o processo, foram fundamentais para que eu continuasse.

Ao meu coorientador Dr. Danilo Elias Xavier pela disponibilidade em contribuir com o trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

À minha família, por todo amor, incentivo e apoio emocional. Em especial à minha mãe, minha irmã e meu sobrinho. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Aos queridos amigos Stephanny, Maressa, Yallen, Tallyta e Janderson, pelo compartilhamento de conhecimento científico e amizade. O apoio de vocês foi essencial para a realização desse trabalho.

Aos técnicos e colegas do Departamento de Microbiologia – IAM/Fiocruz, por me ajudarem direta ou indiretamente.

À banca avaliadora pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Aos órgãos de fomento FACEPE e CNPq, pela concessão de bolsa e financiamento, que possibilitaram a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

SILVA, Julia Mariana Assis da. **Análise da expressão gênica do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

O sistema CRISPR/Cas corresponde a um mecanismo adaptativo de defesa, encontrado em arqueas e bactérias, formado por dois elementos principais: as proteínas Cas e um arranjo CRISPR, que é um *locus* composto por repetições diretas interespaçadas por sequências únicas provenientes de elementos genéticos móveis (espaçadores). *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista, comumente associado a infecções hospitalares, por frequentemente ser resistente a várias classes de antimicrobianos e por produzir biofilme. Sistemas CRISPR/Cas do tipo I, subtipos F e E, já foram encontrados em estudos prévios com este microrganismo. Embora o mecanismo de ação envolvido no processo de imunidade desse sistema seja bem compreendido, a atividade deste sistema nesta espécie, no entanto, ainda não é bem esclarecida. Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes do sistema CRISPR/Cas em 55 isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa*. Dos 50 isolados que possuem o tipo I-F, 76% expressam os dois genes investigados, 22% apenas um dos genes e 2% não apresentaram expressão de nenhum dos genes. Os 7 isolados que possuem o sistema tipo I-E expressaram os genes *cas8e* e *cas7*. Analisando a expressão relativa de alguns genes *cas* em 5 isolados, verificou-se que o sistema apresenta expressão constitutiva, e é ativo preferencialmente sob condições nutricionais ricas. Isolados contendo genes anti-CRISPR em seus genomas apresentaram um padrão de expressão dos genes *cas* reprimido, quando comparados com um isolado que não possui anti-CRISPR. Uma alteração no perfil de expressão desses genes ao longo do tempo também foi observada, o que sugere o envolvimento dos genes anti-CRISPR no controle regulatório desses genes. A expressão do sistema em isolados contendo fagos e espaçadores alvo pode sugerir uma inatividade, falha, ou brecha, nesse sistema, e demonstram a necessidade de mais estudos funcionais a este respeito em bactérias de interesse clínico.

Palavras-chave: Sistema CRISPR/Cas; Expressão gênica; *Pseudomonas aeruginosa*.

SILVA, Julia Mariana Assis da. **Analysis of gene expression of the CRISPR/Cas system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

The CRISPR/Cas system represents an adaptive defense mechanism, found in archaea and bacteria, formed by two main elements: Cas proteins, and a CRISPR array, which is a *locus* composed of direct repeats, interspersed by unique mobile sequences (spacers). *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen, commonly associated with nosocomial infections, as it is frequently resistant to various classes of antimicrobials, and a noteworthy biofilm producer. CRISPR/Cas systems type I, subtypes F and E, have already been described in previous studies for this microorganism. Although the mechanism of action involved in the immunity process of this system is well understood, the activity of this system in this species, however, remains rather unclear. Given this scenario, the objective of this work is to evaluate the expression of genes from the CRISPR/Cas system in Brazilian clinical isolates of *P. aeruginosa*. Of the 50 isolates that have type I-F, 76% express two of the investigated genes; 22%, only one of the genes; and 2%, do not show expression for any of the tested genes. All isolates that harbor the type I-E system are expressing the *cas8e* and *cas7* genes. Analysing the relative expression of some CRISPR/Cas genes, it was found that the system presents constitutive expression, and is preferably active under rich nutritional conditions. Isolates containing anti-CRISPR genes in their genomes presented a pattern of gene repression when compared to an isolate that does not have anti-CRISPR. A change in the expression profile of these genes over time has also been observed, which might suggest the involvement of anti-CRISPR genes in the regulatory control of these genes. The expression of the system in isolates containing phages and target spacers might suggest immune inactivity, failure, or a loophole in this system, and demonstrate the need for further functional studies regarding bacteria of clinical interest.

Keywords: CRISPR/Cas System; Gene expression; *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em micrografia eletrônica de varredura colorida digitalmente.	16
Figura 2 - Mecanismos propostos de resistência a antibióticos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figura 3 - Mecanismos de defesa bacterianos em diferentes estágios do ciclo de vida dos bacteriófagos.....	20
Figura 4 - Representação esquemática do <i>locus</i> CRISPR e seus componentes adjacentes.	22
Figura 5 - Representação das três etapas envolvidas no mecanismo imune do sistema CRISPR/Cas.	25
Figura 6 - Classificação dos Sistemas CRISPR/Cas de Classe 1.	28
Figura 7 - Classificação dos Sistemas CRISPR/Cas de Classe 2.	29
Figura 8 - <i>Locus</i> anti-CRISPR de fagos pertencentes a família Mu- <i>like</i>	33
Figura 9 - Representação esquemática do sistema CRISPR/Cas subtipo I-F na cepa PA14 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Figura 10 - Gel representativo da extração de RNA total de diferentes isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Figura 11 - Gel representativo dos produtos de RT-PCR para o gene <i>casI</i> de diferentes isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	54
Figura 12 - Géis representativos dos produtos de RT-PCR para os genes <i>cas</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-F.....	55
Figura 13 - Géis representativos dos produtos de RT-PCR para os genes <i>cas</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-E.	55
Figura 14 - Gráfico de amplificação do gene <i>rpsL</i> em ensaio de padronização.....	60
Figura 15 - Expressão relativa de genes <i>cas</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-F em meio LB. .	61

Figura 16 - Alinhamento múltiplo da proteína Cas1 do sistema tipo I-E de <i>P. aeruginosa</i>	62
Figura 17 - Expressão relativa do gene <i>cas8e</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-E em meio LB.	63
Figura 18 - Expressão relativa do gene <i>cas1</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-F sob diferentes condições nutricionais.	64
Figura 19 - Expressão relativa dos genes <i>cas1</i> e <i>cas8f</i> no isolado Pae42 sob diferentes condições nutricionais.	65
Figura 20 - Expressão relativa dos genes <i>cas1</i> e <i>cas8f</i> no isolado Pae29 sob diferentes condições nutricionais.	66
Figura 21 - Expressão relativa dos genes <i>cas1</i> e <i>cas8f</i> no isolado Pae42 quando comparado ao isolado Pae29, sob diferentes condições nutricionais.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Funções do sistema CRISPR/Cas além da imunidade adaptativa.....	31
Quadro 2 - Amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> positivas para o sistema CRISPR/Cas. ...	41
Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	46
Quadro 4 - Características dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> analisados pela qRT-PCR.	48
Quadro 5 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR.	49
Quadro 6 - Comparações nos níveis de expressão dos genes que compõem o sistema CRISPR/cas tipos I-F e I-E em diferentes condições nutricionais	50
Quadro 7 - Expressão qualitativa de genes <i>cas</i> do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F nos isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Quadro 8 - Expressão qualitativa de genes <i>cas</i> do sistema CRISPR/Cas tipo I-E nos isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Quadro 9 - Características dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acr	Proteína anti-CRISPR
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
cDNA	DNA complementar
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	RNA CRISPR
crRNP	<i>CRISPR Ribonucleoprotein Complexes</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Repetição Direta
DG	Repetição Degenerada
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
KTW	Modelo <i>Kill- the-Winner</i>
LB	Luria-Bertani
MGE	Elemento Genético Móvel
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAM	Motivo Adjacente ao Protoespaçador
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RNAi	RNA de interferência
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Transcriptase Reversa - PCR
tracrRNA	RNA CRISPR Transativador
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.2	Mecanismos de defesa bacterianos contra elementos invasores	19
2.3	Visão histórica do locus CRISPR	21
2.4	Estrutura do Sistema CRISPR/Cas	22
2.4.1	<i>Locus CRISPR</i>	22
2.4.2	Genes <i>cas</i>	23
2.5	Mecanismo de ação do Sistema CRISPR/Cas	24
2.6	Classificação do Sistema CRISPR/Cas	26
2.7	Funções além da imunidade	30
2.8	Mecanismo de inativação do sistema CRISPR/Cas: genes anti-CRISPR	32
2.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e o sistema CRISPR/Cas	34
3	JUSTIFICATIVA	37
4	PERGUNTA CONDUTORA	38
5	HIPÓTESE	39
6	OBJETIVOS	40
6.1	Objetivo geral	40
6.2	Objetivos específicos	40
7	METODOLOGIA	41
7.1	Amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estudadas	41
7.2	Curva de crescimento bacteriano	44
7.3	Extração do RNA total bacteriano e quantificação	45
7.4	Síntese de cDNA	45
7.5	RT-PCR	46

7.6	Análise do sistema CRISPR/Cas <i>in silico</i>	47
7.7	PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	48
7.7.1	Parâmetros analíticos da qPCR	49
8	ASPECTOS ÉTICOS	52
9	RESULTADOS	53
9.1	Extração de RNA e remoção de DNA genômico contaminante	53
9.2	Avaliação qualitativa da expressão de genes <i>cas</i> dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E nos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	54
9.3	Análise dos genomas e seleção dos isolados para avaliação da expressão quantitativa dos genes <i>cas</i>	58
9.4	Avaliação da expressão gênica	59
9.4.1	Validação do controle endógeno	59
9.4.2	Expressão relativa dos genes <i>cas</i> dos sistemas CRISPR/Cas tipo I-F e I-E	60
10	DISCUSSÃO	68
11	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O elemento genético *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) constitui uma família de DNA repetitivo presente no genoma de diversas espécies bacterianas e de arqueas. O *locus* CRISPR consiste em sequências altamente conservadas, denominadas repetições diretas (DR), inter espaçadas por sequências não repetitivas nomeadas espaçadores, que são oriundos de elementos genéticos móveis (MGEs), como bacteriófagos e plasmídeos. Esses *loci* são tipicamente flanqueados pelos genes das proteínas Cas (*CRISPR-associated*), os quais codificam uma variedade de proteínas com funções diversas.

O sistema CRISPR/Cas é, primariamente, uma maquinaria adaptativa de defesa que permite aos procariotos protegerem-se contra a invasão de MGEs, tais como bacteriófagos, plasmídeos e transposons. Seu funcionamento depende da inserção no *locus* CRISPR, como espaçadores, de pequenos fragmentos de DNA de origem viral e plasmidial, e posterior degradação de sequências correspondentes ao fragmento adquirido. As proteínas Cas desempenham um importante papel na mediação dos RNAs CRISPR (crRNAs), indispensáveis neste processo biológico.

Para o funcionamento do sistema CRISPR/Cas, são necessárias três etapas principais: adaptação, expressão e interferência. A etapa de adaptação ocorre quando a bactéria entra em contato com o bacteriófago ou plasmídeo pela primeira vez; e, é durante esta etapa, que acontece a fragmentação do DNA exógeno, o reconhecimento de potenciais espaçadores, e incorporação do novo espaçador no início do *locus* CRISPR. A etapa de expressão consiste na transcrição do *locus* CRISPR em uma grande molécula de RNA conhecida como pré-RNA CRISPR (crRNA), e posterior clivagem desta molécula em diversos pequenos crRNAs. Na etapa de interferência, o complexo proteico efetor, formado por proteínas Cas, associado ao crRNA, reconhece a nova molécula de DNA exógeno através do pareamento de bases entre o fragmento invasor e o complexo efetor. Uma vez feito o pareamento, uma nuclease é recrutada para que ocorra a clivagem deste material.

Atualmente, com o aumento do interesse no desenvolvimento de métodos alternativos para debelar infecções causadas por microrganismos multirresistentes, têm-se voltado para a fagoterapia - uso terapêutico de bacteriófagos para o tratamento de infecções causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos - e a compreensão da interação, mecanismos, e co-evolução entre bactérias e bacteriófagos tem adquirido maior importância.

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador, considerado um dos principais patógenos de infecções hospitalares. Como infecções por *P. aeruginosa* são frequentemente resistentes a várias classes dos antimicrobianos utilizados na clínica, e pela dificuldade de fármacos penetrarem na matriz polimérica do biofilme, tem-se buscado desenvolver estratégias alternativas para o combate deste microrganismo, como, por exemplo, o uso da fagoterapia. Para tanto, é necessário compreender as características do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa* e sua funcionalidade neste microrganismo, porém, até o momento, poucos estudos foram feitos com o intuito de esclarecer as nuances deste sistema em isolados clínicos desta espécie.

Cerca de 30% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* possuem um sistema CRISPR/Cas, sendo este do Tipo I. Em sua grande maioria, o subtipo presente é o I-F, porém já existem descrições do subtipo I-E e, mais recentemente, foi reportada a presença do subtipo I-C em poucos isolados. Em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa, foram observados isolados positivos para os sistemas Tipo I-F e I-E em isolados clínicos brasileiros. Apesar da cepa-controle UCBPP-PA14 ser considerada modelo para estudos do sistema CRISPR/Cas Tipo I-F, estudos acerca da funcionalidade deste sistema, bem como do sistema Tipo I-E, são escassos em isolados provenientes de amostras clínicas.

Dessa forma, o presente trabalho propôs uma análise da expressão do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos permitirão ampliar o conhecimento sobre os diferentes mecanismos dos sistemas CRISPR/Cas utilizados por este microrganismo, auxiliando na compreensão da possível interferência da maquinaria na multirresistência bacteriana e da utilização de fagos como alternativa terapêutica no tratamento de infecções.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

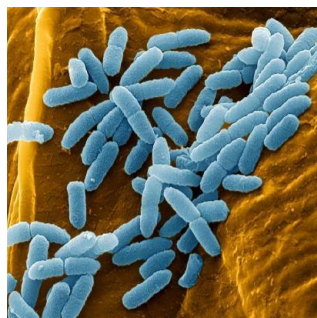
O CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) constitui uma família de DNA repetitivo presente no genoma de diversas espécies bacterianas e de arqueas. Esse sistema funciona como uma maquinaria de defesa bacteriana contra elementos genéticos móveis, em particular bacteriófagos, plasmídeos e transposons.

Pesquisas têm revelado a importância deste sistema para inúmeras aplicações, como estudos da resistência bacteriana a fagos; controle da disseminação de genes via transferência horizontal; genotipagem de cepas e dinâmica populacional microbiana. Porém, até o momento, poucos estudos foram realizados com o intuito de esclarecer as nuances do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, em relação à sua estrutura, organização e funcionamento.

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, não fermentadora, pertencente à família Pseudomonadaceae. Esses microrganismos apresentam-se como bacilos, aeróbios estritos, oxidase-positivos, com flagelo polar, medindo cerca de 0,5-1,0 µm de diâmetro e 1,5-5,0 µm de comprimento (Figura 1). Devido a sua extensa versatilidade metabólica e adaptabilidade a baixas concentrações de nutrientes, essa bactéria possui habilidade para colonizar diversos nichos ecológicos, incluindo solo, plantas, água e animais (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; BÉDARD; PRÉVOST; DÉZIEL, 2016; PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2017).

Figura 1 - Bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em micrografia eletrônica de varredura colorida digitalmente



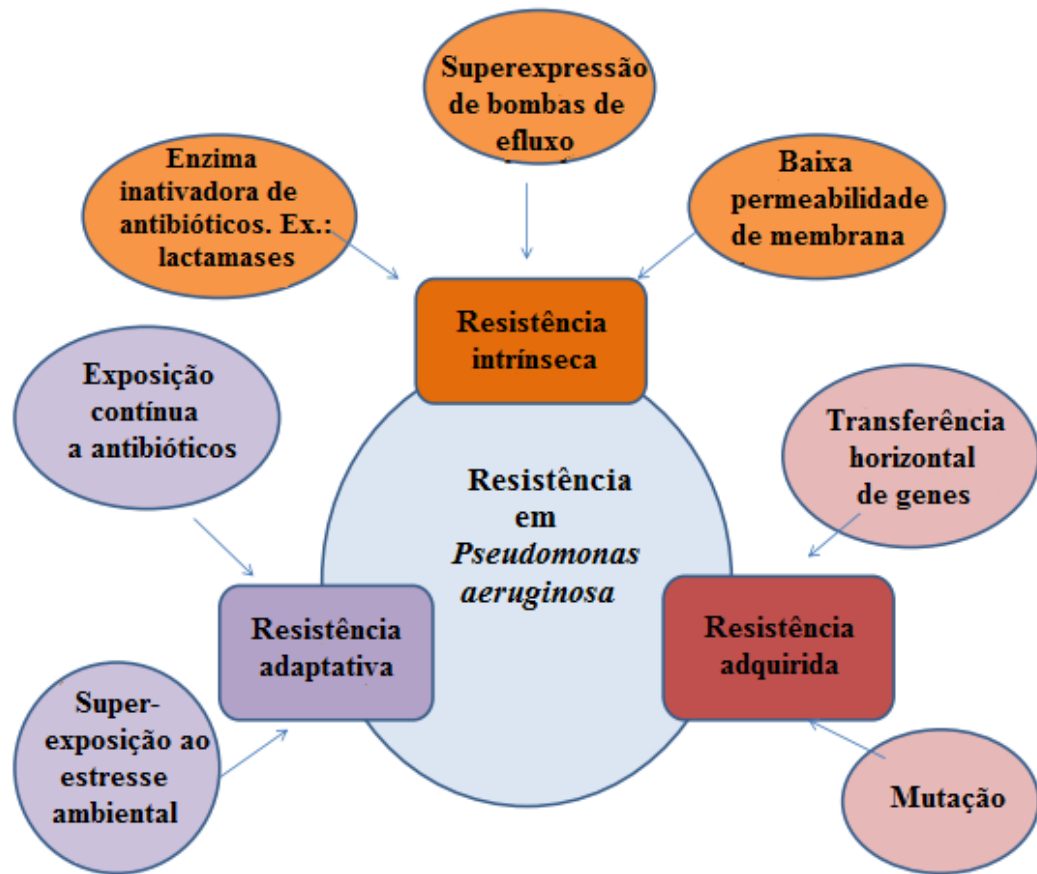
Fonte: Juergen Berger (2013).

Considerado um patógeno oportunista, esta espécie bacteriana é encontrada predominantemente em ambiente hospitalar e está associada a uma ampla gama de infecções agudas e crônicas em humanos (CURRAN; BOLIG; TORABI-PARIZI, 2018). As populações de risco incluem, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, tais como pacientes com neutropenia profunda, queimaduras graves, neonatos e pacientes admitidos em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI). Nestes grupos, a morbidade e a mortalidade atribuíveis à infecção por *P. aeruginosa* podem ser altas (KERR; SNELLING, 2009). Devido a sua capacidade de sobreviver em superfícies inorgânicas, esta espécie também se encontra amplamente relacionada a infecções como pneumonia associada ao uso de ventiladores, infecções urinárias associadas a cateter e infecções pós-cirúrgicas (KLOCKGETHER; TÜMMLER, 2017; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Pseudomonas aeruginosa possui um extenso genoma de aproximadamente 5 a 7 mega pares de bases (Mpb), codificando cerca de 5.567 genes. A plasticidade genômica de *P. aeruginosa* contribui para a sua adaptação e manutenção em diferentes habitats, como também, permite a aquisição de resistência a várias classes de antibióticos (LAMBERT, 2002; PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019).

Segundo Moradali *et al.* (2017), a resistência a antibióticos é uma característica natural de *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode apresentar-se resistente tanto devido a mecanismos intrínsecos, como também por mecanismos adquiridos (Figura 2). Um importante mecanismo para a rápida aquisição de resistência a antibióticos neste patógeno, é através da incorporação de MGEs (MORADALI; GHODS; REHM, 2017; SUBEDI; VIJAY; WILLCOX, 2018).

Figura 2 - Mecanismos propostos de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Pachori *et al.* (2019, tradução nossa).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde publicou uma lista com os agentes patogênicos prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. O grupo classificado como Crítico inclui bactérias multirresistentes, comuns em hospitais e entre pacientes que utilizam respiradores artificiais e cateteres intravenosos. Entre elas estão *Acinetobacter baumannii*, membros da família Enterobacteriaceae, e *P. aeruginosa*, sendo estes microrganismos resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

O gerenciamento das infecções causadas por *P. aeruginosa* torna-se dificultado não apenas pela inerente resistência a antimicrobianos, mas também pela capacidade que este microrganismo tem para formar biofilme. (GELLATLY; HANCOCK, 2013; RUIZ-GARBAJOSA; CANTON, 2017). As células presentes no biofilme tendem a apresentar uma

maior resistência a antimicrobianos, não apenas pelos possíveis mecanismos moleculares de resistência presentes, mas também pela dificuldade do antimicrobiano em penetrar com eficácia na matriz polissacarídica que compõe essa estrutura (HATOUM-ASLAM; MARRAFFINI, 2014; MCCOURT *et al.*, 2014).

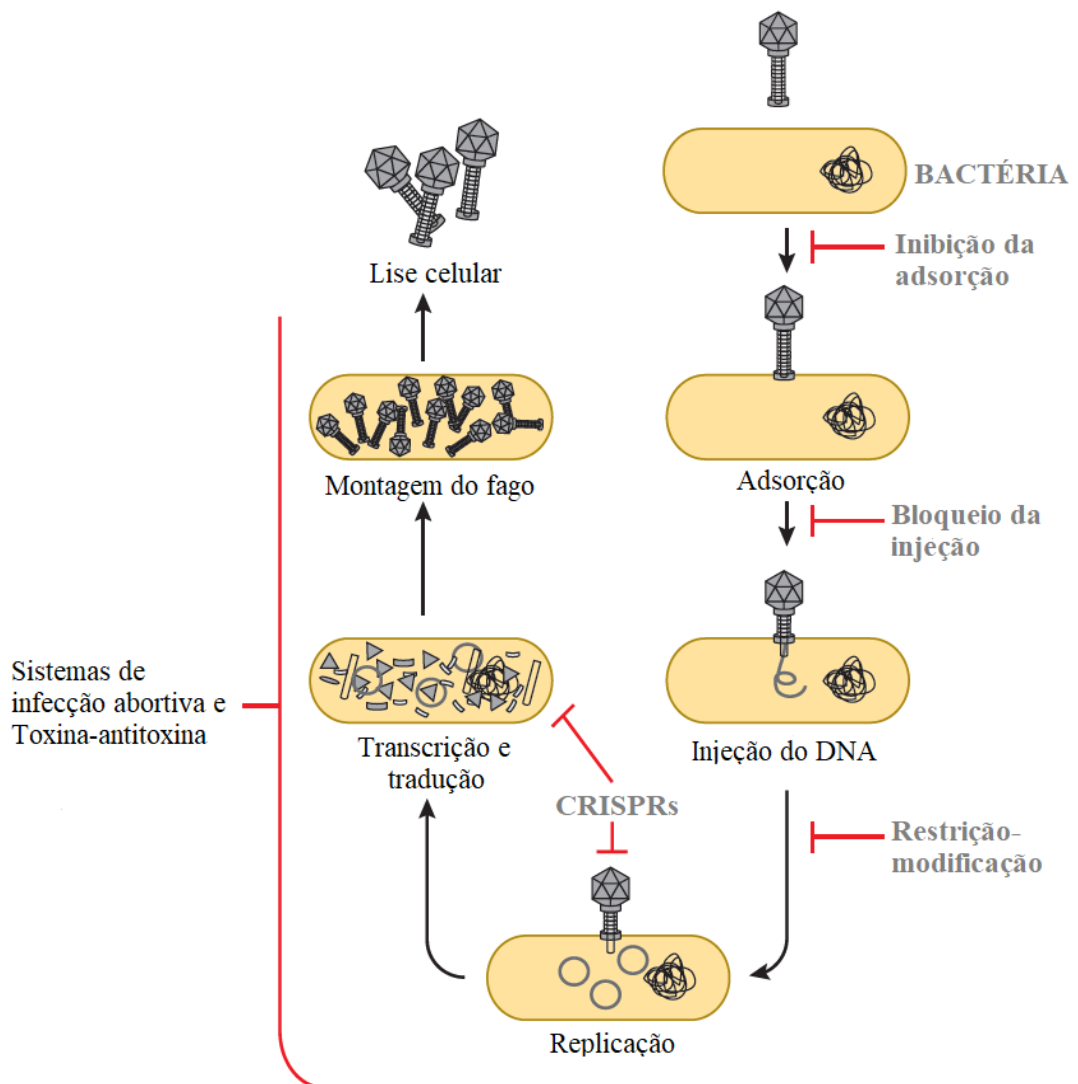
2.2 Mecanismos de defesa bacterianos contra elementos invasores

A evolução dos mecanismos de resistência dos hospedeiros contra os parasitas é fundamental para a manutenção da diversidade genética e fenotípica dos organismos envolvidos. A forte pressão imposta por múltiplos parasitas faz com que seus hospedeiros desenvolvam variados mecanismos específicos, ou um mecanismo geral de resistência (KOSKELLA *et al.*, 2012).

Os bacteriófagos (ou fagos) e os seus hospedeiros bacterianos constituem o grupo de organismos mais abundantes e que apresentam maior diversidade genética no planeta. Estão envolvidos em um ciclo contínuo de co-evolução, no qual os fagos contribuem na manutenção da diversidade bacteriana e na transferência horizontal de genes entre bactérias, enquanto evoluem estratégias de exploração das células hospedeiras procarióticas para sua própria replicação (KOSKELLA; BROCKHURST, 2014; LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; WEITZ *et al.*, 2013).

Infecções constantes por fagos impõem uma forte pressão seletiva nas bactérias, fazendo com que essas desenvolvam várias estratégias de defesa que atuam em todos os estágios do ciclo de desenvolvimento dos fagos. Os sistemas bacterianos de defesa aos fagos incluem: o bloqueio da injeção do DNA na célula hospedeira; a inibição da adsorção do fago à superfície bacteriana; a degradação do ácido nucleico do fago através de sistemas de modificação e restrição; o suicídio celular por meio da infecção abortiva; sistemas toxina-antitoxina e o sistema CRISPR/Cas (Figura 3) (DY *et al.*, 2014; SEED, 2015).

Figura 3 - Mecanismos de defesa bacterianos em diferentes estágios do ciclo de vida dos bacteriófagos



Fonte: Adaptado de Dy *et al.* (2014, tradução nossa).

Em resposta ao arsenal de defesa bacteriano, os fagos co-evoluem e desenvolvem rapidamente diversas estratégias para escapar dos mecanismos de resistência bacterianos. Dentre as estratégias utilizadas por esses vírus estão os rearranjos genômicos, as mutações pontuais em genes específicos e o compartilhamento genômico com outros vírus ou genomas de outros microrganismos. O resultado dessa complexa dinâmica de co-evolução é uma corrida armada molecular entre fagos e seus hospedeiros bacterianos (SAMSON *et al.*, 2013; SEED, 2015).

2.3 Visão histórica do *locus* CRISPR

A primeira descrição estrutural do CRISPR ocorreu em 1987, quando Ishino *et al.* identificaram uma estrutura nucleotídica incomum, composta por sequências repetidas e sequências espaçadoras, próxima ao gene *iap* em *Escherichia coli* K12 (ISHINO *et al.*, 1987). Estruturas homólogas foram posteriormente identificadas em outras espécies bacterianas e de arqueas, tais como *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes* e *Mycobacterium tuberculosis* (GROENEN *et al.*, 1993; HOE *et al.*, 1999; MOJICA *et al.*, 1995).

Em 2000, Mojica *et al.* visando entender a importância biológica desses elementos, desenvolveram um estudo comparativo dessas sequências entre grupos filogeneticamente distantes, no qual descreveram essa família de sequências repetitivas como repetições curtas regularmente espaçadas (*Short Regularly Spaced Repeats*), porém, à época, não foram associadas a uma função específica (MOJICA *et al.*, 2000).

Apenas em 2002, baseando-se em uma caracterização sistemática do genoma de diferentes espécies bacterianas e de arqueas, Jansen *et al.* (2002) propuseram uma nova nomenclatura para esta família de DNA repetitivo, sendo designado o termo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou Repetições palindrômicas Curtas e Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) (JANSEN *et al.*, 2002; PEREIRA, 2016, p. 30).

Ao longo dos anos, um conjunto de genes foi sendo identificado em procariotos contendo esses arranjos CRISPR, localizados invariavelmente próximos aos *loci*, indicando alguma possível relação funcional entre eles. Esses genes foram nomeados *cas* (*CRISPR-associated*), que futuramente viriam a se mostrar como elementos centrais no funcionamento do sistema CRISPR/Cas (HAFT *et al.*, 2005; JANSEN *et al.*, 2002).

A descoberta da similaridade entre as sequências espaçadoras do *locus* CRISPR com elementos de origem extracromossômica (principalmente derivados de fagos e plasmídeos) levou a hipótese de que o sistema CRISPR/Cas seria semelhante a um sistema imune adaptativo de procariotos e arqueas, conferindo imunidade específica contra elementos genéticos móveis através da integração de um novo espaçador ao *locus* (BOLOTIN *et al.*, 2005; MAKAROVA *et al.*, 2006; MOJICA *et al.*, 2005).

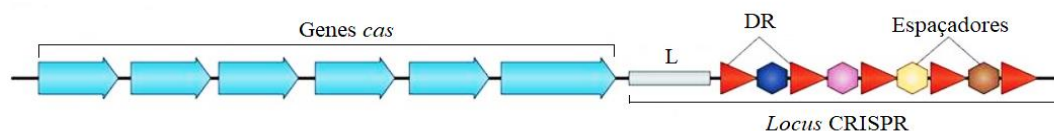
Estudos subsequentes comprovaram essa hipótese e desde então funções adicionais, além da imunidade, vêm sendo atribuídas ao sistema CRISPR/Cas (BARRANGOU *et al.*, 2007; HORVATH; BARRANGOU, 2010; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014). Esse sistema e seus elementos são, em geral, altamente variáveis entre os diferentes genomas em termos de ocorrência, composição gênica, sequências, número e tamanho (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014). De acordo com o CRISPRCas *database* (2020), esse sistema, em sua forma completa, já foi identificado em 75,3% dos genomas de arqueas e 36% dos genomas bacterianos disponíveis neste banco de dados.

2.4 Estrutura do Sistema CRISPR/Cas

2.4.1 *Locus* CRISPR

Os *loci* CRISPR possuem uma estrutura notadamente constante, que consiste em sequências repetidas, altamente conservadas, inter espaçadas por sequências variáveis nomeadas espaçadores (Figura 4). Os genomas podem possuir um ou múltiplos arranjos CRISPR, e esses podem estar presentes em ambos os DNAs cromossomal e plasmidial (BURMISTRZ; PYRĆ, 2015; JANSEN *et al.*, 2002; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005).

Figura 4 - Representação esquemática do *locus* CRISPR e seus componentes adjacentes



Fonte: Adaptado de Koonin e Krupovik (2015).

Legenda: Componentes do *locus* CRISPR: Sequência líder (L); Repetição Direta (DR) e espaçadores. As setas azuis representam os genes *cas*.

As sequências repetidas, também chamadas de Repetições Diretas (DR), são sequências de aproximadamente 24 a 48 pares de base (pb). Essas DRs apresentam em suas extremidades, uma simetria que, em geral, inclui as sequências complementares GTT e AAC,

assim como trechos de três ou quatro bases idênticas, principalmente resíduos de A ou T. Essas regiões de simetria e bases idênticas conferem uma estrutura secundária ao RNA resultante (JANSEN *et al.*, 2002; KUNIN; SOREK; HUGENHOLTZ, 2007). Em um único *locus* CRISPR, as DRs são quase sempre idênticas em relação ao tamanho e sequência, e apesar de diferirem entre espécies, elas podem ser classificadas com base na similaridade de sequências e habilidade em formar estruturas secundárias estáveis (SOREK; KUNIN; HUGENHOLTZ, 2008).

Na extremidade do *locus* CRISPR encontra-se uma sequência conservada rica em bases AT, com aproximadamente 200 a 500 pb, nomeada sequência líder. Esta região funciona como promotor do *locus* CRISPR, necessário tanto para a transcrição deste, quanto para aquisição de novos espaçadores. Convencionalmente, a última DR (mais distante da sequência líder) apresenta bases anômalas em relação à sequência das demais, e é então denominada Repetição Degenerada (DG) (JANSEN *et al.*, 2002; RATH *et al.*, 2015; RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

As sequências não repetitivas do *locus* CRISPR são chamadas de espaçadores e possuem entre 21 a 72 pb. Essas sequências apresentam alta similaridade com genomas de bacteriófagos, plasmídeos ou outros elementos extracromossômicos; no entanto, uma porcentagem de espaçadores descritos na literatura não apresenta similaridade de sequência com outros organismos, de forma que sua origem permanece desconhecida (BURMISTRZ; PYRĆ, 2015; RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

O número de espaçadores em um *locus* CRISPR é variável. Alguns sistemas possuem espaçadores complementares às sequências dentro do genoma ao qual está inserido. Até o momento, nenhuma função específica foi associada a esses espaçadores, sendo proposto que tenham sido incorporados acidentalmente (BURMISTRZ; PYRĆ, 2015; SOREK; KUNIN; HUGENHOLTZ, 2008).

2.4.2 Genes *cas*

A superfamília dos genes *cas* (*CRISPR-associated*) está presente, normalmente, em genomas que possuem o sistema CRISPR. Esses genes se encontram localizados adjacentes ao *locus* CRISPR, e podem estar tanto em ambos os lados do *locus*, como a algumas centenas

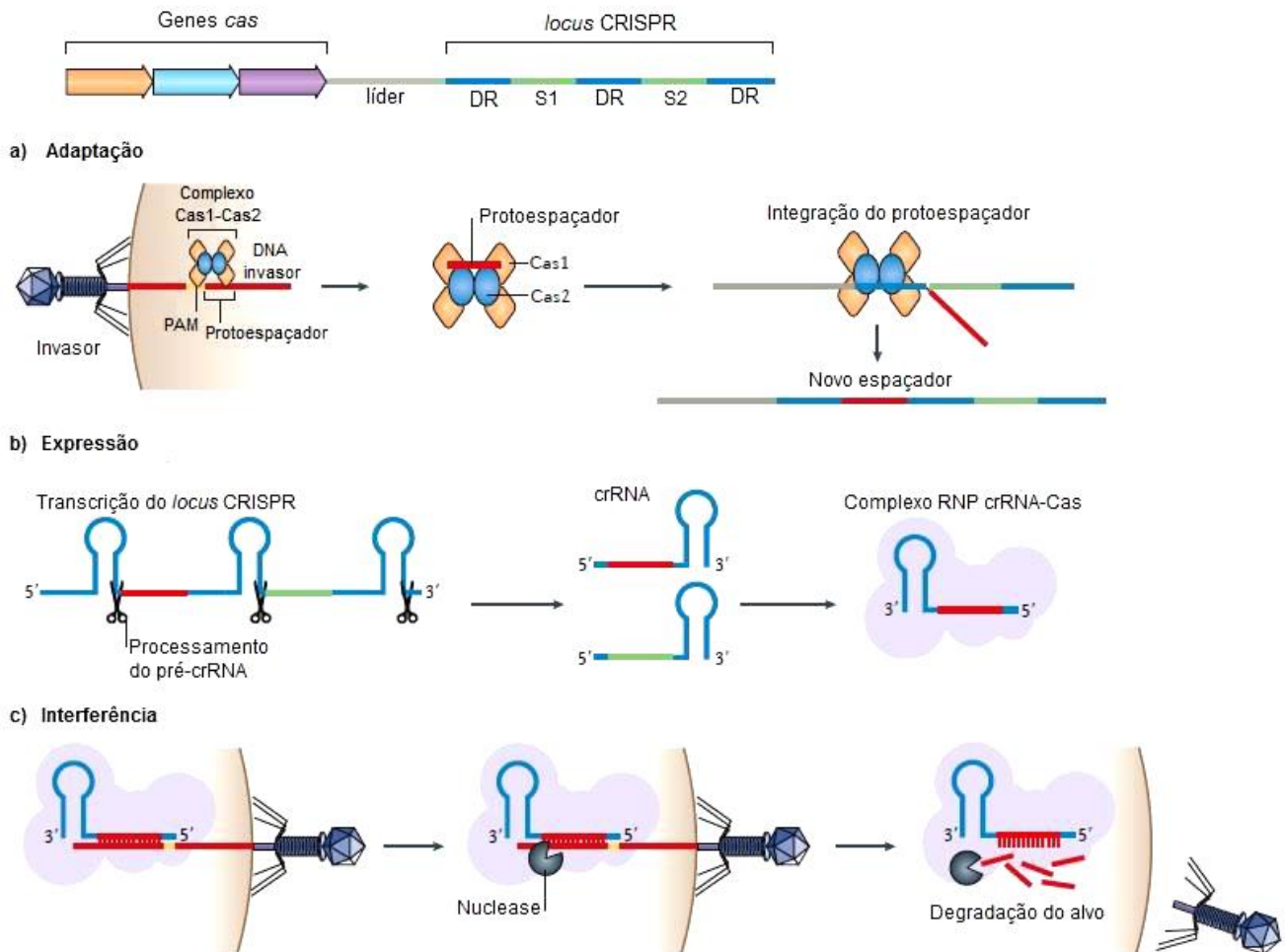
de pares de bases de distância (HAFT *et al.*, 2005; JANSEN *et al.*, 2002; SOREK; KUNIN; HUGENHOLTZ, 2008).

Os genes *cas* codificam uma variedade de proteínas com funções distintas, fornecendo a maquinaria enzimática requerida para a aquisição de novos espaçadores e a degradação de elementos genéticos invasores. Os domínios funcionais identificados nessa família de proteínas incluem: domínios de polimerases, helicases e nucleases; domínios de ligação a RNA e DNA; e domínios que estão envolvidos na regulação da transcrição (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014; MAKAROVA *et al.*, 2006; RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012).

2.5 Mecanismo de ação do Sistema CRISPR/Cas

O sistema CRISPR/Cas consiste em uma maquinaria adaptativa de defesa que permite aos procariotos protegerem-se contra a invasão de MGEs indesejados, tais como fagos e plasmídeos. A imunidade mediada pelo sistema resume-se em três etapas principais: adaptação; expressão ou biogênese do crRNA e interferência, ou ação contra o DNA invasor (DY *et al.*, 2014; KOONIN; MAKAROVA, 2017; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Representação das três etapas envolvidas no mecanismo imune do sistema CRISPR/Cas



Fonte: Adaptado de Amitai e Sorek, 2016.

Legenda: **a)** Etapa de adaptação – aquisição de um novo espaçador ao *locus* CRISPR; **b)** Etapa de Expressão – transcrição do *locus* e processamento do crRNA; **c)** Etapa de interferência – ação contra o elemento genético invasor; **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.

Na etapa de adaptação ocorre a aquisição e incorporação de um novo espaçador ao *locus* CRISPR, o qual servirá como molde para geração de um RNA CRISPR (crRNA). Durante essa etapa, as proteínas Cas1 e Cas2 se ligam a molécula de DNA ou RNA alvo, e ao identificarem uma pequena sequência de 2 a 4 pb, conhecida como PAM (*Protospacer*

Adjacent Motif), clivam uma porção dessa sequência alvo, nomeado protoespaçador, e o inserem dentro do *locus* CRISPR como um novo espaçador (AMITAI; SOREK, 2016; KOONIN, 2019; MAKAROVA *et al.*, 2011).

A aquisição da nova sequência espaçadora é acompanhada da duplicação da DR adjacente, e ocorre sempre próximo a sequência líder, resultando em um registro cronológico das invasões por elementos genéticos móveis. Todo esse processo de adaptação ocorre quando a bactéria é infectada pela primeira vez por um determinado fago ou plasmídio (KOONIN; MAKAROVA, 2017; VAN DER OOST *et al.*, 2014; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014).

Um mecanismo alternativo de adaptação é encontrado em alguns sistemas CRISPR/Cas; esses utilizam-se de uma enzima Transcriptase Reversa (RT) para a aquisição de espaçadores de RNA. Essas RTs podem se encontrar adjacentes ou fusionadas ao gene *casI* (SILAS *et al.*, 2017; TORO; MARTÍNEZ-ABARCA; GONZÁLEZ-DELGADO, 2017).

Na etapa de expressão – ou biogênese do crRNA – o *locus* CRISPR é transcrito em uma grande molécula de RNA precursora, chamada de pré-crRNA, que posteriormente é processada em pequenos crRNA. Cada crRNA corresponde a um único espaçador, flanqueado por uma porção da DR adjacente (HORVATH; BARRANGOU, 2010; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014).

Na etapa de interferência, o crRNA associado com uma, ou múltiplas proteínas Cas, forma um complexo proteico efetor conhecido como crRNP (ribonucleoproteínas-CRISPR); esse reconhece a molécula de ácido nucleico exógeno através do pareamento de bases entre o fragmento invasor e o espaçador presente na estrutura do complexo efetor. O reconhecimento do alvo, pela maioria dos crRNP, requer a presença da sequência PAM. A hibridização entre o crRNA e o fragmento alvo induz uma mudança conformacional no crRNP, que serve como um sinal para o recrutamento de uma nuclease capaz de degradar o elemento genético invasor (NISHIMASU; NUREKI, 2017; VAN DER OOST *et al.*, 2014).

2.6 Classificação do Sistema CRISPR/Cas

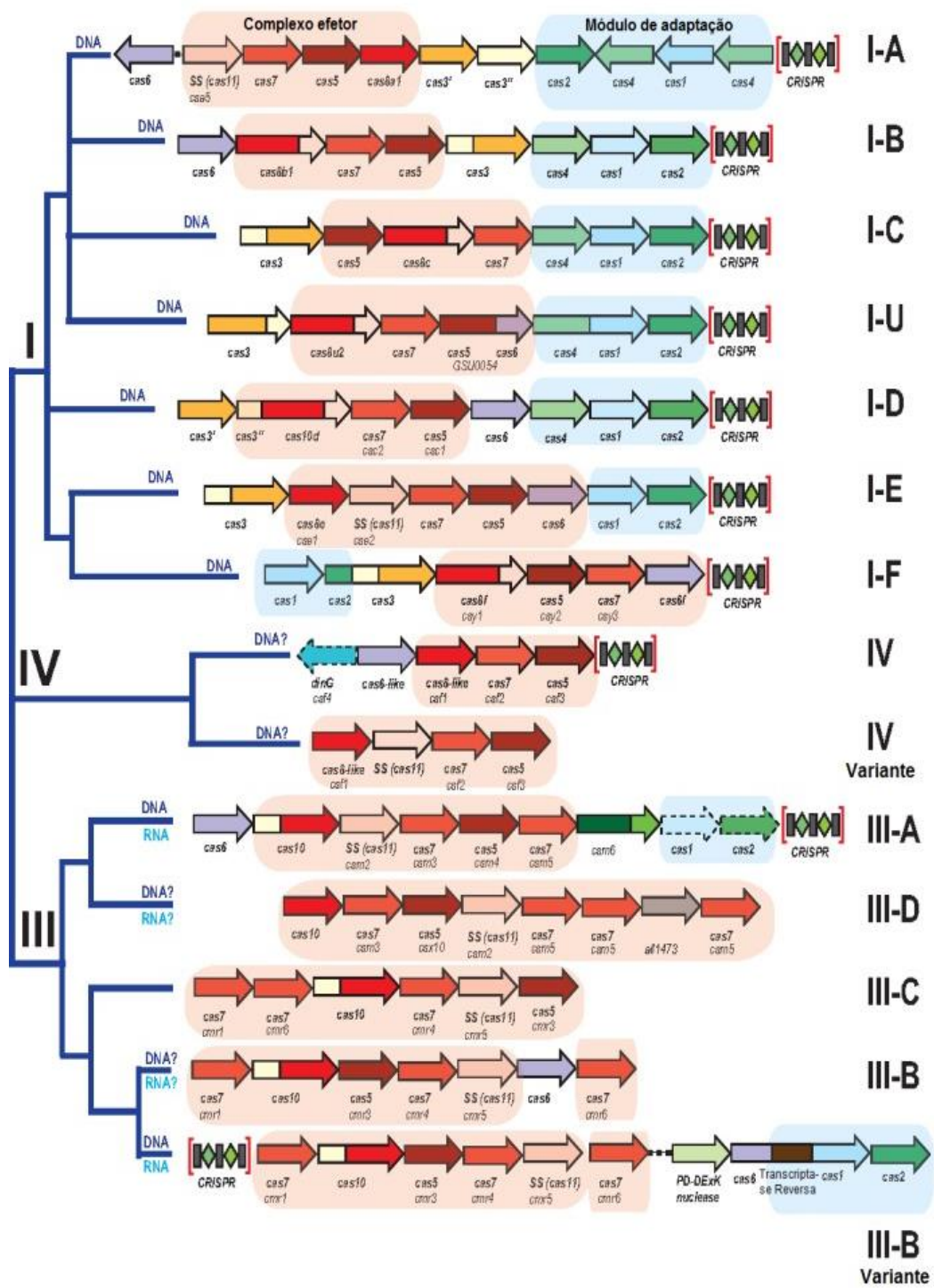
Da mesma forma que outros sistemas de defesa, o CRISPR/Cas progride sob forte pressão seletiva, resultando em uma rápida evolução e numa notável diversificação da arquitetura genômica e composição dos genes *cas* (MAKAROVA *et al.*, 2015).

Baseado em análises comparativas das proteínas Cas e organização genômica dos *loci* CRISPR, esse sistema foi primeiramente classificado em três tipos (sistema CRISPR/Cas Tipo I, Tipo II e Tipo III), e onze subtipos (IA-F, IIA-C e IIIA-B). As proteínas encontradas quase universalmente em todos os sistemas CRISPR/Cas são as Cas1 e Cas2. Para cada tipo e subtipo de sistema, um gene de assinatura específico foi identificado (MAKAROVA *et al.*, 2011; MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2013).

Makarova *et al.* (2015) atualizaram essa classificação incluindo mais dois tipos de sistema CRISPR/Cas (Tipo IV e Tipo V) e mais cinco subtipos. Além disso, dividiram o sistema em duas classes; os de Classe I são os sistemas que possuem um complexo efetor composto por várias subunidades de proteínas Cas, e os de Classe II nos quais o crRNP é composto por uma única proteína multidomínio (MAKAROVA *et al.*, 2015).

A base para a atual classificação do sistema CRISPR/Cas é o princípio organizacional do módulo efetor (que compreende as proteínas envolvidas no processamento do pré-crRNA e no reconhecimento e degradação do DNA alvo). Dessa forma, o sistema é atualmente dividido em 6 Tipos e 24 subtipos, dentro de duas classes, conforme demonstrado nas Figuras 6 e 7. Os sistemas de classe I compreendem os Tipos I, III e IV, enquanto que na Classe II estão incluídos os Tipos II, V e VI (KOONIN; MAKAROVA, 2017; KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017).

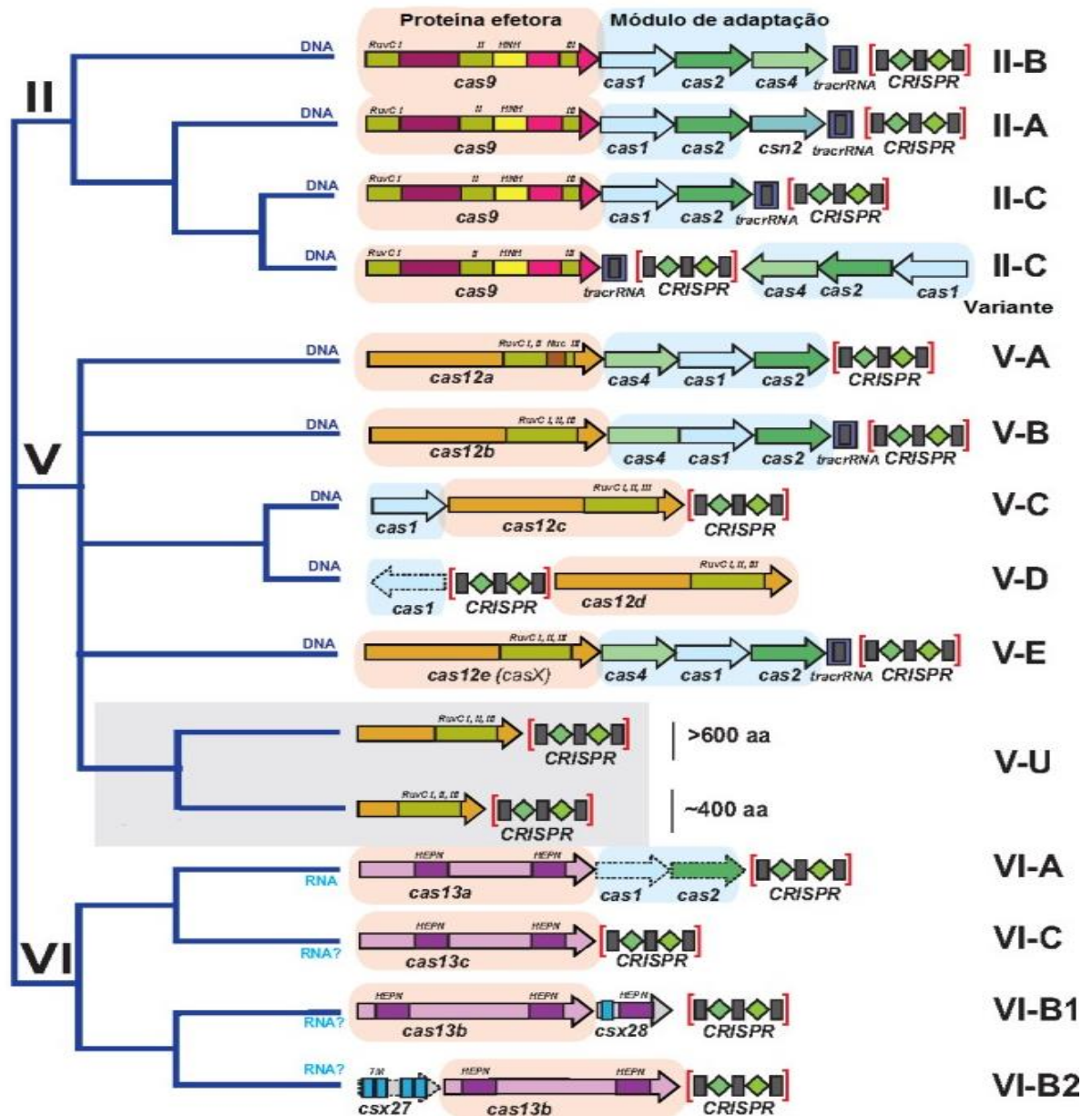
Figura 6 - Classificação dos Sistemas CRISPR/Cas de Classe 1



Fonte: Adaptado de Koonin, Marakova e Zhang, 2017.

Legenda: As setas representam os genes *cas*; os genes homólogos apresentam a mesma cor. Os genes pertencentes ao módulo de adaptação são marcados em azul e os pertencentes ao módulo efetor são marcados em rosa.

Figura 7 - Classificação dos Sistemas CRISPR/Cas de Classe 2



Fonte: Adaptado de Koonin, Marakova e Zhang, 2017.

Legenda: As setas representam os genes *cas*; os genes homólogos apresentam a mesma cor. Os genes pertencentes ao módulo de adaptação são marcados em azul e os pertencentes ao módulo efetor são marcados em rosa.

O sistema tipo I possui o gene de assinatura *cas3*, o qual codifica uma proteína com atividade de helicase. Frequentemente, o domínio helicase da Cas3 está fusionado com um

domínio de endonuclease que está envolvido na clivagem do DNA alvo (MAKAROVA *et al.*, 2015). O complexo efetor do tipo I é composto por diversas proteínas Cas e é conhecido como Cascade (*CRISPR-associated complex antiviral defence*). Atualmente esse tipo de sistema é classificado dentro de sete subtipos (I-A a I-F e I-U) (HATOUM-ASLAM; MARRAFFINI, 2014; KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017).

O sistema tipo III possui como assinatura o gene *cas10*, o qual codifica uma proteína com domínio de reconhecimento de RNA semelhante ao domínio observado em polimerases. Esse tipo assemelha-se ao tipo I por possuir um complexo efetor formado por mais de uma proteína Cas. Esse sistema possui cinco subtipos (III-A a III-D e o subtipo III-B variante) (MAKAROVA *et al.*, 2015).

O tipo IV possui um sistema CRISPR/Cas rudimentar, no qual o módulo de adaptação está ausente. O complexo efetor presente neste tipo de sistema é composto pelas proteínas Csf1 (proteína assinatura para o tipo IV), Cas5 e uma única subunidade de Cas7. Esse tipo de sistema possui apenas um subtipo variante (tipo IV variante), o qual não possui um *locus* CRISPR (MAKAROVA *et al.*, 2015).

Os tipos II e V possuem as proteínas de assinatura Cas9 e Cas12, respectivamente. A característica principal desses tipos é a presença de um domínio endonuclease do tipo RuvC. O tipo II possui quatro subtipos (II-A a II-C e II-C variante), enquanto que o tipo V possui seis subtipos (V-A a V-E e V-U). A proteína assinatura para o tipo VI é a Cas13; seu módulo efetor possui dois domínios pertencentes a superfamília de RNases HEPN, envolvidas em várias funções relacionadas à defesa, tanto em procarionotos, como em eucariotos (KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017; MAKAROVA *et al.*, 2015).

2.7 Funções além da imunidade

Estudos recentes têm demonstrado um papel funcional adicional do sistema CRISPR/Cas além da imunidade em algumas espécies de bactérias e arqueas (Quadro 1). No patógeno intracelular *Francisella novicida*, foi observado que o sistema CRISPR/Cas Tipo II regula a expressão de um transcrito endógeno que codifica uma lipoproteína bacteriana (BLP). Geralmente, essa BLP é reconhecida por receptores da imunidade inata do hospedeiro (receptores do tipo Toll-Like 2) acarretando em uma resposta pró-inflamatória. Porém, a

repressão da expressão da BLP pelo sistema CRISPR/Cas facilita a evasão do patógeno, contribuindo dessa forma para sua virulência (SAMPSON *et al.*, 2013; SAMPSON; WEISS, 2014).

Quadro 1 - Funções do sistema CRISPR/Cas além da imunidade adaptativa

Função	Tipo CRISPR/Cas	Mecanismo	Espécie
Regulação gênica	III-B	Degradação de mRNA complementar	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Regulação de comportamento de colônia	I-F	Baseado em complementaridade parcial	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Regulação de comportamento de colônia	I-C	Desconhecido	<i>Myxococcus xanthus</i>
Regulação de genes de virulência	II-C	Modificação da superfície celular dependente de Cas9	<i>Campylobacter jejuni</i>
Regulação de genes de virulência	II-B	Supressão da produção de lipoproteínas bacterianas mediada por Cas9	<i>Francisella novicida</i>
Regulação de genes de virulência	II-B	Desconhecido	<i>Legionella pneumophila</i>
Regulação de genes de virulência	Locus CRISPR órfão	Regulação do operon feoAB por complementaridade parcial	<i>Listeria monocytogenes</i>
Remodelamento do genoma	I-F	Remoção de regiões genômicas por auto direcionamento	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
Reparo do DNA	I-E	Reparo mediado por Cas1	<i>Escherichia coli</i>

Fonte: Adaptado de Westra *et al.* (2014).

Em um estudo com isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* foi comprovada a atuação do sistema CRISPR/Cas no controle da disseminação de genes via transferência horizontal. A presença de um espaçador no locus CRISPR de um isolado de *S. epidermidis* apresentando similaridade de sequência com um gene presente em quase todos os plasmídios

conjugativos estafilocócicos, ativa a maquinaria de interferência CRISPR/Cas impedindo a conjugação e transformação plasmidial. Dessa forma, a ativação desse mecanismo pode limitar a propagação da resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2008).

O envolvimento do sistema CRISPR/Cas no reparo do DNA foi observado através de um estudo com a proteína Cas1 de *Escherichia coli*, que interage diretamente com componentes do sistema de reparo, incluindo as proteínas *recB*, *recC* e *ruvB*. Com a deleção da Cas1, observou-se um aumento na sensibilidade a danos no DNA e prejuízo na segregação cromossômica (BABU *et al.*, 2011).

Outros estudos vêm demonstrando funções relevantes do sistema CRISPR/Cas relacionadas à regulação gênica de comportamento de grupo, como em *Pseudomonas aeruginosa* e *Myxococcus xanthus*, e regulação de fenótipos patogênicos, como a regulação de genes de virulência em *Campylobacter jejuni*, *Francisella novicida*, *Legionella pneumophila* e *Listeria monocytogenes* (BARRANGOU, 2015; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014).

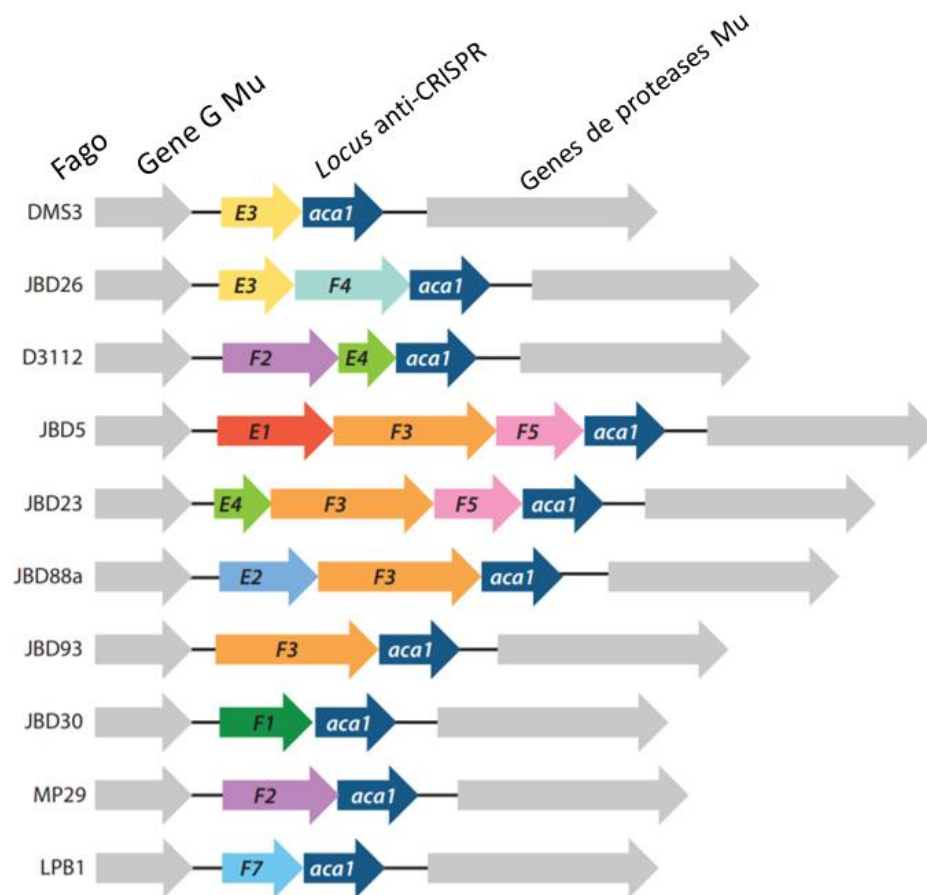
2.8 Mecanismo de inativação do sistema CRISPR/Cas: genes anti-CRISPR

Em resposta ao arsenal de defesa bacteriano, os fagos por sua vez também desenvolvem estratégias antagonistas a estes sistemas com capacidade para inativá-los (BONDY-DENOMY *et al.*, 2016a; PAWLUK; DAVIDSON; MAXWELL, 2017). Em um estudo utilizando trinta fagos de *P. aeruginosa*, foi observado que profagos permitiam a infecção por outros vírus na célula bacteriana, apesar da presença de espaçadores do sistema CRISPR/Cas do tipo I-F que impediriam estas invasões. Dessa maneira, foi constatado que os profagos estariam inativando a função do sistema CRISPR/Cas (BONDY-DENOMY *et al.*, 2013; BORGES; DAVIDSON; BONDY-DENOMY, 2017).

Ao comparar o genoma desses fagos que estariam inativando a função do CRISPR/Cas com aqueles sensíveis ao sistema, foi identificado um *locus* anti-CRISPR contendo os genes responsáveis pela neutralização deste sistema bacteriano, e a esses foi dado o nome de genes anti-CRISPR (*acrs*) (BORGES; DAVIDSON; BONDY-DENOMY, 2017). Esses genes foram identificados principalmente em uma família de fagos relacionados do tipo Mu (Figura 8).

Também foram identificados homólogos desses genes em plasmídeos e ilhas genômicas (BORGES; DAVIDSON; BONDY-DENOMY, 2017).

Figura 8 - Locus anti-CRISPR de fagos pertencentes a família Mu-like



Fonte: Adaptado de Borges et al, 2017.

Nota: Locus anti-CRISPR de fagos da família Mu-Like de *P. aeruginosa*. Os genes anti-CRISPR estão todos no mesmo locus, integrados entre estruturas conservadas que são homólogos ao gene G do fago Mu e aos genes de proteases, representados em cinza.

Apesar de terem sido descobertos primeiramente na bactéria *P. aeruginosa*, esses genes já foram identificados também em outras espécies bacterianas (BONDY-DENOMY *et al.*, 2016b; BORGES; DAVIDSON; BONDY-DENOMY, 2017). As proteínas Acr são capazes de inibir a atividade CRISPR/Cas a partir do bloqueio do complexo de vigilância CRISPR ou da inativação das nucleases Cas (BORGES *et al.*, 2018).

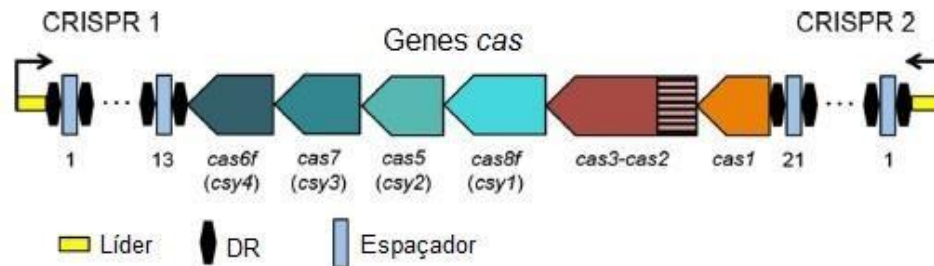
2.9 *Pseudomonas aeruginosa* e o sistema CRISPR/Cas

Cerca de 30% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* possuem um sistema CRISPR/Cas, sendo esse do tipo I. Em sua grande maioria, o subtipo presente nos genomas de *P. aeruginosa* é o I-F (por vezes chamado de *Yersinia*, pela estrutura específica deste subtipo ter sido primeiro descrita neste gênero bacteriano), que incluem os *loci* CRISPR1 e CRISPR2, seguido pelo subtipo I-E (também chamado de *Escherichia*, por seu genoma de referência ser o deste gênero bacteriano) que compreende dois outros *loci* CRISPR (CADY *et al.*, 2012; ESSOH *et al.*, 2013).

Van Belkum *et al.* (2015), em uma análise de 672 genomas de *P. aeruginosa* depositados em bancos de dados, observou a presença do subtipo I-F em 202 isolados, o subtipo I-E em 81 isolados, e o subtipo I-C em 20 isolados. Esse trabalho foi o primeiro a descrever o subtipo I-C do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa* (BELKUM *et al.*, 2015).

A cepa UCBPP-PA14 (PA14) é considerada modelo para estudos do sistema CRISPR/Cas tipo I-F, o qual apresenta o conjunto de genes *cas* típico deste tipo (*cas1*, *cas2-cas3*, *csy1*, *csy2*, *csy3* e *cas6f*) flanqueados por dois *loci* CRISPR (CRISPR1 e CRISPR2), contendo 13 e 21 espaçadores, respectivamente (BELKUM *et al.*, 2015; HEUSSLER *et al.*, 2016) (Figura 9). As proteínas Csy e Cas6f (antiga Csy4), juntamente com um crRNA montam um complexo de ribonucleoproteínas estável chamado de *Cascade*, que reconhece alvos de DNA com sequência PAM 'GG' e recrutam uma nuclease trans-ativa (*cas2-cas3*) para degradação do alvo (ROLLINS *et al.*, 2015, 2016).

Figura 9 - Representação esquemática do sistema CRISPR/Cas subtipo I-F na cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Adaptado de Heussler *et al.*, 2016.

Legenda: A sigla DR corresponde a Repetição Direta.

O sistema CRISPR/Cas já possui algumas funções conhecidas em *P. aeruginosa*; uma delas é a modulação de genes do fago DMS3. Quando presente no genoma de *P. aeruginosa*, de forma lisogênica, o fago DMS3 é responsável pela inibição da motilidade em grupo e produção de biofilme pela bactéria; porém essa inibição requer um sistema CRISPR/Cas íntegro. Mutações nos genes *cas* envolvidos na etapa de interferência permitem que o fenótipo do biofilme seja restaurado (WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014; ZEGANS *et al.*, 2009).

Esse fenômeno se dá através da similaridade parcial entre um dos espaçadores no *locus* CRISPR de *P. aeruginosa* com o gene 42 do fago DMS3, permitindo que através desta similaridade entre as sequências, o efeito inibitório seja suprimido. Devido ao pareamento imperfeito, este espaçador não fornece resistência contra o fago. Apesar desse mecanismo não estar totalmente elucidado, estudos sugerem que a interação entre o alvo (DMS3-42) e a maquinaria CRISPR/Cas interfira na expressão de genes do profago envolvidos na inibição (ZEGANS *et al.*, 2009).

Cady *et al.* (2012) demonstraram experimentalmente a resistência à fagos pelo subtipo I-F de *P. aeruginosa*; no qual foi observado que o nível de resistência seria baseado na similaridade entre o espaçador CRISPR e o protoespaçador alvo. Além disso, Høyland-Krogsho *et al.* (2017) observaram na cepa UCBPP-PA14 que a expressão do sistema CRISPR/Cas pode ser regulada por sinais *quorum sensing*, um mecanismo de comunicação célula-célula utilizado por bactérias em resposta à densidade celular. Quando a bactéria está sob alto risco de infecção por fagos, esse mecanismo de comunicação entre as células

bacterianas ativam a expressão dos genes *cas* permitindo um aumento da função CRISPR/Cas (CADY *et al.*, 2012; HØYLAND-KROGHSBO *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Embora o sistema CRISPR/Cas venha sendo amplamente estudado durante as últimas décadas, até o momento, o seu funcionamento e os mecanismos envolvidos na regulação do mesmo ainda não são compreendidos em sua totalidade. No que se refere a *P. aeruginosa*, os estudos funcionais que existem limitam-se à cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, e não há estudos funcionais utilizando cepas clínicas que possuam características diferentes da UCBPP-PA14. Adicionalmente, há uma carência de dados sobre a função do sistema do tipo I, subtipo E, para esta espécie.

Em 2011, Cady *et al.* reportaram que o subtipo I-F de *P. aeruginosa* não parecia conferir imunidade à bactéria contra o ataque de bacteriófagos, apesar de crRNAs serem produzidos (CADY *et al.*, 2011; ZEGANS *et al.*, 2009). A partir de então, passou-se a acreditar que o papel do sistema CRISPR/Cas no genoma de *P. aeruginosa* seria apenas modular a expressão gênica, e não de proteger a célula bacteriana contra a invasão de novos MGEs (SONNLEITNER; ROMEO; BLÄSI, 2012).

No entanto, Cady *et al.* em 2012, descreveram a proteção contra fagos pelo subtipo I-F do sistema CRISPR/Cas em *P. aeruginosa*, obtido através da mudança de parâmetros experimentais. Westra *et al.*, em 2015, demonstraram que, o fato da *P. aeruginosa* tornar-se resistente aos fagos não seria apenas pela expressão do sistema CRISPR/Cas, mas também pela modificação dos receptores do fago pela célula, e que o sistema CRISPR/Cas parece ser o mecanismo de defesa de escolha sob condições nutritivas reduzidas, enquanto outros mecanismos estariam ativos em meios ricos em nutrientes (CADY *et al.*, 2012; WESTRA *et al.*, 2015).

Diante da escassez de estudos com isolados clínicos, da ausência de informações acerca do sistema I-E, e dos relatos incertos em relação à sua eficácia na proteção da célula bacteriana, o presente trabalho se propõe a avaliar a expressão dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E em isolados clínicos de *P. aeruginosa* sob condições nutricionais distintas.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe diferença nos níveis de expressão dos genes que compõe o sistema CRISPR/Cas em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hospitais da cidade do Recife, cultivadas sob diferentes condições nutricionais?

5 HIPÓTESE

O sistema CRISPR/Cas apresenta diferentes níveis de expressão gênica em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hospitais públicos do Recife, submetidos a diferentes condições nutricionais.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de expressão gênica dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* submetidas à diferentes condições nutricionais.

6.2 Objetivos específicos

- a) Analisar qualitativamente a expressão dos genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- b) Avaliar quantitativamente os níveis de expressão dos genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E de diferentes isolados, sob condições nutricionais reduzidas;
- c) Avaliar quantitativamente os níveis de expressão dos genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E de diferentes isolados, sob ricas condições nutricionais;
- d) Comparar quantitativamente a expressão dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E sob as diferentes condições avaliadas;

7 METODOLOGIA

7.1 Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas

As amostras de *P. aeruginosa* foram obtidas de um estudo anterior (LUZ *et al.*, 2019) (ANEXO 2) e totalizam 55 isolados clínicos positivos para o sistema CRISPR/Cas (Quadro 2). São oriundos de diferentes origens de infecção e setores de dois hospitais públicos da cidade do Recife-PE, denominados aqui de Hospital A (HA) e Hospital B (HB). Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* encontram-se estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz, em criotubos contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol a 30% na proporção de 1:1 e congelados em freezer a -80°C para manutenção das amostras do estudo. Dos 55 isolados utilizados neste estudo, 13 tiveram seus genomas sequenciados em projeto anterior e suas identificações (ID) encontram-se destacadas em cinza no Quadro 2.

Quadro 2 - Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para o sistema CRISPR/Cas

(continua)

ID	Ano de coleta	Hospital	Setor Hospitalar	Origem de Infecção	Tipo de sistema CRISPR
6	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
8	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
12	2015	HA	ENFERMARIA	FRAGMENTO ÓSSEO + PARTES MOLES	I-F
14	2015	HA	ENFERMARIA	PARTES MOLES	I-F
16	2015	HA	ENFERMARIA	OSSO	I-F
18	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
21	2015	HA	ENFERMARIA	URINA	I-F

(continuação)

ID	Ano de coleta	Hospital	Setor Hospitalar	Origem de Infecção	Tipo de sistema CRISPR
22	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F e I-E
23	2015	HA	ENFERMARIA	PARTES MOLES	I-F
24	2015	HA	ENFERMARIA	URINA	I-F
28	2015	HA	ENFERMARIA	SINTESE CIRÚRGICA	I-F
29	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
30	2015	HA	ENFERMARIA	FERIDA OPERATÓRIA	I-F
39	2015	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
40	2015	HA	AMBULATÓRIO	URINA	I-E
42	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
45	2016	HA	ENFERMARIA	PELE	I-F
52	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
53	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
55	2016	HA	UTI	URINA	I-F
56	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
57	2016	HA	EMERGÊNCIA	PARTES MOLES	I-F
61	2016	HA	UTI	URINA	I-F
66	2016	HA	ENFERMARIA	FRAGMENTO OSSEO	I-F
67	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
68	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F

Quadro 3 - Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para o sistema CRISPR/Cas.

(continuação)

ID	Ano de coleta	Hospital	Setor Hospitalar	Origem de Infecção	Tipo de sistema CRISPR
70	2016	HA	ENFERMARIA	URINA	I-F
74	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
75	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
77	2016	HA	UTI	URINA	I-F
78	2016	HA	ENFERMARIA	URINA	I-E
80	2016	HA	UTI	TUBO TRAQUEAL	I-F
81	2016	HA	ENFERMARIA	URINA	I-E
83	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
90	2016	HA	ENFERMARIA	URINA	I-F
91	2016	HA	ENFERMARIA	FRAGMENTO OSSEO	I-F
93	2016	HA	ENFERMARIA	URINA	I-E
94	2016	HA	UTI	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-E
96	2016	HA	UTI	TUBO TRAQUEAL	I-F
97	2016	HA	ENFERMARIA	SECREÇÃO TRAQUEO-BRÔNQUICA	I-F
99	2016	HA	UTI	BOCA	I-F
101	2010	HB	UTI	SANGUE	I-F
103	2010	HB	ENFERMARIA	URINA	I-F
105	2010	HB	ENFERMARIA	URINA	I-F
106	2010	HB	UTI	URINA	I-F

Quadro 4 - Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para o sistema CRISPR/Cas.

(continuação)

ID	Ano de coleta	Hospital	Setor Hospitalar	Origem de Infecção	Tipo de sistema CRISPR
107	2010	HB	UTI	SANGUE	I-F
108	2010	HB	ENFERMARIA	ASPIRADO TRAQUEAL	I-F
110	2010	HB	ENFERMARIA	SECREÇÃO DE FERIDA	I-F
111	2010	HB	ENFERMARIA	ASPIRADO TRAQUEAL	I-F
113	2010	HB	ENFERMARIA	FRAGMENTO DE TECIDO	I-F e I-E
114	2010	HB	ENFERMARIA	SECREÇÃO DE FERIDA	I-F
115	2010	HB	ENFERMARIA	SECREÇÃO DE FERIDA	I-F
116	2010	HB	AMBULATÓRIO	URINA	I-F
127	2010	HB	AMBULATÓRIO	PONTA DE CATETER	I-F
129	2010	HB	UTI	SANGUE	I-F

Fonte: A autora.

Legenda: ID- Identificação do isolado; UTI – Unidade de Tratamento Intensivo.

7.2 Curva de crescimento bacteriano

Para avaliar as fases do crescimento bacteriano em *P. aeruginosa* sob diferentes condições nutricionais, foram realizadas curvas de crescimento bacteriano com base no estudo realizado por Goldová *et al.* (2011). O meio LB (Luria-Bertani) foi utilizado para o crescimento da bactéria sob uma rica condição nutricional, enquanto que o meio M9 0.2% glicose (*minimal salts 5x*) foi utilizado para o crescimento numa condição nutricional reduzida.

A extração de RNA total foi realizada em três pontos diferentes, objetivando obter uma visão mais ampla a respeito da expressão desses sistemas a partir fase estacionária (fase na qual ocorre maior expressão de genes envolvidos na sobrevivência bacteriana) e avaliar

possíveis mudanças no perfil de expressão do sistema CRISPR/Cas nas diferentes condições nutricionais. A primeira extração foi realizada após 9 horas de crescimento; a segunda após 16 horas e a terceira após 32 horas de crescimento.

7.3 Extração do RNA total bacteriano e quantificação

A extração do RNA total bacteriano foi realizada com a utilização do *SV Total RNA Isolation Systems* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de uma alíquota de 1 mL de cultura crescida em caldo BHI a 37°C por 24 horas. Para isto, uma alíquota de cada isolado foi previamente semeada em LB ágar e crescida à 37°C por 24 horas.

Para avaliar a integridade das amostras, uma alíquota de 3 µl (aproximadamente 1.500 ng) do RNA total extraído foi submetida à 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 visualizados e fotografados em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

Verificada a integridade, cada amostra de RNA foi tratada com a enzima *DNase I Amplification Grade* (ThermoFisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante, para remoção de DNA cromossomal contaminante. Para mensurar a quantidade de RNA total extraído, 1 µl da amostra pura foi submetido à quantificação em *NanoDrop 2000c* (ThermoFisher Scientific Inc.) e o grau de pureza foi estimado a partir da observação dos parâmetros de absorbância ($A_{260/280}$). Todas as amostras foram estocadas em freezer à -80°C até o momento de uso.

7.4 Síntese de cDNA

A reação de Transcrição Reversa (RT) foi realizada com a utilização do *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, na qual o RNA total foi utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (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.

7.5 RT-PCR

A técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa-PCR) foi realizada para verificar a transcrição dos genes *cas1* e *cas8f* (genes específicos do tipo I-F); e dos genes específicos para o tipo I-E: *cas8e* e *cas7* (*cas7* - anteriormente nomeado *cse4* e *cas8e* - anteriormente nomeado *cse1*). As sequências dos oligonucleotídeos e as referências bibliográficas correspondentes podem ser observadas no Quadro 3.

Quadro 5 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR

Subtipo	Gene	Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica (5' a 3')	Tamanho do produto	Referência
I-F	<i>cas1</i>	cas1-F	GACATTTCTCCCAGCGAACTGA	565 pb	Essoh <i>et al.</i> 2013
		cas1-R	CTTCTTCGGTCAGTAGATGCTC		
	<i>cas8f</i>	csy-F	ACATTGGCAAAGACAGGACCAG	472 pb	Desenhados para o estudo atual
		csy1-R	CTCCTTGAACATCGTCAGTTCC		
I-E	<i>cas8e</i>	cse1-F	ATGACTGAACACTACAACCTGC	445 pb	Desenhados para o estudo atual
		cse1-R	GGTCATAGGAATGGTCGAACAC		
	<i>cas7</i>	cse4-F	TTCATCGAGTTCCATCTGATCC	321 pb	
		cse4-R	CAGGTATTCGGTCTTGCCAT		

Fonte: A autora.

O desenho de *primers* foi feito de acordo com o *software* ApE (disponível em <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>), e sua viabilidade (temperatura de Melting, formação de *hairpin*, auto-dímeros e hétero-dímeros) foi analisada através do *software online* OligoAnalyzer Tool (disponível em <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25µl contendo 2,5µl de dNTP na concentração de 2,5 mM; 1µl de cada oligonucleotídeo na concentração de 20nM; 2,5µl de MgCl₂ a 25mM; 1µl de cDNA diluído 1:10 e 1U 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 por 10 minutos, para os genes *cas1* e *cas8f*. Para amplificação dos genes *cas8e* e *cas7* foram realizados os seguintes parâmetros: Desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de termociclagem com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

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.

7.6 Análise do sistema CRISPR/Cas *in silico*

Treze isolados CRISPR/Cas positivos tiveram seus genomas previamente sequenciados e depositados no banco de dados do NCBI através do número de acesso de BioProject PRJNA514718. Os profagos dos genomas estudados foram investigados utilizando o software online PHASTER (ARNDT *et al.*, 2016). Os fagos encontrados foram comparados aos fagos relacionados ao conteúdo de espaçadores de seus genomas. Os genes anti-CRISPR foram investigadas usando a ferramenta blast disponível no banco de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando as seqüências específicas de DNA de 14 proteínas diferentes, anteriormente definido (BELKUM *et al.*, 2015; PAWLUK; DAVIDSON; MAXWELL, 2017). O alinhamento múltiplo para a proteína Cas1 do tipo I-E foi feito através do MAFFT (KATOHI; STANDLEY, 2013), e visualizado com BOXSHADE (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html).

7.7 PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para avaliar possíveis diferenças nos níveis de expressão dos genes *cas*, foram selecionados cinco isolados de acordo com características estruturais do sistema CRISPR/Cas e dos seus genomas (Quadro 4). Uma análise comparativa dos níveis de expressão desses genes entre os dois tipos de sistema (tipo I-F e I-E) e sob diferentes condições nutricionais foi realizada pela técnica de qRT-PCR.

Quadro 6 - Características dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* analisados pela qRT-PCR

Isolado	Características
22	Presença dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E
29	Sistema CRISPR/Cas tipo I-F; presença de profago no genoma e de espaçador contra o mesmo no <i>locus</i> CRISPR
42	Sistema CRISPR/Cas tipo I-F; presença de gene anti-CRISPR; presença de profago no genoma e de espaçador contra o mesmo no <i>locus</i> CRISPR
66	Sistema CRISPR/Cas tipo I-F
81	Sistema CRISPR/Cas tipo I-E

Fonte: A autora.

Os protocolos de extração de RNA e síntese de cDNA foram realizados de acordo com a metodologia previamente descrita, no entanto, foram obtidas amostras de RNA de três tempos diferentes (T1= 9 horas; T2= 16 horas; T3= 32 horas). A expressão do sistema CRISPR/Cas foi analisada pela amplificação dos genes *cas1* e *cas8f* (para o tipo I-F) e *cas1* e *cas8e* (para o tipo I-E). Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação estão descritos no Quadro 5, e foram desenhados da mesma forma como previamente descrito.

Quadro 7 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica (5'a 3')	Tamanho do produto	Referência
<i>cas1</i>	<i>cas1f-F</i>	AAGTCGATCCTTCACTCCAAAC	123 pb	Desenhado para o estudo atual
	<i>cas1f-R</i>	GATGTTCCAGTAGTGCGAATG		
<i>cas8f</i>	<i>csy1-F</i>	ACAAGCTGGTCAGCGATGTG	112pb	Desenhado para o estudo atual
	<i>csy1-R</i>	GCACTGTCTTCTGTCAGCCA		
<i>cas1</i>	<i>cas1e-F</i>	TGAACACTACAACCTGCTGG	152 pb	Desenhado para o estudo atual
	<i>cas1e-R</i>	GGTACTGTGCAATCAGACTCG		
<i>cas8e</i>	<i>cse1-F</i>	GAGTCTGATTGCACAGTACC	127 pb	Desenhado para o estudo atual
	<i>cas8e</i>	GATACTGTGGATGGAACAGC		
<i>rpsL</i>	<i>rpsl-F</i>	TACTTCGAACGACCCTGCTT	150 pb	Desenhado para o estudo atual
	<i>rpsl-R</i>	TTTCCTCGTACATCGGTGGT		

Fonte: A autora.

A quantificação da transcrição foi realizada com o GoTaq® Green Master Mix (Promega), no sistema de detecção ABI 7500 (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.

7.7.1 Parâmetros analíticos da qPCR

A expressão relativa dos genes *cas* 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* – codifica proteína estabilizadora do RNA ribossomal 30S. Dessa forma, o Ct (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 Δ Ct é a diferença de expressão entre o gene alvo e controle endógeno de determinada amostra; e o $\Delta\Delta$ Ct corresponde a diferença entre o Δ Ct da amostra e o Δ Ct 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 o valor de $\Delta\Delta$ C encontrado foi transformado no valor do logaritmo na base 10. 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 $p < 0,05$. As comparações realizadas estão descritas no Quadro 6.

Quadro 8 - Comparações nos níveis de expressão dos genes que compõem o sistema CRISPR/cas tipos I-F e I-E em diferentes condições nutricionais

(Continua)

Condição 1		Condição 2
Sistema I-F em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-F em meio M9
Sistema I-E em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-E em meio M9
Sistema I-F em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-E em meio LB
Sistema I-F em meio M9	<i>versus</i>	Sistema I-E em meio M9
Sistema I-F em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de gene anti-CRISPR e de espaçador contra profago no genoma) em meio LB
Sistema I-F em meio M9	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de gene anti-CRISPR e de espaçador contra profago no genoma) em meio M9
Sistema I-F em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de espaçador contra profago no genoma) em meio LB

(Continuação)

Sistema I-F em meio M9	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de espaçador contra profago no genoma) em meio M9
Sistema I-F (com presença de gene anti-CRISPR e de espaçador contra profago no genoma) em meio LB	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de espaçador contra profago no genoma) em meio LB
Sistema I-F (com presença de gene anti-CRISPR e de espaçador contra profago no genoma) em meio M9	<i>versus</i>	Sistema I-F (com presença de espaçador contra profago no genoma) em meio M9

Fonte: A autora.

Legenda: Meio LB: rico em nutrientes; meio M9: nutrientes reduzidos.

8 ASPECTOS ÉTICOS

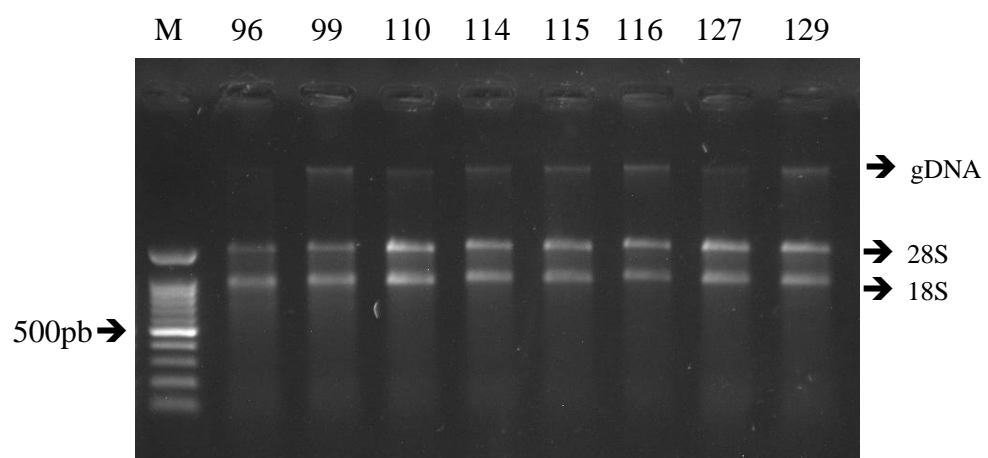
O trabalho não apresenta implicações éticas considerando que, os resultados não serão vinculados ao nome dos pacientes, nem os hospitais serão identificados. Os isolados clínicos foram obtidos de pacientes por demanda espontânea, de hospitais da cidade do Recife. Estão estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia. Todas as amostras clínicas foram identificadas com numeração, sem qualquer referência ao paciente ou ao hospital do qual a bactéria foi isolada.

9 RESULTADOS

9.1 Extração de RNA e remoção de DNA genômico contaminante

O RNA total de todos os 55 isolados de *P. aeruginosa* foi obtido de forma eficiente (Figura 10). No entanto, para completa purificação do RNA foi necessário adicionar um segundo tratamento com a enzima DNase I, eliminando desta forma o DNA genômico (gDNA) contaminante.

Figura 10 - Gel representativo da extração de RNA total de diferentes isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

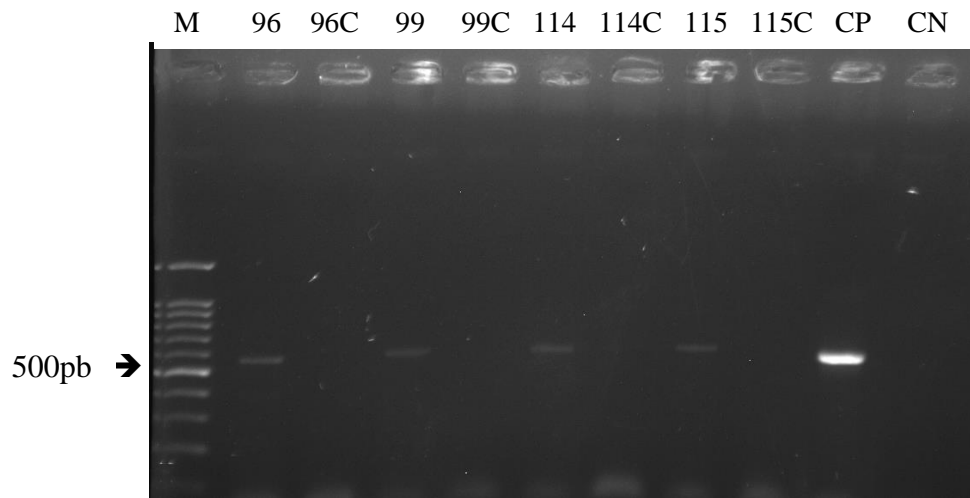


Fonte: A autora.

Legenda: Demonstração das bandas 28S e 18S do RNA ribossômico em diferentes isolados clínicos de *P. aeruginosa*; **M**- Marcador de peso molecular (100pb); **gDNA**- DNA genômico.

A eficiência do segundo tratamento com a DNase I foi constatada através de uma PCR, utilizando-se os cDNAs teste e os cDNAs controles, nos quais não foi adicionada a enzima Transcriptase Reversa (Figura 11).

Figura 11 - Gel representativo dos produtos de RT-PCR para o gene *casI* de diferentes isolados clínicos de *P. aeruginosa*



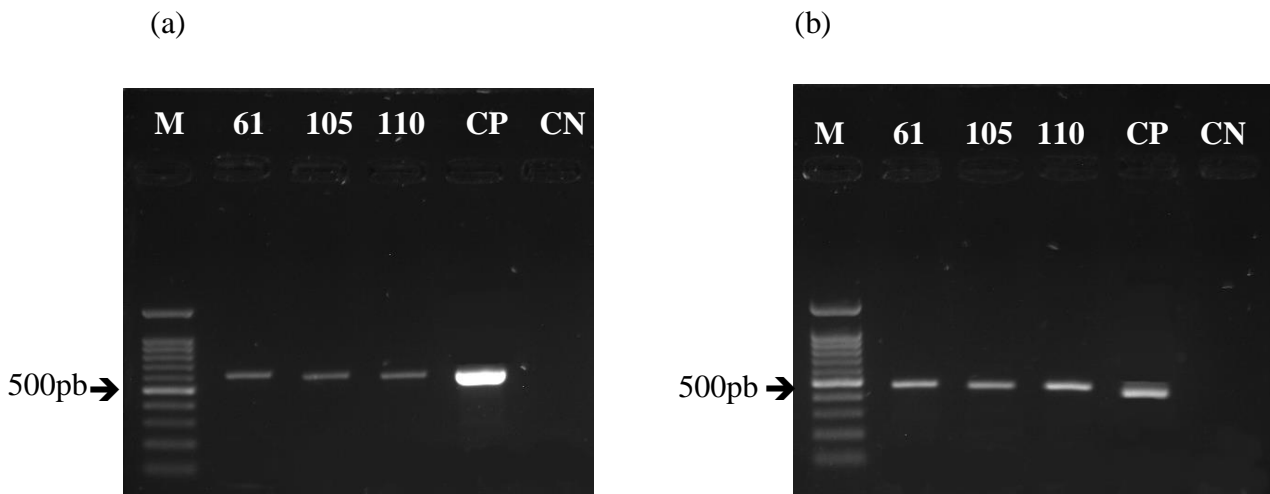
Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação do gene *casI* (565pb) para diferentes isolados clínicos de *P. aeruginosa* e seus respectivos controles negativos; **M**- Marcador de peso molecular (100pb); **CP**- controle positivo; **CN**- controle negativo da reação.

9.2 Avaliação qualitativa da expressão de genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Todos os 55 isolados utilizados no estudo foram submetidos à técnica de RT-PCR e o resultado da expressão qualitativa dos genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E foi analisado mediante a visualização de bandas específicas para cada gene investigado (Figuras 12 e 13).

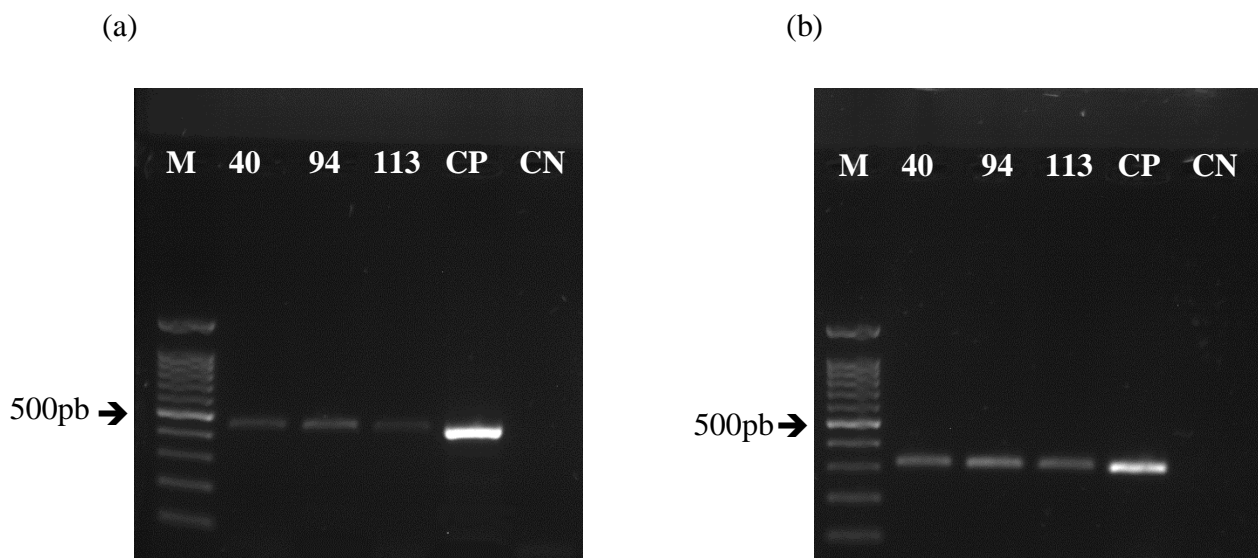
Figura 12 - Géis representativos dos produtos de RT-PCR para os genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F



Fonte: A autora.

Legenda: (a) gene *casI* (565pb); (b) gene *cas8f* (472pb); M- Marcador de peso molecular (100pb); CP- controle positivo; CN- controle negativo.

Figura 13 - Géis representativos dos produtos de RT-PCR para os genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-E



Fonte: A autora

Legenda: (a) gene *cas8e* (445pb); (b) gene *cas7* (321pb); M- Marcador de peso molecular (100pb); CP- controle positivo; CN- controle negativo.

Dos 50 isolados que possuem o sistema tipo I-F, 38 (76%) estão expressando os dois genes investigados. Onze (22%) estão expressando apenas um dos genes, dentre os quais apenas dois expressam somente o gene *cas8f* e nove expressam apenas o gene *casI*. O isolado Pae6 foi o único que não expressou nenhum dos dois genes estudados (Quadro 7). Todos os isolados que possuem o sistema tipo I-E estão expressando os dois genes investigados (Quadro8).

Quadro 9 - Expressão qualitativa de genes *cas* do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

(Continua)

ID <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tipo de Sistema CRISPR/Cas	Gene <i>casI</i>	Gene <i>cas8f</i>
6	I-F	Negativo	Negativo
8	I-F	Positivo	Positivo
12	I-F	Positivo	Positivo
14	I-F	Positivo	Positivo
16	I-F	Positivo	Positivo
18	I-F	Positivo	Positivo
21	I-F	Positivo	Negativo
22	I-F	Positivo	Positivo
23	I-F	Positivo	Positivo
24	I-F	Negativo	Positivo
28	I-F	Positivo	Positivo
29	I-F	Positivo	Negativo
30	I-F	Positivo	Positivo
39	I-F	Positivo	Positivo
42	I-F	Positivo	Negativo
45	I-F	Positivo	Positivo
52	I-F	Positivo	Positivo
53	I-F	Positivo	Positivo
55	I-F	Positivo	Positivo
56	I-F	Positivo	Positivo
57	I-F	Positivo	Positivo
61	I-F	Positivo	Positivo
66	I-F	Positivo	Positivo
67	I-F	Positivo	Positivo
68	I-F	Positivo	Positivo

(Continuação)

ID <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tipo de Sistema CRISPR/Cas	Gene <i>casI</i>	Gene <i>csyI</i>
70	I-F	Positivo	Positivo
74	I-F	Negativo	Positivo
75	I-F	Positivo	Positivo
77	I-F	Positivo	Positivo
80	I-F	Positivo	Positivo
83	I-F	Positivo	Positivo
90	I-F	Positivo	Negativo
91	I-F	Positivo	Positivo
96	I-F	Positivo	Positivo
97	I-F	Positivo	Positivo
99	I-F	Positivo	Positivo
101	I-F	Positivo	Negativo
103	I-F	Positivo	Positivo
105	I-F	Positivo	Positivo
106	I-F	Positivo	Negativo
107	I-F	Positivo	Negativo
108	I-F	Positivo	Positivo
110	I-F	Positivo	Positivo
111	I-F	Positivo	Negativo
113	I-F	Positivo	Positivo
114	I-F	Positivo	Positivo
115	I-F	Positivo	Positivo
116	I-F	Positivo	Negativo
127	I-F	Positivo	Positivo
129	I-F	Positivo	Positivo

Fonte: A autora.

Legenda: Os isolados que possuem a identificação em cinza tiveram seus genomas sequenciados; laranja- *casI* e *csyI* negativos; azul- *casI* positivo e *csyI* negativo; rosa- *casI* negativo e *cas8f* positivo.

Quadro 10 - Expressão qualitativa de genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-E nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

(Continuação)

ID <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tipo de sistema CRISPR/Cas	Gene <i>cas8e</i>	Gene <i>cas7</i>
22	I-E	Positivo	Positivo
40	I-E	Positivo	Positivo
78	I-E	Positivo	Positivo

(Continuação)

81	I-E	Positivo	Positivo
93	I-E	Positivo	Positivo
94	I-E	Positivo	Positivo
113	I-E	Positivo	Positivo

Fonte: A autora.

Legenda: Os isolados que possuem a identificação em cinza tiveram seus genomas sequenciados.

9.3 Análise dos genomas e seleção dos isolados para avaliação da expressão quantitativa dos genes *cas*

Através da análise do sequenciamento dos 13 genomas de *P. aeruginosa* depositados no banco de dados (GenBank PRJNA514718), foi possível observar todo o conteúdo do sistema CRISPR/Cas (*locus* CRISPR, genes *cas* e espaçadores), bem como os bacteriófagos presentes nesses genomas, e se possuíam genes anti-CRISPR (*acrs*). Dentre esses, cinco isolados representativos dos dois tipos de sistema CRISPR tipo I-F e I-E, foram selecionados para avaliação quantitativa da expressão dos genes *cas*.

Os isolados 66 e 81 foram selecionados por representar os sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E, respectivamente, e por possuírem o sistema íntegro, sem características adicionais. O isolado 29 foi investigado por apresentar em seu genoma profagos e espaçadores no *locus* CRISPR contra o mesmo profago. O isolado 42 apresenta no seu genoma gene anti-CRISPR e profagos e espaçadores no *locus* CRISPR contra o mesmo profago. O isolado 22 apresenta em seu genoma os dois sistemas CRISPR tipo I-E e tipo I-F (Quadro 9). Genes anti-CRISPR (*acrE1*, *acrF3*, *acrF5* e *acrF7*) foram encontrados em cinco dos treze genomas sequenciados.

Quadro 11 - Características dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Isolado	Características	Profagos e anti-CRISPR
22	Presença dos sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E	-
29	Presença do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F Presença de profago no genoma e de espaçador contra o mesmo no <i>locus</i> CRISPR	MP38, phiCTX, vB_PaeS_PM105
42	Presença do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F Presença de gene anti-CRISPR Presença de profago no genoma e de espaçador contra o mesmo no <i>locus</i> CRISPR	<i>acrF7</i> JBD18, phiCTX, PMG1, vB_PaeP_Tr60_A
66	Presença do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F	-
81	Presença do Sistema CRISPR/Cas tipo I-E	-

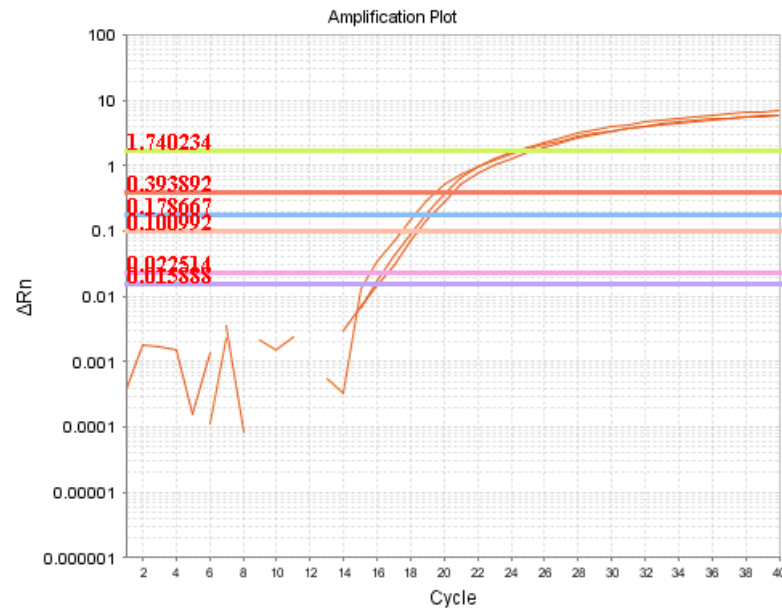
Fonte: A autora.

9.4 Avaliação da expressão gênica

9.4.1 Validação do controle endógeno

Os ensaios realizados para verificar se a utilização do gene *rpsL* como controle endógeno seria apropriada para o presente estudo demonstraram que o mesmo possui expressão uniforme em todas as amostras testadas. Através das curvas de amplificação no gráfico da Figura 14, é possível observar que o gene *rpsL* apresentou pouca ou nenhuma variação no Ct, possibilitando a utilização desse gene nos ensaios de qRT-PCR.

Figura 14 - Gráfico de amplificação do gene *rpsL* em ensaio de padronização



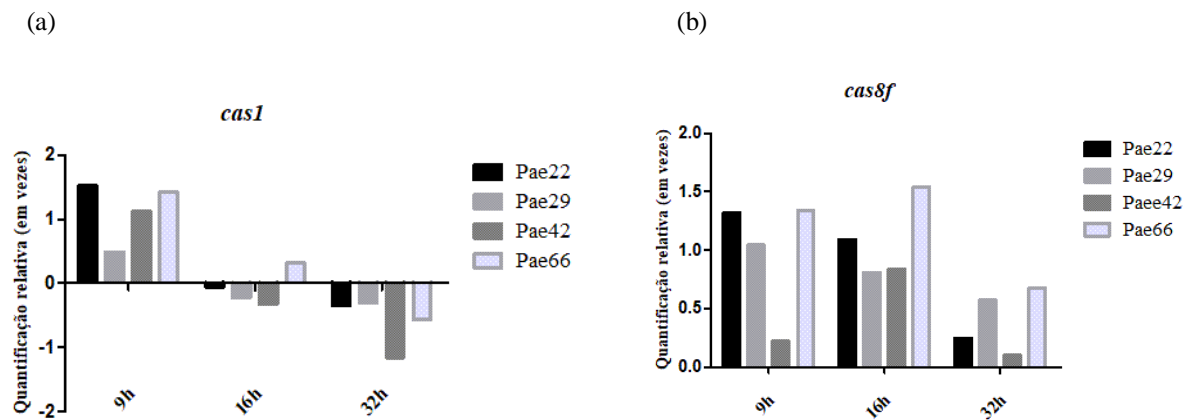
Fonte: A autora.

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

9.4.2 Expressão relativa dos genes *cas* dos sistemas CRISPR/Cas tipo I-F e I-E

A análise da expressão relativa do sistema CRISPR/Cas tipo I-F entre as duas condições nutricionais revelou que esse sistema é mais expresso sob ricas condições nutricionais (Figura 15). No tempo 1 (9 horas) houve a superexpressão do gene *casI* em até 30 vezes no meio LB (isolado Pae22). Também foi possível observar uma diminuição na expressão desse gene em todos os isolados com o passar do tempo (Figura 15a). O gene *cas8f* teve uma diminuição da expressão ao longo do tempo apenas para os isolados Pae22 e Pae29. Nos isolados Pae42 e Pae66 o maior nível de expressão foi atingido com 16 horas de crescimento.

Figura 15 - Expressão relativa de genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F em meio LB



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão dos genes *cas1* (a) e *cas8f* (b) em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em meio LB por 9 horas, 16 horas e 32 horas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o meio M9 como controle (0).

A avaliação da expressão relativa do sistema do tipo I-E foi realizada através da investigação dos alvos *cas1* e *cse1*, porém foi observado que apenas o isolado Pae81 estaria amplificando o gene *cas1*. Após repetição da reação de qRT-PCR e constatação da ausência de amplificação no isolado Pae22, uma análise no genoma do referido isolado foi realizada afim de identificar possíveis mutações nesse gene. Como o isolado Pae22 possui ambos os tipos de sistema em seu genoma (I-F e I-E), foi realizado um alinhamento múltiplo da *cas1* do tipo I-E entre isolados que também possuem ambos os sistemas (Pae113, DK1 e NHmuc, sendo as duas últimas cepas, genomas completos disponíveis no banco de dados do NCBI) (Figura 16). Foi observado que a proteína Cas1 do sistema I-E de Pae22 é 193 aminoácidos menor do que a Cas1 convencional deste tipo de sistema, possuindo uma grande deleção interna em sua sequência proteica, e os oligonucleotídeos desenhados para amplificação deste gene correspondem à região deletada. Devido à ausência de amplificação via qRT-PCR, confirma-se também que a deleção não é um produto de falha na montagem do genoma.

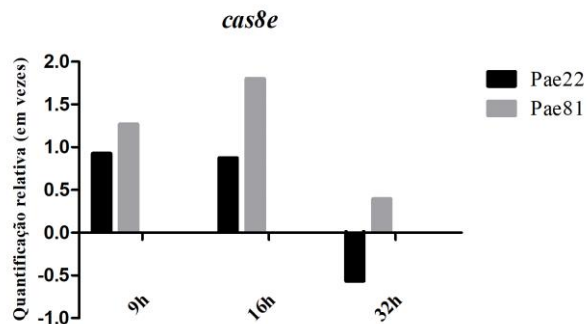
Figura 16 - Alinhamento múltiplo da proteína Cas1 do sistema tipo I-E de *P. aeruginosa*

DK1	1	MV FVQY GGQIDVRD GAFV VIDQTG VRMHI PVGS VACIMLE PGTRV SHAAVHL ASTV GTL LV
NHmuc	1	MV FVQY GGQIDVRD GAFV VIDQTG VRMHI PVGS VACIMLE PGTRV SHAAVHL ASTV GTL LV
Pae113	1	MV FVQY GGQIDVRD GAFV VIDQTG VRMHI PVGS VACIMLE PGTRV SHAAVHL ASTV GTL LV
Pae22	1	MV FVQY GGQIDVRD GAFV VIDQTG VRMHI PVGS VACIMLE PGTRV SHAAVHL ASTV GTL LV
DK1	61	WV GEAG VRLYAS QPGGAR ADRLLY QARL ALDDELRLK VVRK MYELR FAEP APARRS VEQ
NHmuc	61	WV GEAG VRLYAS QPGGAR ADRLLY QARL ALDDELRLK VVRK MYELR FAEP APARRS VEQ
Pae113	61	WV GEAG VRLYAS QPGGAR ADRLLY QARL ALDDELRLK VVRK MYELR FAEP APARRS VEQ
Pae22	61	WV GE -----
DK1	121	LRG IEGAR VRETYRLLAR QFGV DWRARNYDRR KWDA ADV PNRCL SAATS CLYG ITEAAVL
NHmuc	121	LRG IEGAR VRETYRLLAR QFGV DWRARNYDRR KWDA ADV PNRCL SAATS CLYG ITEAAVL
Pae113	121	LRG IEGAR VRETYRLLAR QFGV DWRARNYDRR KWDA ADV PNRCL SAATS CLYG ITEAAVL
Pae22	65	-----
DK1	181	AAGYAPAVGFIHTG KPLS FYDIADL FKFD TVVPVAFR IAAK APS QPER DVRLACR DIFR
NHmuc	181	AAGYAPAVGFIHTG KPLS FYDIADL FKFD TVVPVAFR IAAK APS QPER DVRLACR DIFR
Pae113	181	AAGYAPAVGFIHTG KPLS FYDIADL FKFD TVVPVAFR IAAK APS QPER DVRLACR DIFR
Pae22	65	-----
DK1	241	SSKLLTRIIPTIEEVL AGG VEPPS APPES VPSAIPN PEG IGDLGHRT QG
NHmuc	241	SSKLLTRIIPTIEEVL AGG VEPPS APPES VPSAIPN PEG IGDLGHRT QG
Pae113	241	SSKLL A RIIPTIEEVL AGG VEPPS APPES V P AI P AIN PEG IGDLGHRT QG
Pae22	65	----- AGG VEPPS APPES VPSAIPN PEG IGDLGHRT QG

Fonte: A autora.

Dessa forma, a análise da expressão só pôde ser realizada através do gene *cas8e*, que assim como o tipo I-F, demonstrou uma maior expressão também em meio LB (Figura 17). A expressão do isolado Pae22 diminuiu com o passar do tempo, enquanto que o isolado Pae81 apresentou maiores níveis de expressão com 16 horas de crescimento, sendo expresso 63 vezes mais no meio LB do que no meio M9.

Figura 17 - Expressão relativa do gene *cas8e* do sistema CRISPR/Cas tipo I-E em meio LB

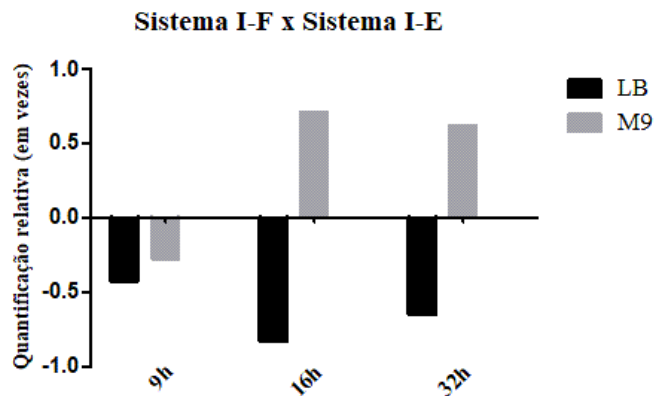


Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão do gene *cas8e* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados em meio LB por 9 horas, 16 horas e 32 horas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o meio M9 como controle (0).

A comparação dos níveis de expressão entre os sistemas CRISPR/Cas tipos I-F e I-E nos diferentes meios de cultivo, foi realizada pela avaliação nos níveis de expressão do gene *cas1* dos respectivos tipos de sistema, utilizando-se o isolado Pae66, visto que esse gene possui a mesma função em ambos os sistemas CRISPR. A análise revelou que no meio LB o sistema tipo I-F é menos expresso do que o sistema tipo I-E (Figura 18). No meio M9, houve um aumento no nível de expressão do sistema tipo I-F com 16 horas e 32 horas, no qual o sistema foi 5 e 4 vezes, respectivamente, mais expresso do que o sistema tipo I-E.

Figura 18 - Expressão relativa do gene *casI* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F sob diferentes condições nutricionais

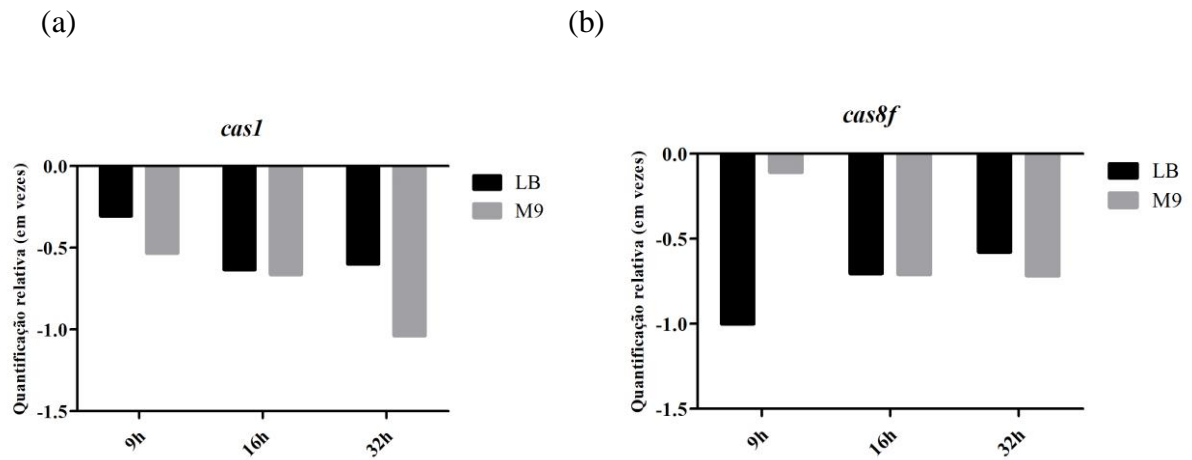


Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão do gene *casI* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F, em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, cultivados sob condições nutricionais diferentes por 9 horas, 16 horas e 32 horas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o sistema CRISPR/Cas tipo I-E como controle (0).

A análise comparativa entre os níveis de expressão de um isolado comportando um sistema CRISPR/Cas do tipo I-F íntegro e um isolado que apresenta um gene anti-CRISPR revelou, como demonstrado na Figura 19, que nas duas condições nutricionais o isolado Pae42 que possui o gene anti-CRISPR apresentou menores níveis de expressão de ambos os genes investigados.

Figura 19 - Expressão relativa dos genes *casI* e *cas8f* no isolado Pae42 sob diferentes condições nutricionais

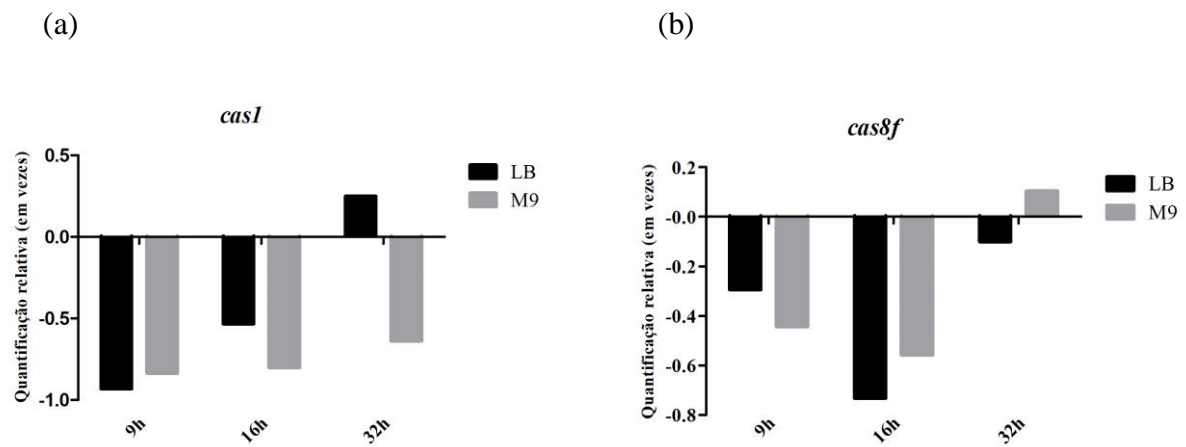


Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão dos genes *casI* (a) e *cas8f* (b) no isolado clínico Pae42 (possui gene anti-CRISPR), quando comparado ao isolado Pae66 (apresenta um sistema CRISPR/Cas íntegro), cultivados sob condições nutricionais diferentes por 9 horas, 16 horas e 32 horas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o isolado Pae66 como controle (0).

A análise comparativa entre o isolado Pae29 (que apresenta em seu genoma um profago e um espaçador alvo em seu *locus* CRISPR) e o isolado Pae66 revelou que em ambas as condições nutricionais e em todos os tempos investigados, o isolado Pae29 apresentou menor nível de expressão em relação ao isolado Pae66, como é possível observar na Figura 20.

Figura 20 - Expressão relativa dos genes *cas1* e *cas8f* no isolado Pae29 sob diferentes condições nutricionais

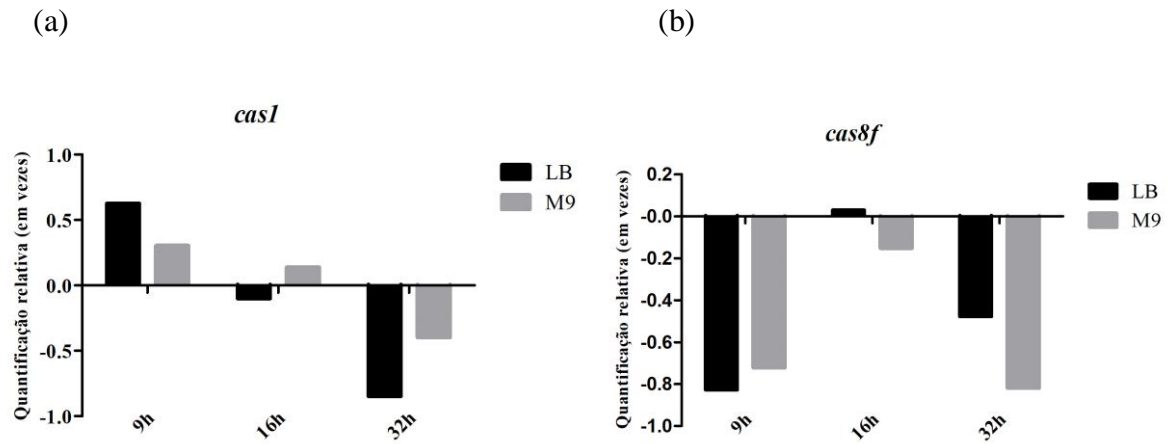


Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão dos genes *cas1* (a) e *cas8f* (b) no isolado clínico Pae29 (possui um profago em seu genoma e espaçador alvo em seu locus CRISPR), quando comparado ao isolado Pae66 (apresenta um sistema CRISPR/Cas íntegro), cultivados sob condições nutricionais diferentes por 9 horas, 16 horas e 32 horas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o isolado Pae66 como controle (0).

Quando comparados os níveis de expressão relativa dos isolados Pae42 e Pae29, foi possível observar, como demonstrado na Figura 21, que o isolado Pae42 apresentou um menor nível de expressão para os dois genes investigados, nos três tempos, quando comparado com o isolado que Pae29.

Figura 21 - Expressão relativa dos genes *cas1* e *cas8f* no isolado Pae42 quando comparado ao isolado Pae29, sob diferentes condições nutricionais.



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação dos níveis de expressão dos genes *cas1* (a) e *cas8f* (b) no isolado clínico Pae42 (possui gene anti-CRISPR), quando comparado ao isolado Pae29 (possui um profago em seu genoma e espaçador alvo em seu locus CRISPR), cultivados sob condições nutricionais diferentes por 9 horas, 16 horas e 32 horas. O isolado Pae29 foi utilizado como controle (0) para a quantificação relativa.

10 DISCUSSÃO

Diante do risco de infecções por fagos, os microrganismos desenvolvem diferentes estratégias de defesa para sobreviverem. Porém, acredita-se que o custo energético para manutenção de tais sistemas seja dispendioso, e portanto, seja necessário um controle refinado sobre a sua regulação, visto que não podem ser mantidos simultaneamente com outras atividades exigentes (MORET; SCHMID-HEMPEL, 2000; WESTRA *et al.*, 2012). Embora existam vários estudos descrevendo os mecanismos moleculares envolvidos no funcionamento do sistema CRISPR/Cas, detalhes a respeito da regulação da transcrição desse sistema permanecem não elucidados (YOUNG *et al.*, 2012).

O sistema CRISPR/Cas em *Escherichia coli* K12 é regulado estritamente pela transcrição do promotor p_{cas} . Apesar de complexa, a regulação negativa e positiva do sistema pelas proteínas H-NS (proteína estruturadora de nucleóides do tipo histona) e LeO (regulador transcricional do tipo LysR), respectivamente, já estão bem descritas (WESTRA *et al.*, 2012). A expressão de genes *cas* do sistema tipo I-E em *Thermus thermophilus* é regulada por uma proteína receptora de AMP cíclico (CRP) e é induzida apenas após a infecção (AGARI *et al.*, 2010). Em *P. aeruginosa*, até o momento pouco se conhece sobre as vias de regulação do sistema CRISPR/Cas.

No presente estudo, a frequência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* expressando genes associados ao CRISPR foi bastante elevada, demonstrando que esses sistemas sejam constitutivamente expressos, fato que parece estar relacionado a necessidade de uma rápida resposta à infecção, dada velocidade em que o vírus pode assumir o controle maquinário do hospedeiro (YOUNG *et al.*, 2012).

De acordo com Yosef *et al.* (2012), as proteínas Cas1 e Cas2 são os elementos chave para a fase de adaptação do sistema CRISPR/Cas; elas atuam na integração de espaçadores mesmo na ausência de todas as outras proteínas Cas, mas são dispensáveis para a etapa de interferência (YOSEF *et al.*, 2012). Dentre os isolados clínicos estudados comportando o sistema tipo I-F, apenas dois não expressaram o gene *cas1*, o que sugere que estes isolados não estejam incorporando novos espaçadores ao *locus* CRISPR e dessa forma, não consigam utilizar essa maquinaria para proteção contra novas infecções. Nove dos isolados que possuem o sistema do tipo I-F não expressaram o gene *cas8f*. Segundo Young *et al.* (2012), algumas

proteínas Cas são expressas constitutivamente, enquanto outras são ativadas apenas após a infecção.

Nos sistemas tipos I-F e I-E, o processamento dos crRNA é realizado por um complexo efetor ribonucleoproteico, também chamado de *cascade*, o qual vai atuar no processamento do pré-crRNA, e reconhecimento do alvo (HAURWITZ *et al.*, 2010). Uma complexa estrutura formada pelas proteínas Cas5, Cas7 e Cas8 acomoda o pré-crRNA e interage com a proteína Cas6, uma endoribonuclease independente de metal, que é a responsável pela clivagem do pré-crRNA (KOONIN; MAKAROVA; ZHANG, 2017; PRZYBILSKI *et al.*, 2011).

A expressão dos genes *cas8e* e *cas7* em todos os isolados comportando o sistema do tipo I-E, sugerem que esse sistema esteja funcional, pois estariam produzindo crRNA mesmo sob baixo risco de infecção. Apesar do alto custo energético para a manutenção do sistema CRISPR/Cas, algumas condições como limitação de nutrientes, acúmulo de produtos tóxicos e presença de fatores estressantes (como mudança de PH e temperatura), podem contribuir para a síntese de proteínas que estão envolvidas na sobrevivência celular (JAISHANKAR; SRIVASTAVA, 2017).

A dinâmica de proliferação dos bacteriófagos é comumente explicada através do modelo *Kill-the-Winner* (KtW) de infecção viral, o qual indica que a lisogenia é mais frequente com baixa densidade do hospedeiro, e que portanto, o risco de infecção se eleva com o aumento da densidade das células bacterianas (KNOWLES *et al.*, 2016). Partindo da hipótese de que o risco de infecção seria maior sob ricas condições nutricionais, e que esse risco possa ser o mecanismo geral que determina qual o tipo de defesa é utilizada pelos hospedeiros bacterianos, Westra *et al.* (2015) utilizaram a cepa UCBPP-PA14 de *P. aeruginosa* como modelo de estudo para avaliação do mecanismo imune CRISPR/Cas sob diferentes condições nutricionais.

Diferentemente do observado por Westra *et al.* (2015), no presente estudo foi verificado maiores níveis de expressão dos genes *cas* sob ricas condições nutricionais em todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Apesar dos testes estatísticos não terem demonstrado diferença significativa nos níveis de expressão entre as duas condições nutricionais avaliadas, para o sistema tipo I-F foi observado um aumento da expressão 30 vezes maior no meio rico em nutrientes (LB). Esse resultado sugere que os isolados clínicos utilizam o sistema de forma constitutiva preferencialmente quando há maior disponibilidade

de nutrientes. Porém são necessários mais estudos para avaliar se esses isolados mantêm o padrão de expressão sob maior risco de infecção.

Os resultados obtidos acerca da expressão quantitativa do sistema tipo I-E sugerem uma possível inatividade desse sistema no isolado Pae22 devido a produção de uma proteína Cas1 incompleta. A expressão relativa do gene *cas1* nesse isolado não pôde ser realizada porque a sequência nucleotídica do *primer* utilizado na análise é referente a sequência gênica que está ausente no mesmo. Análises posteriores serão realizadas para avaliar se o sítio ativo da proteína foi mantido. O desenho de um novo *primer* e repetição dos experimentos são necessários para confirmação da inatividade desse sistema.

Os genes anti-CRISPR representam um importante sistema de neutralização das defesas bacterianas anti-fágicas. Em genomas nos quais há a presença de tais genes, o sistema de defesa CRISPR/Cas é inativado, possibilitando a infecção por fagos, mesmo na presença de espaçadores alvo (BONDY-DENOMY *et al.*, 2013; PAWLUK; BONDY-DENOMY; CHEUNG, 2014). O isolado Pae29 foi o único a apresentar um profago incorporado ao seu genoma e um espaçador alvo no *locus* CRISPR contra o mesmo, na ausência de genes anti-CRISPR, sugerindo que o sistema esteja exercendo uma outra função, que não de imunidade para esse isolado. A análise da expressão relativa demonstrou que o isolado Pae42, assim como o Pae29 estão constitutivamente expressando o sistema CRISPR/Cas, porém como esperado, em níveis inferiores ao isolado que contém o sistema íntegro.

A avaliação da expressão quantitativa ao longo do tempo, demonstrou que os níveis de expressão do gene *cas1* no isolado Pae42 diminuiu com o decorrer do tempo para as duas condições avaliadas. Esse dado sugere que um controle regulatório poderia estar sendo ativado nesse isolado no início da fase estacionária. É possível que a presença do gene anti-CRISPR possa estar envolvida nesse processo, exercendo algum efeito inibitório sobre o sistema. Mais ensaios avaliando não só a expressão do sistema, mas também do gene anti-CRISPR, seriam necessários para compreender essa dinâmica regulatória no referido isolado.

O presente estudo teve por objetivo buscar uma melhor compreensão acerca da expressão do sistema imune CRISPR/Cas em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e compreender a função desse sistema em isolados cujas características apontavam para uma possível inatividade do mecanismo imune. Os resultados obtidos mostram a necessidade de mais estudos funcionais utilizando isolados clínicos, visto que os mesmos, demonstram possuir mecanismos divergentes dos utilizados pela cepa controle UCBPP-PA14. Esses dados

apresentam possíveis caminhos a serem seguidos para a elucidação do mecanismo funcional utilizado por essa espécie bacteriana na defesa contra infecções fágicas.

11 CONCLUSÕES

- a) Genes associados ao CRISPR são expressos constitutivamente em isolados clínicos brasileiros de *P. aeruginosa*;
- b) Nos isolados clínicos estudados, o sistema CRISPR/Cas demonstrou ser ativo preferencialmente sob ricas condições nutricionais, contrapondo os achados da literatura;
- c) A presença do gene *casI* mutado em um isolado comportando os dois tipos de sistema sugere inatividade na etapa de adaptação do sistema tipo I-E;
- d) A análise da expressão relativa em um isolado comportando genes anti-CRISPR sugere a existência de um mecanismo regulatório que controle a expressão de tais genes, e dessa forma, a possível inativação do sistema;
- e) A expressão do sistema em um isolado contendo espaçador alvo contra um profago em seu genoma sugere uma diferente atuação desse sistema, não apenas na imunidade, para o sistema CRISPR/Cas. Uma possível hipótese seria a utilização do sistema também para regulação da expressão de produtos proteicos virais.

REFERÊNCIAS

- AGARI, Y. *et al.* Transcription Profile of *Thermus thermophilus* CRISPR Systems after Phage Infection. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 395, n. 2, p. 270–281, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.057>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 14, n. 2, p. 67–76, 2016. Disponível em: <https://doi: 10.1038/nrmicro.2015.14>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- ARNDT, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, London, v. 44, n. W1, p. W16–W21, 2016. Disponível em: <https://doi: 10.1093/nar/gkw387>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BABU, M. *et al.* A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 72, p. 484–502, 2011. Disponível em: <https://doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07465.x>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. 1, p. 1–20, 2013. Disponível em: <https://doi: 10.1093/nar/gks1039>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, Washington, v. 315, p. 1709–1712, Mar. 2007. Disponível em: <https://doi: 10.1126/science.1138140>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BARRANGOU, R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 32, p. 36–41, 2015. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.coi.2014.12.008>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-CAS systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Mol cell**, Cambridge, v. 54, n. 2, p. 234–244, 2014. Disponível em: <https://10.1016/j.molcel.2014.03.011>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- BÉDARD, E.; PRÉVOST, M.; DÉZIEL, E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. **Microbiology Open**, Hilversum, v. 5, n. 6, p. 937–956, 2016. Disponível em:

[https:// doi: 10.1002/mbo3.391](https://doi.org/10.1002/mbo3.391). Acesso em: 19 fev. 2019.

BELKUM, A. VAN *et al.* Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, Washington, v. 6, n. 6, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01796-15>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BOLOTIN, A. *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, London, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BONDY-DENOMY, J. *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. **Nature**, London, v. 1, n. Part III, p. 429–432, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11723>. Acesso em: 19 fev. 2019.

Bondy-denomy, j. *et al.* Multiple mechanisms for crispr–cas inhibition by anti–crispr proteins. **Nature HHS**, London, v. 526, n. 7571, p. 136–139, 2016a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature15254>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BONDY-DENOMY, J. *et al.* Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. **ISME Journal**, London, v. 10, n. 12, p. 2854–2866, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BORGES, A. L. *et al.* Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. **Cell**, Cambridge, v. 174, n. 4, p. 917–925.e10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.013>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BORGES, A. L.; DAVIDSON, A. R.; BONDY-DENOMY, J. The Discovery, Mechanisms, and Evolutionary Impact of Anti-CRISPRs. **Annual Review of Virology**, California, v. 4, n. 1, p. 37–59, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041616>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BURMISTRZ, M.; PYRĆ, K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. **Polish Journal of Microbiology**, Varsóvia, v. 64, n. 3, p. 193–202, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0009.2114>. Acesso em: 19 fev. 2019.

CADY, K. C. *et al.* Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Microbiology**, London, v. 157, n. 2, p. 430–437, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.045732-0>.

Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, Washington DC, v. 194, n. 21, p. 5728–5738, 2012. Disponível em: [https://doi: 10.1128/JB.01184-12](https://doi.org/10.1128/JB.01184-12). Acesso em: 19 fev. 2019.

CURRAN, C. S.; BOLIG, T.; TORABI-PARIZI, P. STATE OF THE ART Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. **Am J Respir Crit Care Med**, Nova York, v. 197, n. 6, p. 708–727, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-1043SO>. Acesso em: 19 fev. 2019.

DY, R. L. *et al.* Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. **Annual Review of Virology**, California, v. 1, n. 1, p. 307–331, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ESSOH, C. *et al.* The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060575>. Acesso em: 19 fev. 2019.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, Malden, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>. Acesso em: 19 fev. 2019.

GROENEN, P. M. A. *et al.* Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>. Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, San Francisco, v. 1, n. 6, p. 0474–0483, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HATOUM-ASLAM, A.; MARRAFFINI, L. A. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, London,

v. 27, n. 3, p. 320–331, 2014. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.mib.2013.12.001>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HAURWITZ, R. E. *et al.* Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. **Science**, Nova York, v. 329, n. 5997, p. 1355–1358, 2010. Disponível em: <https://doi:10.1126/science.1192272>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HEUSSLER, G. E. *et al.* Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* type I-F CRISPR-Cas adaptation determined using a biofilm enrichment assay. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 198, n. 22, p. 3080–3090, 2016. Disponível em: <https://doi:10.1128/JB.00458-16>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HOE, N. *et al.* Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 2, p. 254–263, 1999. Disponível em: <https://doi:10.3201/eid0502.990210>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, New York, v. 327, n. 5962, p. 167–170, 2010. Disponível em: <https://doi:10.1126/science.1179555>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HØYLAND-KROGHSBO, N. M. *et al.* Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 114, n. 1, p. 131–135, 2017. Disponível em: <https://doi:10.1073/pnas.1617415113>. Acesso em: 19 fev. 2019.

INSTITUT PASTEUR. **CRISPRCas database**. Paris, 2020. Disponível em: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>. Acesso em: 9 fev. 2020.

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**, Washington, DC, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987. Disponível em: <https://doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>. Acesso em: 19 fev. 2019.

JAISHANKAR, J.; SRIVASTAVA, P. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. **Front Microbial**, Laussane, v. 8, n. October, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi:10.3389/fmicb.2017.02000>. Acesso em: 19 fev. 2019.

JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002. Disponível em: <https://doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability Article Fast Track. **Mol Bio Evol**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. Disponível em: <https://doi: 10.1093/molbev/mst010>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KERR, K. G.; SNELLING, A. M. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, New York, v. 73, n. 4, p. 338–344, 2009. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KLOCKGETHER, J.; TÜMMLER, B. Recent advances in understanding Pseudomonas aeruginosa as a pathogen. **F1000Research**, London, v. 6, n. 0, p. 1261, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.12688/f1000research.10506.1>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KNOWLES, B. *et al.* Lytic to temperate switching of viral communities. **Nature**, London, v. 531, n. 7595, p. 466–470, 2016. Disponível em: <https://doi:10.1038/nature17193>. Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 2812–2825, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1093/gbe/evx192>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 37, p. 67–78, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KOONIN, E. V. CRISPR : a new principle of genome engineering linked to conceptual shifts in evolutionary biology. **Biology & Philosophy**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 9, 2019. Disponível em: <https://doi: 10.1007/s10539-018-9658-7>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KOSKELLA, B. *et al.* The costs of evolving resistance in heterogeneous parasite environments. **Proc Biol Sci**, London, 2011, p. 1896–1903, 2012. Disponível em: <https://doi: 10.1098/rspb.2011.2259>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KOSKELLA, B.; BROCKHURST, M. A. evolutionary processes in microbial communities. **FEMS Microbiol Rev**, Amsterdã, v. 38, n. 5. p. 1–16, 2014. Disponível em: <https://doi:10.1111/1574-6976.12072>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KUNIN, V.; SOREK, R.; HUGENHOLTZ, P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 4, p. R61, 2007. Disponível em: <https://doi:10.1186/gb-2007-8-4-r61>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Publishing Group**, London, v. 8, n. 5, p. 317–327, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 95, n. 41, p. 22–26, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308633/>. Acesso em: 19 fev. 2019.

LEAL-BALBINO, T. C. *et al.* **Introdução à técnica de CRISPR**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 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**, Berlin, v. 294, n. 5, p. 1095–1105, 2019. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00438-019-01575-7>. Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, London, v. 1, n. 1, p. 7, 2006. Disponível em: <https://doi:10.1186/1745-6150-1-7>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MAKAROVA, K. S. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 6, p. 467–477, 2011. Disponível em: <https://doi:10.1038/nrmicro2577>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MAKAROVA, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, n. 11, p. 722–736, 2015. Disponível em: <https://doi:10.1038/nrmicro3569>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 41, n. 6, p. 1392–1400, 2013. Disponível em: <https://doi: 10.1042/BST20130038>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **Science**, New York, v. 322, p. 1843-45, 2008. Disponível em: <https://doi: 10.1126/science.1165771>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MCCOURT, J. *et al.* Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 353, n. 2, p. 157–164, 2014. Disponível em: <https://doi: 10.1111/1574-6968.12424>. Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 85–93, 1995. Disponível em: https://doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x. Acesso em: 19 fev. 2019.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, p. 244–246, 2000. Disponível em: <https://doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005. Disponível em: <https://doi: 10.1007/s00239-004-0046-3>. Acesso em: 19 fev. 2019.

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**, Laussane, v. 7, n. Pt 4, p. 1113, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.3389/fcimb.2017.00039>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. **Science**, New York, v. 290, n. 5494, p. 1166–1168, 2000. Disponível em: <https://doi: 10.1126/science.290.5494.1166>. Acesso em: 19 fev. 2019.

NISHIMASU, H.; NUREKI, O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector

nucleases. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 43, p. 68–78, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.sbi.2016.11.013>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. ScienceDirect Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & Diseases**, Chongqing, v. 6, n. 2, p. 109–119, 2019. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.001>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PAWLUK, A.; BONDY-DENOMY, J.; CHEUNG, V. H. W. A New Group of Phage Anti-CRISPR Genes Inhibits the Type I-E CRISPR-Cas System of *Pseudomonas aeruginosa*. **mBiol**, Washington, DC, v. 5, n. 2, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi: 10.1128/mBio.00896-14>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PAWLUK, A.; DAVIDSON, A. R.; MAXWELL, K. L. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.16, n.1, p. 12-17, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1038/nrmicro.2017.120>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.57, p. 106-116, 2017. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.026>. Acesso em: 19 fev. 2019.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, London, v. 151, n. 3, p. 653–663, 2005. Disponível em: <https://doi: 10.1099/mic.0.27437-0>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PRZYBILSKI, R. *et al.* Csy4 is responsible for CRISPR RNA processing in *Pectobacterium atrosepticum*. **RNA Biology**, Filadélfia, v.8, n.3, p. 517–528, 2011. Disponível em: <https://doi: 10.4161/rna.8.3.15190>. Acesso em: 19 fev. 2019.

RATH, D. *et al.* The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications.

Biochimie, Paris, v. 117, p. 119–128, 2015. Disponível em: <https://10.1016/j.biochi.2015.03.025>. Acesso em: 19 fev. 2019.

RICHTER, C.; CHANG, J. T.; FINERAN, P. C. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 10, p. 2291–2311, 2012. Disponível em: <https://10.3390/v4102291>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ROLLINS, M. F. *et al.* Mechanism of foreign DNA recognition by a CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Pseudomonas aeruginosa*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, n. 4, p. 2216–2222, 2015. Disponível em: <https://10.1093/nar/gkv094>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ROLLINS, M. F. *et al.* Cas1 and the Csy complex are opposing regulators of Cas2/3 nuclease activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 1, p. 201616395, 2016. Disponível em: <https://10.1073/pnas.1616395114>. Acesso em: 19 fev. 2019.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; CANTON, R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. **Rev Esp Quimioter**, Barcelona, v. 30, p. 8–12, 2017. Disponível em: <https://seq.es/seq/0214-3429/30/suppl1/01ruiz.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SAMPSON, T. R. *et al.* A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. **Nature**, London, v. 497, n.7448, p. 254-7, 2013. Disponível em: <https://10.1038/nature12048>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Lausanne, v. 4, n. April, p. 37, 2014. Disponível em: <https://10.3389/fcimb.2014.00037>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SAMSON, J. E. *et al.* Revenge of the phages: defeating bacterial defences. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 11, n. 10, p. 675–87, 2013. Disponível em: <https://10.1038/nrmicro3096>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SEED, K. D. Battling Phages : How Bacteria Defend against Viral Attack. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.11, n.6, p. 1–5, 2015. Disponível em: <https://10.1371/journal.ppat.1004847>.

Acesso em: 19 fev. 2019.

Silas, s. *Et al.* On The Origin of Reverse Transcriptase- Using CRISPR-Cas Systems and Their Hyperdiverse, Enigmatic Spacer Repertoires. 2017. **Mbio**, washington, v. 8, n. 4, p.897-17, 2017. Disponível em: <https://10.1128/mbio.00897-17>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SILBY, M. W. *et al.* Pseudomonas genomes : diverse and adaptable. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 35, p. 652–680, 2011. Disponível em: <https://10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SONNLEITNER, E.; ROMEO, A.; BLÄSI, U. Small regulatory RNAs in Pseudomonas aeruginosa. **RNA Biology**, Georgetown, v. 9, n. 4, p. 364–371, 2012. Disponível em: <https://10.4161/rna.19231>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SOREK, R.; KUNIN, V.; HUGENHOLTZ, P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 3, p. 181–186, 2008. Disponível em: <https://10.1038/nrmicro1793>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SUBEDI, D.; VIJAY, A. K.; WILLCOX, M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. **Clinical and Experimental Optometry**, Philadelphia, v. 101, n. 2, p. 162–171, 2018. Disponível em: <https://10.1111/cxo.12621>. Acesso em: 19 fev. 2019.

TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; GONZÁLEZ-DELGADO, A. The Reverse Transcriptases Associated with CRISPR-Cas Systems. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://10.1038/s41598-017-07828-y>. Acesso em: 19 fev. 2019.

VAN DER OOST, J. *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 12, n. 7, p. 479–492, 2014. Disponível em: <https://10.1038/nrmicro3279>. Acesso em: 19 fev. 2019.

WEITZ, J. S. *et al.* Phage – bacteria infection networks. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 82-91, 2013. Disponível em: <https://10.1016/j.tim.2012.11.003>. Acesso em: 19 fev. 2019.

WESTRA, E. R. *et al.* The CRISPRs, They Are A-Changin’: How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 46, n. 1, p. 311–339, 2012.

Disponível em: <https://10.1146/annurev-genet-110711-155447>. Acesso em: 19 fev. 2019.

WESTRA, E. R. *et al.* Parasite exposure drives selective evolution of constitutive versus inducible defense. **Current Biology**, London, v. 25, n. 8, p. 1043–1049, 2015. Disponível em: <https://10.1016/j.cub.2015.01.065>. Acesso em: 19 fev. 2019.

WESTRA, E. R.; BUCKLING, A.; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 12, n. 5, p. 317–326, 2014. Disponível em: <https://10.1038/nrmicro3241>. Acesso em: 19 fev. 2019.

YOSEF, I. *et al.* Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, n. 12, p. 2–5, 2012. Disponível em: <https://10.1093/nar/gks216>. Acesso em: 19 fev. 2019.

YOUNG, J. C. *et al.* Phage-induced expression of CRISPR-associated proteins is revealed by shotgun proteomics in *Streptococcus thermophilus*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <https://10.1371/journal.pone.0038077>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ZEGANS, M. E. *et al.* Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 91, n. 1, p. 210–219, 2009. Disponível em: <https://10.1128/JB.00797-08>. Acesso em: 19 fev. 2019.