

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

Adriane Maria de Albuquerque Silva

Caracterização e investigação da expressão do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*

Recife

2021

Adrienne Maria de Albuquerque Silva

**Caracterização e investigação da expressão do sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para à obtenção do título
de Mestre em ciências.

Área de concentração: Biologia celular e
molecular de patógenos, vetores e
hospedeiros.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal-Balbino

Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Oliveira Luz

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

S586c	<p>Silva, Adrienne Maria de Albuquerque. Caracterização e investigação da expressão do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> / Adrienne Maria de Albuquerque. — Recife: [s.n.], 2021. 95 p. il., graf., tab. ; 30 cm.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.</p> <p>Orientadora: Tereza Cristina Leal-Balbino; coorientadora: Ana Carolina de Oliveira Luz. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.</p> <p>1. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas - genética. 2. Sistemas CRISPR-Cas. 3. Proteínas Associadas a CRISPR - classificação. 4. Proteínas Associadas a CRISPR - genética. 5. <i>Acinetobacter baumannii</i> - genética. 6. Pró-fagos. 7. Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa - métodos. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Luz, Ana Carolina de Oliveira. III. Título.</p>	CDU 616.92
-------	--	------------

Adrienne Maria de Albuquerque Silva

**Caracterização e investigação da expressão do sistema CRISPR/Cas em
isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do título
de Mestre em ciências.

Área de concentração: Biologia celular e
molecular de patógenos, vetores e
hospedeiros.

Aprovada em: 05 de julho de 2021

Banca Examinadora

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino (Titular Interno)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Christian Robson de Souza Reis (Titular Interno)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana (Titular Externo)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

SILVA, Adrienne Maria de Albuquerque. **Caracterização e avaliação da expressão do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii***. 2021. Dissertação (Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Acinetobacter baumannii é um dos principais patógenos nosocomiais, cujas características contribuem para o desenvolvimento de surtos, principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). Dentre os mecanismos de defesa que a espécie dispõe, destaca-se o sistema CRISPR/Cas, que confere aos seus hospedeiros a proteção contra a invasão de elementos genéticos móveis indesejados, como bacteriófagos. O CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) corresponde a uma família de DNA repetitivo, presente no genoma de procariotos e arqueas, associados aos genes *cas* (CRISPR-associated), que codificam para proteínas com diversas funções. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão do sistema CRISPR/Cas em condições padrão, bem como a conferência de imunidade a bacteriófagos. Os genomas de 14 isolados foram analisados acerca da presença de profagos utilizando a ferramenta Phaster. O alinhamento de sequências através da ferramenta BLASTn contra os bancos de dados NCBI, Uniprot, CRISPRdb e CRISPR Target foi realizado para identificar a origem dos espaçadores nos CRISPR. A ferramenta AcrFinder e o alinhamento por BLASTx com sequências do banco de dados AcrHub, foram utilizados para identificar genes *anti-CRISPR* (*acr*). Para avaliar a expressão do sistema, foi aplicada a técnica de RT-PCR para os genes *cas1* e *csy1*, tendo como controle o gene *rpoB*. Foram identificadas regiões correspondentes a profagos em 13 isolados. Do total de 150 sequências espaçadoras, 48 apresentaram correspondência com bacteriófagos. Nenhum gene *acr* foi identificado nos genomas analisados. Todos os isolados estudados expressaram os genes *cas1* e *csy1*. Sete dos 14 genomas possuem uma região de profago e, pelo menos, um espaçador correspondente de forma simultânea. Tais achados sugerem que a defesa promovida pelo CRISPR esteja mantendo os profagos em estado de dormência. No entanto, demais estudos sobre a funcionalidade do sistema são necessários em bactérias de interesse clínico.

Palavras-chave: subtipo i-f1; profagos. anti-crispr; espaçador.

ABSTRACT

SILVA, Adrienne Maria de Albuquerque. **Characterization and evaluation of CRISPR/Cas system expression in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***. 2021. Dissertação (Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Acinetobacter baumannii is one of the major nosocomial pathogens, whose characteristics contribute to the development of outbreaks, especially in Intensive Care Units (ICUs). Among this species' defense mechanisms, the CRISPR/Cas system stands out, providing its hosts protection against unwanted mobile genetic elements invasions, such as bacteriophages. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) corresponds to a family of repetitive DNA, found in prokaryote and archaea's genomes, associated to *cas* genes, that codify proteins with diverse functions. The present study aimed to evaluate CRISPR/Cas system's expression under standard growth conditions, as well as its immunization against bacteriophage. The 14 isolates' genomes were analyzed concerning the prophages presence using the Phaster tool. Sequence alignment using the BLASTn tool against NCBI, Uniprot, CRISPRdb and CRISPR Target database was performed to identify the CRISPR's spacers origins. The AcrFinder tool as well as the alignment using BLASTx against sequences obtained from the AcrHub database were performed to identify *anti-CRISPR (acr)* genes. RT-PCR technique was applied to the *cas1* and *csy1* genes, to evaluate the system's expression, using the *rpoB* gene as control. Prophage regions could be identified in 13 of the isolates. From the total of 150 spacers sequences, 48 showed similarity to bacteriophages. No *acr* gene was found in the analyzed genomes. The *cas1* and *csy1* genes were expressed in all the isolates studied. Prophage regions were identified in seven out of the 14 genomes and at least one correspondent spacer, simultaneously. Those findings suggest that CRISPR defense may keep the prophages dormant. However, it is still necessary other studies regarding the system's functionality in bacterium of clinical interest.

Keywords: subtype i-f1; prophages; anti-crispr; spacer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606.	19
Figura 2 - Países que reportaram a ocorrência de surtos de infecção por <i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos	23
Figura 3 - Visão geral da dinâmica entre <i>Acinetobacter baumannii</i> epidêmica, pacientes e ambiente hospitalar.	26
Figura 4 – Regiões que registraram casos de infecções comunitárias por <i>Acinetobacter baumannii</i> .	30
Figura 5 – O primeiro CRISPR descrito na literatura, encontrando em <i>Escherichia coli</i> .	31
Figura 6 – Organização estrutural do sistema CRISPR/Cas.	35
Figura 7 – Representação do mecanismo de defesa do sistema CRISPR/Cas e suas etapas.	38
Figura 8 – Bacteriófagos que possuem genes <i>acr</i> podem evadir à defesa promovida pelo sistema CRISPR/Cas através da inibição de suas proteínas Cas.	44
Figura 9 – Mecanismo de ação das proteínas AcrIF1, AcrIF2 e AcrIF3.	47
Figura 10 – Mapa evidenciando a composição de espaçadores relacionados a fagos, por isolado.	60
Figura 11 – Eletroforese representativa em gel de agarose a 1% do RNA extraído dos isolados de <i>A. baumannii</i> utilizando Trizol.	62
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene <i>rpoB</i> .	63
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene <i>cas1</i> .	64
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene <i>csy1</i> .	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Funções alternativas do sistema CRISPR/Cas.	40
Tabela 2 – Nome das famílias de proteínas anti-CRISPR (Acr), organismos em que foram primariamente descritos e os tipos de sistema CRISPR/Cas inibidos.	44
Tabela 3 – Isolados clínicos utilizados para a realização do estudo, obtidos de diferentes sítios de infecção e setores de internação, em cinco hospitais da cidade do Recife/Pernambuco	48
Tabela 4 – Informações dos primers utilizados no estudo.	52
Tabela 5 – Profagos inseridos nos genomas de <i>A. baumannii</i> estudados	54
Tabela 6 – Espaçadores correspondentes a bacteriófagos	56
Tabela 7 – Bacteriófagos que apresentam correspondência a mais de um espaçador.	57
Tabela 8 – Isolados que possuem profago e espaçador correspondente ao fago, simultaneamente..	59
Tabela 9 – Temperaturas de <i>melting</i> utilizadas no estudo.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	Complexo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
Aca	Associado ao anti-CRISPR
Acr	Genes Anti-CRISPR
Cas	CRISPR-Associado
Cascade	Complexo para Defesa Antiviral CRISPR-Associado
cDNA	DNA complementar
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistente aos Carbapenêmicos
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
CrRNA	RNA CRISPR
CrRNP	Complexo ribonucleoproteico-CRISPR
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Repetição direta
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
MDR	Multidroga resistente
MLST	Tipagem de sequência multi- <i>locus</i>
MGE	Elemento genético móvel
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador
PDR	Pan-droga resistente
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa
STS	Espaçadores contra sequências próprias
T _m	Temperatura de <i>melting</i>

UTI Unidade de Terapia Intensiva

XDR Resistência extensiva às Drogas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 PERGUNTA CONDUTORA E HIPÓTESE	16
3.1 PERGUNTA CONDUTORA	16
3.2 HIPÓTESE	16
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
4.1 CARACTERÍSTICA TAXONÔMICA DE <i>Acinetobacter</i>	17
4.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
4.2.1 Infecções nosocomiais e determinantes de resistência	19
4.2.2 Epidemiologia	24
4.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO SISTEMA CRISPR/Cas	29
4.3.1 Histórico do sistema CRISPR/Cas	30
4.3.2 Estrutura do Sistema CRISPR/Cas	33
4.3.3 Funcionamento do Sistema CRISPR/Cas	36
4.3.4 Classificação do Sistema CRISPR/Cas	39
4.3.5 Funções alternativas do Sistema CRISPR/Cas	40
4.4 PROTEÍNAS ANTI-CRISPR	42
4.4.1 Descoberta e mecanismos de inativação das proteínas anti-CRISPR	42
5 OBJETIVOS	47
5.1 OBJETIVO GERAL	47
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
6 METODOLOGIA	48
6.1 AMOSTRAS DE <i>Acinetobacter baumannii</i>	48
6.2 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE PROFAGOS NOS GENOMAS DE <i>A. baumannii</i>	49
6.4 PESQUISA DA PRESENÇA DE GENES ANTI-CRISPR (<i>acr</i>) NOS GENOMAS DE <i>A. baumannii</i>	50

6.5 ANÁLISE QUALITATIVA DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>cas</i> DO SISTEMA CRISPR/Cas TIPO I-F1	50
7 ASPECTOS ÉTICOS	53
8 RESULTADOS	54
8.1 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE PROFAGOS NOS GENOMAS DE <i>A. baumannii</i>	54
8.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPAÇADORES CORRESPONDENTES A BACTERIÓFAGOS	55
8.3 PESQUISA DA PRESENÇA DE GENES ANTI-CRISPR (<i>acr</i>) NOS GENOMAS DE <i>A. baumannii</i>	60
8.4 ANÁLISE QUALITATIVA DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>cas</i> DO SISTEMA CRISPR/Cas TIPO I-F1	60
9 DISCUSSÃO	65
10 CONCLUSÃO	69
APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS PARA O SISTEMA TIPO I-F, OBTIDAS A PARTIR DO BANCO DE DADOS ACRHUB	89

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, não fermentador, que configura como um dos principais patógenos oportunistas em hospitais e outros ambientes de assistência à saúde (ANTUNES *et al.*, 2014; TACCONELI *et al.*, 2018). Essa bactéria é capaz de persistir diante de variações ambientais, e pode apresentar um perfil de multirresistência aos antimicrobianos atualmente utilizados na clínica médica. A combinação de tais características propicia seu sucesso como um emergente patógeno em unidades hospitalares (ANTUNES *et al.*, 2014), onde tende a infectar pacientes imunodeprimidos, com doenças primárias graves, com tempo prolongado de internação, submetidos à ventilação mecânica, sob antibioticoterapia de amplo espectro, entre outros fatores. Esse microrganismo pode causar quadros de pneumonia, meningite, bacteremia e infecção do trato urinário, além de ser responsável por 47% dos casos de pneumonia associada à ventilação mecânica (FOURNIER; RICHET; WEINSTEIN, 2006; REZAI *et al.*, 2017; MORRIS *et al.*, 2019). No entanto, o número de pacientes submetidos à ventilação mecânica aumentou drasticamente devido à pandemia de COVID-19 e aos sintomas pulmonares graves decorrentes da doença (GRASSELLI *et al.*, 2020). Li e colaboradores (2020) demonstraram que *A. baumannii* é responsável por 35,8% das infecções secundárias em pacientes hospitalizados com COVID-19 em Wuhan, na China. Além disso, diversos países, incluindo o Brasil, têm reportado a ocorrência de infecções secundárias por cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (SHARIFIPOUR *et al.*, 2020; GOTTESMAN *et al.*, 2021; SHINOHARA *et al.*, 2021).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma lista de 12 famílias de agentes patogênicos prioritários para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, devido à ampla resistência destes às drogas existentes até o momento. O grupo de patógenos denominado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) foi classificado como prioridade crítica, tendo *A. baumannii* como o primeiro microrganismo da lista, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; TACCONELI *et al.*, 2018).

Além do desenvolvimento de novos medicamentos, terapias alternativas têm sido consideradas, tais como: utilização de peptídeos antimicrobianos produzidos por organismos eucarióticos; anticorpos monoclonais e terapias de competição com probióticos (ASIF *et al.*, 2018). A fagoterapia, aplicação de bacteriófagos no combate a infecções bacterianas, foi um conceito que surgiu por volta de 1917, porém não foi amplamente estudado e aplicado devido ao descobrimento e sucesso dos antibióticos. A eficácia da fagoterapia atualmente tem sido estudada, e é inferida devido à sua especificidade por células bacterianas e à abundância de bacteriófagos na natureza sem qualquer relação com doenças humanas (DY *et al.*, 2014; KAKASIS; PANITSA, 2018). No entanto, é necessário conhecer os mecanismos através dos quais as bactérias se defendem de bacteriófagos. Um destes mecanismos é o Sistema CRISPR/Cas, uma maquinaria adaptativa de defesa presente em arqueias e procariotos, que permite a estes organismos protegerem-se contra a invasão de elementos genéticos móveis indesejados (SAMPSON; WEISS, 2014). Este sistema é composto por dois elementos principais: o *locus* CRISPR e genes *cas*. O CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) constitui uma família de DNA repetitivo composta por sequências repetidas, denominadas repetições diretas (21 a 48 pares de bases), separadas por sequências variáveis (26 a 72 pares de bases) nomeadas espaçadoras (JANSEN *et al.*, 2002). Esses *loci* são tipicamente flanqueados pelos genes das proteínas Cas (CRISPR-associated), os quais codificam uma variedade de proteínas com funções distintas (BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014).

A presença e estrutura do sistema CRISPR/Cas em *A. baumannii* são conhecidas, porém não são amplamente investigados. Até o momento, pelo nosso grupo de pesquisa, já foi realizada a investigação da frequência do sistema, sua estrutura, e a análise da possível origem dos espaçadores presentes nos *loci* CRISPR em isolados clínicos brasileiros de *A. baumannii*, em que foi identificado o sistema tipo I-F1 (SILVA, 2019), e *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA LUZ *et al.*, 2019, 2021). Uma das características interessantes observadas com os resultados obtidos previamente foi a observação de espaçadores contra sequências gênicas do próprio genoma da bactéria em questão. Estes resultados, bem como a ausência de estudos funcionais em *A. baumannii*, levantam questões sobre a funcionalidade como mecanismo adaptativo de defesa nesta bactéria.

A expressão do sistema CRISPR/Cas na ausência de elementos genéticos móveis favorece uma resposta rápida do hospedeiro, quando este entra em contato com tais elementos. Além disso, a ocorrência de espaçadores contra determinados bacteriófagos atua como uma memória de contatos anteriores, que confere imunidade ao hospedeiro contra esses elementos. Dessa forma, o presente trabalho propõe uma caracterização e investigação da expressão do sistema CRISPR/Cas em isolados clínicos brasileiros de *A. baumannii*. Os resultados obtidos permitirão ampliar o conhecimento sobre os diferentes mecanismos dos sistemas CRISPR/Cas utilizados por este microrganismo, auxiliando na compreensão da funcionalidade e utilização de fagos como alternativa terapêutica no tratamento de infecções.

2 JUSTIFICATIVA

Pesquisas têm revelado a importância do estudo do sistema CRISPR/Cas para inúmeras aplicações, tais como resistência bacteriana a fagos, controle da disseminação de genes via transferência horizontal, genotipagem de cepas clínicas e estudos da dinâmica populacional microbiana (HORVATH; BARRANGOU, 2010; BARROS et al 2014). Como técnica de engenharia genética, este sistema foi adaptado não apenas em microrganismos, mas também em plantas de interesse econômico (GAO *et al.*, 2015), roedores (CONG *et al.*, 2013) e humanos (MALI *et al.*, 2013).

Os resultados anteriormente obtidos pelo grupo de pesquisa levantam questões acerca do papel e funcionamento do sistema tipo I-F1 em *Acinetobacter baumannii*. Já foram descritas funções alternativas envolvendo os genes *cas* e o *locus* CRISPR, como regulação da expressão de genes de virulência (WESTRA *et al.*, 2014). A importância clínica de *A. baumannii* e a ausência de estudos funcionais com esta bactéria motivaram a idealização deste trabalho, e seus resultados permitirão conhecer os diferentes mecanismos e funções do sistema, e na utilização de fagos como alternativa terapêutica no tratamento de infecções.

3 PERGUNTA CONDUTORA E HIPÓTESE

3.1 Pergunta Condutora

Os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes hospitalizados em unidades hospitalares da cidade do Recife-PE, possuem sistema CRISPR/Cas capaz de conferir imunidade a bacteriófagos, expresso em condições padrão?

3.2 Hipótese

Os isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de pacientes hospitalizados em unidades hospitalares da cidade do Recife-PE, possuem sistema CRISPR/Cas capaz de conferir imunidade a bacteriófagos, expresso em condições padrão.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

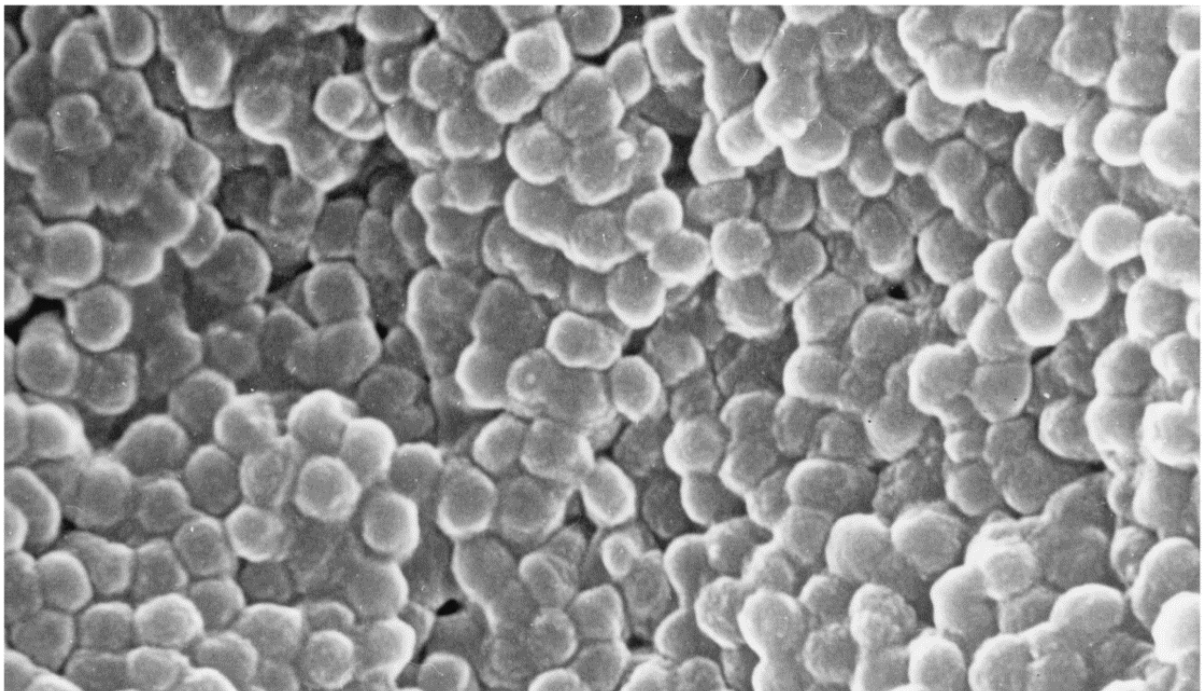
4.1 Característica taxonômica de *Acinetobacter*

Acinetobacter baumannii é o principal representante do gênero *Acinetobacter*, que constitui um grupo heterogêneo de bactérias e já passou por diversas mudanças taxonômicas desde a sua primeira descrição por Beijerinck, em 1911. O microrganismo primariamente descrito como *Micrococcus calcoaceticus* foi isolado do solo utilizando meio de cultura enriquecido com acetato de cálcio. Estudos posteriores identificaram microrganismos com características semelhantes, atribuindo-os a gêneros e espécies distintas, como *Alcaligenes haemolysans*, *Moraxella lwoffii*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus* e *Achromobacter mucosus* (BEIJERINCK, 1911; PELEG; SEIFERT; PATTERSON, 2008). O gênero *Acinetobacter* só foi proposto em 1954, por Brisou e Prevot, com o objetivo de diferenciar e agrupar os microrganismos imóveis que compunham o gênero *Achromobacter*. No entanto, foi amplamente aceito apenas após a publicação de um estudo conduzido por Baumann, em 1968, no qual foi possível concluir que microrganismos descritos previamente como integrantes de gêneros e espécies diferentes faziam parte de um mesmo gênero e não poderiam ser subclassificados de acordo com suas características fenotípicas (BRISOU; PREVOT, 1954; BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968). Dessa forma, o gênero *Acinetobacter* foi reconhecido oficialmente pelo *Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria* (Subcomitê de Taxonomia de *Moraxella* e Bactérias Afins) e incluído na família *Neisseriaceae*, devido à sua semelhança com *Moraxella* e *Neisseria*, em 1971 (LESSEL, 1971). Na edição de 1974 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey) o gênero foi listado com uma única espécie (*Acinetobacter calcoaceticus*), porém, a *Approved List of Bacterial Names* (Lista Aprovada de Nomenclatura Bacteriana) divulgada em 1980 contava com mais uma espécie, *Acinetobacter lwoffii* (BERGEY *et al.*, 1974; SNEATH; MCGOWAN; SKERMAN, 1980). Posteriormente, a utilização das técnicas de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA possibilitaram a inclusão de espécies como *Acinetobacter baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* e *A. radioresistens* ao gênero, bem como a criação de uma nova família (*Moraxellaceae*), na qual o

gênero *Acinetobacter* foi incluído (BOUVET; GRIMONT, 1986; NISHIMURA; INO; IIZUKA, 1988; BOUVET; JEANJEAN, 1989; ROSSAU *et al.*, 1991; TJERNBERG; URSING, 2007).

Atualmente, o gênero *Acinetobacter* pertence à ordem *Gammaproteobacteria* e agrupa cocobacilos Gram negativos, não fastidiosos, não fermentativos, catalase positivos, oxidase negativos e estritamente aeróbicos. São encontrados, geralmente, em formações diploides, podendo associar-se em cadeias (Figura 1) (PELEG; SEIFERT; PATTERSON, 2008). Além de testes fenotípicos preliminares, o uso de métodos moleculares, como AFLP, MALDI-TOF MS e PCR permitiram a identificação de microrganismos e caracterização de mais de 60 espécies incluídas ao gênero, de acordo com a *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (Lista de Nomes de Procariotos com Nomenclatura Permanente) (disponível em <http://www.bacterio.net/Acinetobacter.html>). Parte das espécies descritas foram isoladas a partir do solo, água e outras amostras ambientais (JANSSEN *et al.*, 1997; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013; SOUSA *et al.*, 2014; KULKARNI *et al.*, 2017; PARTE, 2018).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Cocobacilos associados em pares ou agrupados. Magnificação final x18,000.



Fonte: Bergogne-Bérézin & Towner, 1996.

Entre as espécies de *Acinetobacter*, podem ser identificadas quatro (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* e *A. pittii*) que são altamente relacionadas e não podem ser diferenciadas a partir de suas características fenotípicas, sendo, portanto, agrupadas no complexo denominado *A. calcoaceticus-A. baumannii* (ACB). Com exceção do *A. calcoaceticus*, um microrganismo ambiental que pode ser obtido a partir de amostras de água e solo, o complexo ACB representa as espécies mais relevantes clinicamente. As demais componentes do complexo são responsáveis por 90-95% das infecções clinicamente significativas, podendo ser isoladas dos focos de infecção em humanos (GERNER-SMIDT; TJERNBERG; URSING, 1991; BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATTERSON, 2008).

Embora os membros do gênero *Acinetobacter* sejam tipicamente saprófitos de vida livre e obtidos a partir de amostras de solo e água, algumas espécies podem ser encontradas em produtos alimentícios, como leite e derivados e vegetais. Também fazem parte da microbiota de mucosas, do trato respiratório e da pele de humanos, sendo encontradas principalmente em regiões mais úmidas, como axilas (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; TOWNER *et al.*, 2006). Um estudo conduzido em 1997 evidenciou a presença de *Acinetobacter* spp. em diferentes regiões do corpo de indivíduos saudáveis, como nariz, traqueia, garganta e ouvido (SEIFERT *et al.*, 1997). *Acinetobacter* spp. possui características de resistência às variações ambientais, o que propicia sua permanência por longos períodos de tempo em superfícies inorgânicas. Devido a tais habilidades, equipamentos médicos colonizados podem servir como reservatórios de *Acinetobacter* spp. em hospitais (BEGGS *et al.*, 2006; PELEG; SEIFERT; PATTERSON, 2008; ALMASAUDI, 2018).

4.2 ACINETOBACTER BAUMANNII

4.2.1 Infecções nosocomiais e determinantes de resistência

Acinetobacter baumannii é capaz de permanecer em superfícies inorgânicas por longos períodos de tempo. Essas características contribuem para o seu sucesso

como patógeno emergente causador de infecções nosocomiais, propiciando a colonização de enfermarias e UTIs. Sua presença pode ser identificada, principalmente durante surtos hospitalares, em amostras coletadas do ambiente, em equipamentos médicos e não-médicos (cortinas, teclados de computadores, maçanetas), e na pele de pacientes colonizados (que não desenvolveram infecção). A disseminação da bactéria pode se dar através de gotículas e aerossóis, porém estudos anteriores evidenciam que as mãos dos funcionários dos hospitais representam o principal meio de contaminação (JAWAD *et al.*, 1998; VAN DEN BROEK *et al.*, 2006; WILKS *et al.*, 2006; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013). Além disso, seu perfil de multirresistência às drogas utilizadas na clínica e a resistência à desinfecção também são fatores que favorecem a permanência de cepas de *A. baumannii* em ambientes hospitalares, que se tornam reservatórios da bactéria (GARNACHO-MONTERO; TIMSIT, 2019; MORRIS *et al.*, 2019).

Pacientes imunosuprimidos, com doenças de base graves, que passaram por procedimentos invasivos ou que foram submetidos à antibioticoterapia de amplo-espectro são os mais acometidos pelas infecções causadas por *A. baumannii*. Dessa forma, podem ser mais frequentemente identificadas em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), provocando, principalmente, pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário e bacteremia (PELEG; SEIFERT; PATTERSON, 2008; MORRIS *et al.*, 2019). A ocorrência de infecções por cepas de *A. baumannii* MDR secundárias à COVID-19 tem sido reportada em hospitais de diferentes países, incluindo o Brasil (SHARIFIPOUR *et al.*, 2020; GOTTESMAN *et al.*, 2021; SHINOHARA *et al.*, 2021). Esse microrganismo já era responsável por 47% dos casos de pneumonia associada à ventilação mecânica em UTIs (REZAI *et al.*, 2017), no entanto, devido à pandemia de COVID-19, a utilização de ventilação mecânica para os pacientes com sintomas pulmonares graves aumentou drasticamente (GRASSELLI *et al.*, 2020). Em 2013, a estimativa de incidência global de infecções por *A. baumannii* era de, aproximadamente, um milhão de casos por ano, sendo 50% resistente aos carbapenêmicos (SPELLBERG; REX, 2013).

Embora conhecido como um emergente patógeno hospitalar, *A. baumannii* tem sido descrito como agente etiológico de infecções comunitárias, como meningite, infecções de pele e tecidos moles, endocardite valvar nativa e

pneumonia. Pacientes que adquirem infecções comunitárias geralmente possuem comorbidades, como doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal ou diabetes mellitus, ou estão associados ao fumo ou consumo de álcool em excesso (GRADON; CHAPNICK; LUTWICK, 1992; CHANG *et al.*, 2000; CHIANG *et al.*, 2003; FALAGAS *et al.*, 2007). Dentre essas infecções, destaca-se uma forma severa de pneumonia adquirida na comunidade, em regiões tropicais. A doença apresenta um curso fulminante, caracterizado por um início agudo com febre e sintomas respiratórios severos, podendo progredir rapidamente para a falência respiratória e choque. Sua ocorrência é mais frequente em pacientes alcoólatras, com taxa de mortalidade variando entre 40-64% (CHEN *et al.*, 2001; LEUNG *et al.*, 2006; DEXTER *et al.*, 2015).

O gênero *Acinetobacter* apresenta um desenvolvimento extremamente rápido de resistência aos antimicrobianos, provavelmente relacionado com a sua exposição a ambientes como o solo e a água. Esses ambientes possuem diversos microrganismos produtores de antimicrobianos e representam amplos reservatórios de genes de resistência (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; BONOMO; SZABO, 2006; D’COSTA *et al.*, 2006). A rápida obtenção de determinantes de resistência a várias classes de antimicrobianos fez com que o surgimento de cepas Multidroga Resistentes (MDR) (que possuem resistência a, pelo menos, três classes de antimicrobianos) aumentasse progressivamente desde o início da década de 70. Drogas como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolonas e tetraciclina foram descartadas para o tratamento, fazendo com que carbapenêmicos se tornassem a alternativa terapêutica de escolha, devido à sua eficácia e baixa toxicidade (CAI *et al.*, 2012; EVANS; HAMOUDA; AMYES, 2013). Estudos conduzidos no período de 2002-2004 destacaram os carbapenêmicos imipenem e meropenem como os antimicrobianos mais ativos no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, em relação a outros agentes que possuíam atividade limitada (UNAL; GARCIA-RODRIGUEZ, 2005). Entretanto, surtos de infecções por cepas resistentes aos carbapenêmicos foram reportadas ao redor do mundo (Figura 2) (DEL MAR TOMAS *et al.*, 2005; LOLANS *et al.*, 2006; DALLA-COSTA *et al.*, 2013).

Figura 2 - Países que reportaram a ocorrência de surtos de infecção por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Em vermelho, estão destacados países que reportaram surtos antes de 2006. Em amarelo, países que reportaram surtos desde 2006.



Fonte: Peleg *et al.*, 2008.

Com o desenvolvimento da resistência aos carbapenêmicos, polimixinas e tigeciclina tornaram-se os últimos agentes de escolha para o tratamento de infecções por cepas com Resistência Extensiva às drogas (XDR) (cepas MDR com resistência adicional aos carbapenêmicos) (MANCHADA; SINHA; SINGH, 2010; ISLER *et al.*, 2019). Estudos evidenciam o surgimento da resistência à colistina, provavelmente relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso prévio do antimicrobiano, ou sua pró-droga, o metassulfonato de colistina (LESHO *et al.*, 2013; NAPIER *et al.*, 2013; QURESHI *et al.*, 2015). Embora a tigeciclina tenha sido considerada como um agente de sucesso contra *A. baumannii*, a ocorrência de cepas resistentes a essa droga começou a ser relatada pouco anos depois do início de seu uso no tratamento de tais infecções (NAVON-VENEZIA; LEAVITT; CARMELI, 2007; REID *et al.*, 2007; GALLAGHER; ROUSE, 2008; BOUCHER *et al.*, 2009; DOI *et al.*, 2009). A minociclina é um antimicrobiano da classe das tetraciclinas e tem sido testada como uma alternativa terapêutica, pois é capaz de superar os

mecanismos de resistência contra outros agentes da mesma classe, como a tigeciclina (LASHINSKY *et al.*, 2017; FRAGKOU *et al.*, 2019; TARAZI *et al.*, 2019).

Classificados como microrganismos naturalmente competentes (capazes de realizar absorção ativa de DNA livre e incorporação da sua informação genética), os membros do gênero *Acinetobacter* são extremamente adequados para troca genética. Para *A. baumannii*, existem poucos relatos de cepas naturalmente competentes e essa habilidade ainda não foi bem elucidada. Porém, sabe-se que a interação com elementos genéticos móveis é uma das formas de obtenção de determinantes de resistência (HARDING *et al.*, 2013; WILHARM *et al.*, 2013; ALMASAUDI, 2018).

Diferente de outros microrganismos, *A. baumannii* não apresenta nenhuma toxina ou determinante molecular que se destaque como responsável pelo potencial de virulência de alguma cepa. Pelo contrário, é a sua capacidade de resistir a condições desfavoráveis e se adaptar ao ambiente hospitalar que propicia o seu sucesso (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A resistência à dissecação (habilidade de manter-se viável em ambientes secos) para essa espécie é multifatorial, mas ainda não foi bem elucidado. No entanto, é possível que essa característica esteja relacionada à composição da membrana externa da bactéria e à sua cápsula polissacarídica (BOLL *et al.*, 2015; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A proteína RecA, uma das enzimas necessárias para os processos de recombinação homóloga e reparo por recombinação, possui um papel protetor para prevenir danos ao DNA durante os períodos de dissecação e reidratação. Um estudo conduzido em 2013 evidenciou o aumento da frequência de mutações e o surgimento espontâneo de resistência à rifampicina, após um ciclo de dissecação e reidratação. Com esses achados, supõe-se que a resistência à dissecação também desempenhe um papel importante no desenvolvimento de cepas MDR (ARANDA *et al.*, 2011; NORTON; SPILKIA; GODOY, 2013; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Em relação à resistência aos desinfetantes comumente utilizados em ambientes hospitalares, como clorexidina e etanol, já foi demonstrado que a exposição ao etanol promove o crescimento e a virulência de *A. baumannii* e a sua competência em lançar a clorexidina para fora da célula através da proteína de efluxo de clorexidina de *Acinetobacter* (Acel). O papel do etanol no crescimento dessa bactéria é o que torna

o consumo excessivo de álcool um fator de risco para as infecções comunitárias (SMITH; DES ETAGES; SNYDER, 2004; CAMARENA *et al.*, 2010; NWUGO *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2013; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Os biofilmes bacterianos são comunidades celulares envolvidas em matriz extracelular, que contribuem para a colonização de equipamentos médicos, promovendo a ocorrência de infecções a partir desses objetos. *A. baumannii* forma biofilmes robustos em infecções de pele e tecidos moles, tanto nas feridas quanto nos curativos, e em superfícies inorgânicas, como tubos endotraqueais, vidro e aço inoxidável. A cápsula polissacarídica auxilia na formação e manutenção do biofilme, que também atua sobre a comunidade celular na proteção contra os agentes estressantes, como desinfetantes (THOMPSON *et al.*, 2014; GREENE *et al.*, 2016a; GREENE *et al.*, 2016b; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Outro fator também relacionado à patogenicidade e virulência é a motilidade das células bacterianas. Apesar de ser considerado um microrganismo imóvel, já foi descrito na literatura a ocorrência de motilidade do tipo *twitching* em *A. baumannii*. Em 2013, um modelo de infecção desenvolvido por Eijkelkamp e colaboradores mostrou que a hipermotilidade estava associada ao aumento de virulência e, em 2017, Pérez-Varela e colaboradores desenvolveram um estudo utilizando mutantes com motilidade comprometida e observaram a expressão de um fenótipo atenuado (EIJKELKAMP *et al.*, 2013; PÉREZ-VARELA *et al.*, 2017). Outro tipo de motilidade também vista em *A. baumannii* é a motilidade associada à superfície. No entanto, esse tipo depende da participação de flagelos e *A. baumannii* não é capaz de produzir flagelos. Por isso, acredita-se que a motilidade do tipo *twitching* também seja responsável pela motilidade associada à superfície (HENRICHSEN, 1984; CLEMMER; BONOMO; RATHER, 2011; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

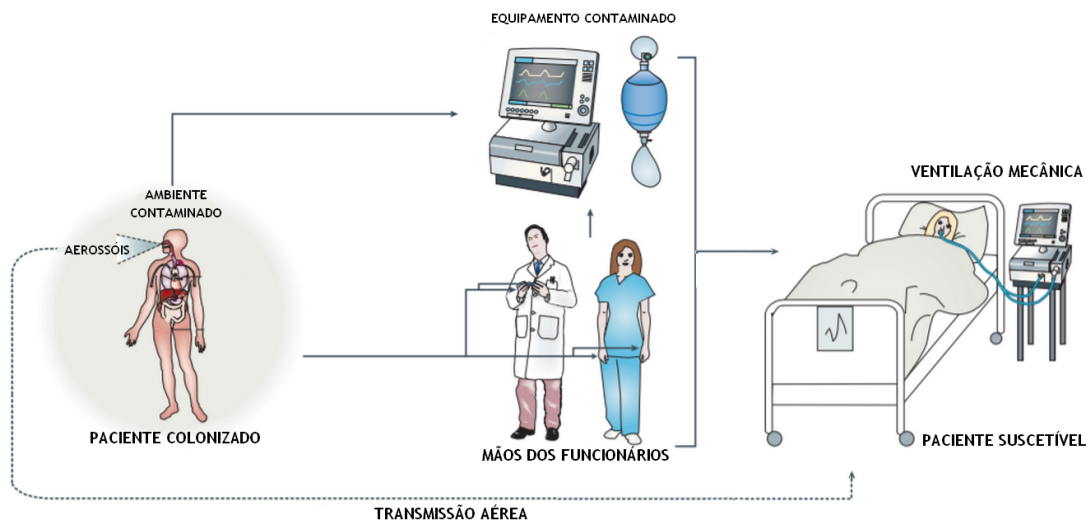
Levando em consideração o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos e outros índices como mortalidade, transmissibilidade e tratabilidade, essa espécie foi classificada pela OMS como agente patogênico de prioridade crítica para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (SHLAES; BRADFORD, 2018; TACCONELLI *et al.*, 2018, OMS, 217).

4.2.2 Epidemiologia

Embora outras espécies do gênero *Acinetobacter* possam ser isoladas do solo e da água, sua prevalência no ambiente é baixa e a maior ocorrência para *A. baumannii* é relatada em ambientes hospitalares, principalmente em UTIs. Pacientes colonizados (aqueles que não apresentam sintomatologia ou infecção ativa) ou infectados tornam-se reservatórios para a infecção e representam um grande problema, visto que a principal forma de transmissão ocorre através do contato direto e pelas mãos dos funcionários dos hospitais. Outra forma de transmissão desse microrganismo é através do ar, podendo ser isolada em uma distância de mais de quatro metros de pacientes com colonização nas vias aéreas (LORTHOLARY *et al.*, 1998; WAGENVOORT *et al.*, 2002; EL SHAFIE; ALISHAQ; GARCIA, 2004; MUNOZ-PRICE; WEINSTEIN, 2008; GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010; ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014).

A ocorrência de cepas MDR epidêmicas e endêmicas em hospitais são as manifestações mais preocupantes de *A. baumannii*. O padrão de ocorrência de surtos pode variar a depender de características locais e da cepa em questão, visto que existem algumas cepas que possuem uma maior tendência à disseminação epidêmica em relação a outras. Uma cepa epidêmica é, geralmente, introduzida no contexto hospitalar através da admissão de pacientes colonizados (Figura 3) (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007).

Figura 3 - Visão geral da dinâmica entre *Acinetobacter baumannii* epidêmica, pacientes e ambiente hospitalar. A forma mais comum de entrada em uma enfermaria acontece através de pacientes colonizados, podendo ocorrer também por materiais contaminados (como travesseiros). A partir da enfermaria, *A. baumannii* pode se propagar para o ambiente e para pacientes suscetíveis. O ambiente contaminado torna-se um reservatório e o paciente suscetível pode ser contaminado de diversos modos.



Fonte: adaptado de Dijkshoorn; Nemec; Seifert, 2007.

Uma das características mais importantes dessa espécie é a sua capacidade de provocar surtos de infecções nosocomiais, devido à sua resistência às condições ambientais e aos antimicrobianos. Desde o fim dos anos 1980, a importância clínica de *A. baumannii* aumentou drasticamente devido à ocorrência de surtos em hospitais da Inglaterra, França, Alemanha, Itália, Espanha e Holanda (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003; FOURNIER; RICHT; WEINSTEIN, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Estudos desenvolvidos em ambientes hospitalares durante os períodos de surtos de infecção descreveram a coexistência de múltiplos clones em um mesmo hospital, com a predominância de um ou dois clones (HSUEH, 2002; FERNÁNDEZ-CUENCA, 2004; ABBO *et al.*, 2005; MONTEERRUBIO-VILAR *et al.*, 2009; GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010; ALVES, 2019; ARAÚJO LIMA *et al.*, 2020). A transferência de pacientes infectados ou colonizados para outras unidades hospitalares é um fator de impacto para a transferência interinstitucional e até mesmo internacional. Schulte e colaboradores evidenciaram, em 2005, a transmissão clonal de cepas resistentes à meropenem da Grécia para a Alemanha.

No ano seguinte, Bogaerts e colaboradores registraram a primeira ocorrência de cepas *A. baumannii* produtoras de um tipo de carbapenemases de classe D, a OXA-58. Isolados produtores de OXA-58 já foram reportados em diversos países, o que sugere sua extensa disseminação. Bogaerts também reportou, em 2006, a primeira transferência internacional das cepas *A. baumannii* produtoras de OXA-58, da Grécia para a Bélgica (RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2004; SCHULTE *et al.*, 2005; BOGAERTS *et al.*, 2006; LEVY-BLITCHTEIN *et al.*, 2018). Em 2017, De Sá Cavalcanti e colaboradores encontraram 31 isolados de *A. baumannii* OXA253, um tipo de carbapenemases de classe D, na cidade do Recife/PE. Essas cepas foram consideradas resistentes a dois carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Até o momento, houve descrição deste gene no Brasil (uma única cepa em Belo Horizonte) e na Itália (DE SÁ CAVALCANTI *et al.*, 2017).

A expansão global de poucas linhagens epidêmicas, ou Clones Internacionais (CI), é responsável pelo sucesso da disseminação global de *A. baumannii*. Esses clones representam cepas que resistiram às condições do ambiente hospitalar e foram evoluindo ao longo da sua expansão. Embora a susceptibilidade aos antimicrobianos possa variar entre os clones, seus descendentes geralmente possuem alta resistência às drogas utilizadas na clínica. Três clones internacionais, também chamados de clones Europeus I, II e III, já foram bem estudados e definidos como a causa de surtos de infecções nosocomiais ao redor do mundo (DIKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2010).

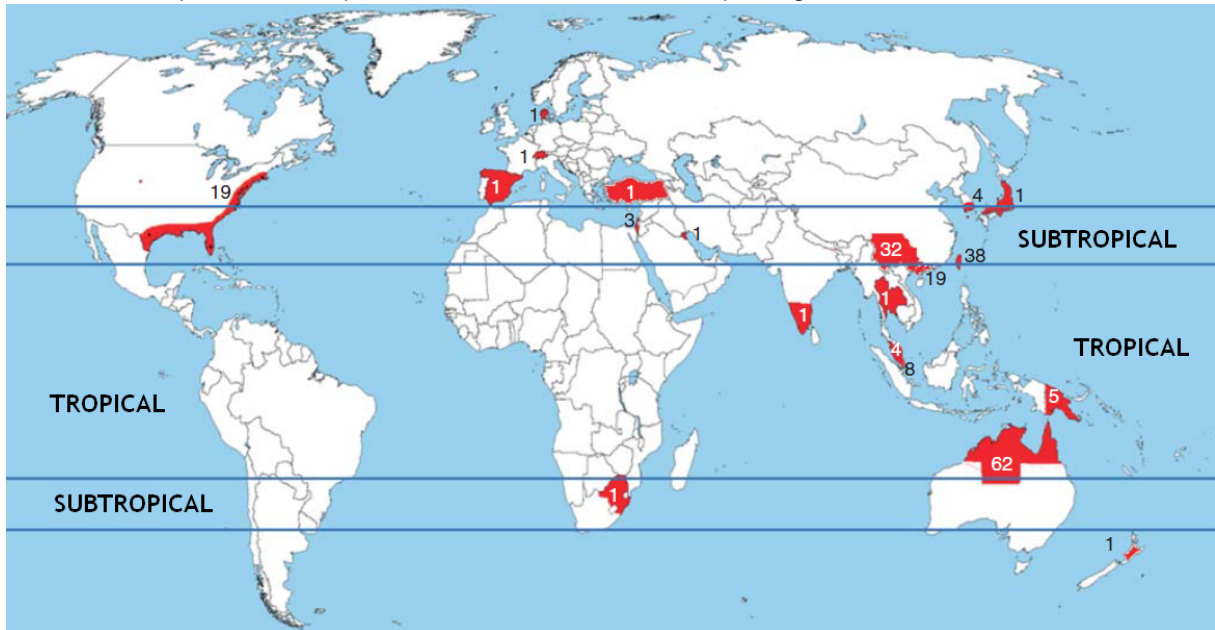
No Brasil, as cepas de *Acinetobacter baumannii* Resistentes aos Carbapenêmicos (*Carpenem Resistant-Acinetobacter baumannii* – CRAB) já são consideradas hiperendêmicas, com predominância dos Complexos Clonais (CC) CC1/IC1, CC15/IC14, CC25/IC7 e CC79/IC5 (ROSSI, 2011; MEDEIROS; LINCOPAN, 2013; FORTALEZA *et al.*, 2017). Em 2020, Camargo e colaboradores demonstraram a presença de diversas resistências associadas às CRABs, caracterizando cepas XDR. A minociclina foi a droga mais ativa contra tais linhagens, no entanto, o mesmo estudo ainda descreve a ocorrência de uma cepa Pan-droga Resistente (PDR), pertencente ao ST 15, resistente à minociclina (CAMARGO *et al.*, 2020).

Na América Latina, os índices de resistência à imipenem, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima e piperacilina-tazobactam estão entre os maiores de todo o mundo. Um estudo conduzido em 2004 demonstrou que a Argentina apresentava os maiores índices no período de 1997-2001, quando comparados com os do Brasil, Colômbia e Chile. Países da América Latina já registraram a ocorrência de cepas produtoras de diversas carbapenemases, como IMP-1 e OXA-23 (TOGNIM *et al.*, 2004; UNAL; GARCIA-RODRIGUEZ, 2005; TOGNIM *et al.*, 2006; DALLA-COSTA *et al.*, 2013).

Combinações de antimicrobianos são utilizadas nos tratamentos de infecções por *A. baumannii* para reduzir o risco de resistências e melhorar o prognóstico do paciente, além de proporcionar uma melhor cobertura, quando ainda não se tem conhecimento acerca da susceptibilidade da cepa infectante (FISHBAIN; PELEG, 2010). Por exemplo, as taxas de mortalidade são menores em pacientes submetidos à terapia de associação de polimixina B a outro agente antimicrobiano (imipenem, meropenem, rifampicina, ampicilina-sulbactam, entre outros), do que em tratamentos utilizando apenas a polimixina B (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2013).

No caso das infecções comunitárias, a maioria dos casos é originária de países com clima tropical ou subtropical (Figura 4), como Tailândia, China e Taiwan, e durante períodos mais úmidos ao longo do ano. Os casos reportados em países com clima temperado ocorreram durante meses mais quentes e em pacientes que possuíam fatores de risco, como o consumo excessivo de álcool ou doença pulmonar crônica. Os isolados de ocorrência comunitária apresentam-se mais susceptíveis aos antimicrobianos e não aparentam estar relacionados com cepas de ocorrência nosocomial. Esses isolados comunitários são multiclonaes e não possuem fatores de virulência diferenciais, sugerindo que o quadro agressivo provocado esteja mais relacionado à presença de fatores de risco nos pacientes acometidos. São poucos os casos de infecção comunitária em pacientes que não apresentem pelo menos um fator de risco (PENG; ZONG; FAN, 2012; FARRUGIA *et al.*, 2013; ZEANA *et al.*, 2013; DEXTER *et al.*, 2015; MEUMANN *et al.*, 2019).

Figura 4 – Regiões que registraram casos de infecções comunitárias por *Acinetobacter baumannii*. Os números representam a quantidade de casos notificados por região.



Fonte: adaptado de Dexter *et al.*, 2015.

Surtos de infecção por *A. baumannii* MDR como complicação de traumas de combate em pacientes militares foram descritos na guerra do Vietnã e no Oriente Médio, bem como em 2004, acometendo vítimas de um tsunami no Sudeste da Ásia. No entanto, a fonte de contaminação ainda não foi definida entre a microbiota individual, o ambiente ou as unidades hospitalares (MAEGELE *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2006; SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008; MEUMANN *et al.*, 2019).

4.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO SISTEMA CRISPR/Cas

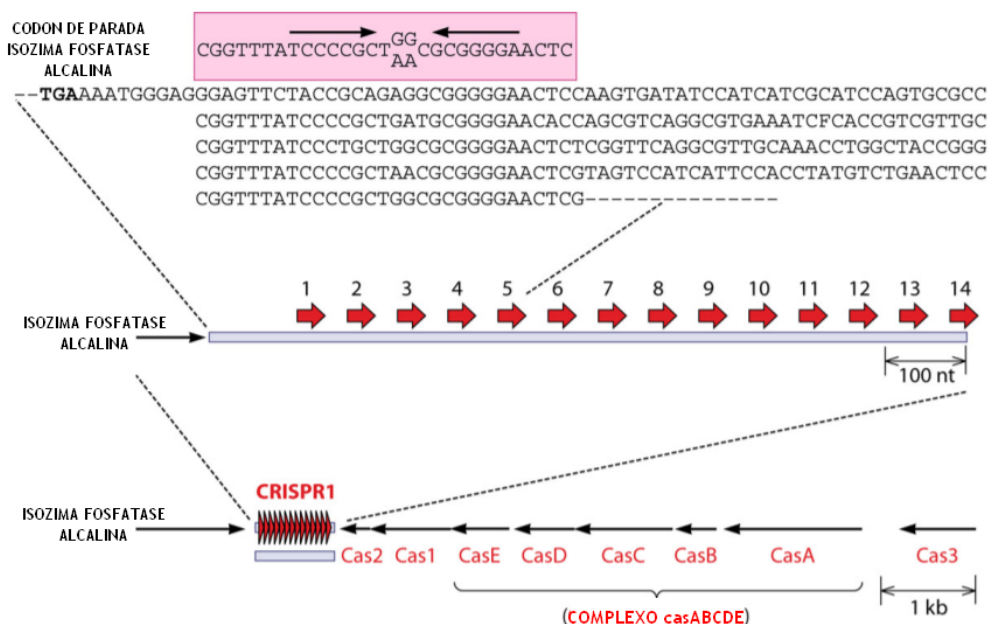
Os procaríotes, por habitarem diversos ambientes naturais, encontram-se expostos a várias condições que interferem na sua capacidade de sobrevivência. Dentre essas condições, destacam-se os contatos com elementos genéticos móveis (*mobile genetic elements* ou MGE), como bacteriófagos, plasmídeos e transposons. Os MGEs podem fornecer genes de virulência, resistência, entre outros, mas também podem ocasionar a lise da célula hospedeira. Por esse motivo, os microrganismos dispõem de alguns mecanismos de defesa contra infecção viral e a

exposição a materiais genéticos invasores, como o bloqueio de ligação do fago e o sistema CRISPR/Cas.

4.3.1 Histórico do sistema CRISPR/Cas

A descoberta do *locus* CRISPR em bactérias ocorreu em 1987, quando Ishino e colaboradores estudavam a sequência do gene codificante para uma isozima fosfatase alcalina responsável pela conversão da aminopeptidase em *Escherichia coli*. Eles identificaram uma região de repetições à jusante do *codon* de parada do gene de interesse (Figura 5), composta por 14 repetições de sequências idênticas com 29 nucleotídeos, intercaladas por sequências distintas contendo 32 nucleotídeos (ISHINO *et al.*, 1987; ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018). A ocorrência de regiões repetitivas intercaladas por regiões variáveis em cepas de *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* e *Mycobacterium tuberculosis* foi descrita nos anos seguintes (NAKATA; AMEMURA; MAKINO, 1989; HERMANS *et al.*, 1991; HAN; SHE, 2017).

Figura 5 – O primeiro CRISPR descrito na literatura, encontrando em *Escherichia coli*. Durante a análise do gene para a isozima fosfatase alcalina, uma sequência repetitiva com alto nível de organização foi encontrada à jusante do codon de parada. A sequência conservada apresentava 14 repetições e os genes *cas* foram encontrados também à jusante.



Fonte: adaptado de Ishino, Krupovic e Forterre, 2018.

Já em 1995, Mojica e colaboradores investigavam a influência da salinidade no crescimento de *Haloferox mediterranei*, uma espécie de arquea isolada da costa da Espanha, quando encontraram regiões repetitivas compostas por sequências repetidas em *tandem*, intercaladas por sequências distintas. Essas foram as primeiras descrições do CRISPR em arqueas. No momento do estudo, a hipótese levantada foi de que a atuação do CRISPR estava relacionada com a separação de replicons (MOJICA *et al.*, 1995; HAN; SHE, 2017). Estudos acerca do genoma de espécies de arquea do gênero *Sulfolobus* revelaram a ocorrência de três *loci* CRISPR com mais de 90 repetições em *S. solfataricus* e em plasmídeos conjugativos do gênero, como o pNOB8. Interessantemente, a sequência das repetições em um dos *loci* CRISPR de *S. solfataricus* correspondia àquela que estava presente no plasmídeo. Com o auxílio de estudos genômicos, foi visto que essa estrutura é largamente distribuída entre procariotos, porém não é encontrada em eucariotos e vírus. Atualmente estima-se que cerca de 40% das bactérias e 90% das arqueas possuam o *locus* CRISPR (CHARLEBOIS *et al.*, 1998; SHE *et al.*, 1998; JANSEN *et al.*, 2002; HAN; SHE, 2017).

Embora tenha sido descrito muitas vezes a partir da primeira descoberta, o acrônimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) só foi proposto em 2002 por Jansen e colaboradores. Até então, sua nomenclatura representava um problema, visto que cada pesquisador utilizava uma denominação diferente para essa região, como Repetições Curtas Espaçadas Regularmente (*Short Regularly Spaced Repeats* ou SRSRs) e Clusters Largos de Sequências com 20 Nucleotídeos Repetidas em Tandem (*Large Clusters of 20-nt Tandem Repeat Sequences* ou LCTR). Por descrever mais claramente do que se trata a estrutura, o acrônimo CRISPR foi adotado pela comunidade acadêmica (MOJICA *et al.*, 2000; SHE *et al.*, 2001; JANSEN *et al.*, 2002).

Jansen e colaboradores, em 2002, também descreveram em detalhes a estrutura dos *loci* CRISPR encontrados, auxiliando no entendimento de seu funcionamento. Foi observado que as sequências das repetições diretas não apresentavam similaridade na maioria dos casos, exceto para espécies de um mesmo gênero, sugerindo que a homologia estaria presente apenas entre espécies bacterianas altamente relacionadas. Também descreveram que as repetições diretas de um mesmo *locus* apresentavam divergências de, no máximo, três nucleotídeos e

que as sequências intercalantes ou espaçadores geralmente possuíam apenas uma cópia dentro de um *locus*. Já as sequências não codificantes que flanqueiam os *loci*, foram denominadas sequência líder e são ricas em AT, compartilhando cerca de 80% de similaridade entre espécies relacionadas (MOJICA *et al.*, 2000; JANSEN *et al.*, 2002).

Através de análises comparativas entre os genomas de bactérias e arqueas, foi identificada a associação dos *loci* CRISPR um grupo de genes conservados em organismos que possuem o CRISPR e ausentes naqueles que não apresentam essa estrutura. Esses genes foram denominados genes *cas* (CRISPR-associated ou associados ao CRISPR). Quatro genes *cas* (*cas1-cas4*) haviam sido identificados bem próximos aos *loci*, mas posteriormente foram descritas mais de 50 famílias de proteínas Cas e sua associação com diferentes tipos de CRISPR. As proteínas Cas1 e Cas2 não apresentavam nenhuma similaridade com domínios funcionais de outras proteínas já conhecidas na época, embora a Cas3 apresentasse sete motivos característicos da superfamília de helicases 2 e a Cas4 estivesse relacionada com a exonuclease RecB. Dessa forma, supunha-se que as proteínas Cas3 e Cas4 estivessem envolvidas com reparo, recombinação e regulação transcricional da molécula de DNA. Esses achados também sugeriam que as proteínas Cas3 e Cas4 participassem na geração dos *loci* CRISPR (JANSEN *et al.*, 2002; MAKAROVA *et al.*, 2002; HAFT *et al.*, 2005; MAKAROVA *et al.*, 2006).

A presença de *loci* CRISPR maiores em organismos resistentes a altas temperaturas, como as arqueas termofílicas e bactérias hipertermofílicas, fez com que pesquisadores acreditassem no seu envolvimento com a adaptação a ambientes com temperatura extremas. No entanto, a função do CRISPR só começou a ser bem compreendida quando dois grupos independentes identificaram a homologia das sequências espaçadoras com regiões presentes nos genomas de bacteriófagos e plasmídeos, que não infectavam organismos detentores de CRISPR. Os *loci* CRISPR foram tidos como sequências que promoviam um sistema de defesa para os organismos, atuando de forma semelhante ao RNA de interferência (RNAi), sintetizado por eucariotos. Sugeria-se que o CRISPR era capaz de adquirir porções dos genomas invasores, inserindo-as ao “início” do *locus* para montar uma memória de contatos anteriores com tais invasores e que os *loci* poderiam ser transcritos na

forma de um RNA *antisense* (BOLOTIN *et al.*, 2005; MOJICA *et al.*, 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005).

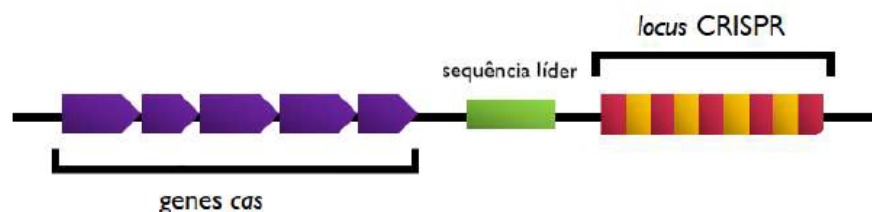
A capacidade de armazenar a memória do encontro com materiais genéticos invasores assemelha-se ao sistema imune de vertebrados, com a diferença de que o CRISPR pode ser herdado por células-filhas. Makarova e colaboradores, em 2006, sugeriam que o CRISPR surgiu em organismos ancestrais dos quais derivaram as arqueas e que esse sistema foi distribuído para bactérias através da transferência horizontal de genes (MAKAROVA *et al.*, 2006). Estudos posteriores confirmaram a hipótese da atuação do CRISPR como um sistema imune de procariotos, através da utilização de bacteriófagos e plasmídeos em contato com os organismos detentores do sistema. A presença de sequências similares a porções do genoma de bacteriófagos fazia com que a célula se tornasse imune à infecção por esse fago e quando a sequência protoespaçadora era deletada do fago, a célula voltava a ser sensível. Já os espaçadores correspondentes às sequências presentes em plasmídeos conferiam um bloqueio da transformação de tais plasmídeos. Em 2008, reconstrução do primeiro sistema CRISPR/Cas descrito, encontrado em *E. coli* em 1987, tornou possível evidenciar que o transcrito produzido a partir do *locus* CRISPR interagia diretamente com as proteínas Cas para realizarem a sua função. O complexo Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense ou complexo associado ao CRISPR para defesa antiviral) foi identificado em *E. coli*, formado por cinco proteínas Cas que receberam nomes específicos para a espécie em que haviam sido encontradas (Cse1, Cse2, Cse4, Cas5e e Cse3). Sua função estava relacionada à maturação do RNA obtido a partir da transcrição do *locus* ou pré-RNA CRISPR (crRNA). Já o crRNA maduro ligado ao complexo Cascade, atuava como um guia para o mecanismo de defesa contra os invasores. Ainda em 2008, foi levantada a hipótese da utilização do CRISPR como uma ferramenta de importância para a edição gênica (BARRAGOU *et al.*, 2007; BROUNS *et al.*, 2008; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2008).

Com o passar dos anos, diversas análises foram realizadas para auxiliar na caracterização e aplicações dos *loci* CRISPR e das proteínas Cas, bem como para elucidar sua estrutura e funções associadas.

4.3.2 Estrutura do sistema CRISPR/Cas

O *locus* CRISPR corresponde a um sistema imune adaptativo de procaríotos, composto por uma família de DNA repetitivo formada por sequências chamadas repetições diretas (*direct repetitions* ou DRs), intercaladas por sequências variáveis, denominadas espaçadores. Esse tipo de mecanismo de defesa é capaz de gerar e armazenar memórias dos encontros anteriores, da célula ou de seus antecessores, com os materiais genéticos invasores. Nas proximidades dos *loci* CRISPR, encontramos os genes *cas* que codificam para diversas proteínas com funções diferentes, estando diretamente relacionadas com o mecanismo de defesa do CRISPR. Embora estáveis dentro de um mesmo *locus*, os elementos associados ao sistema (Figura 6) podem apresentar grandes variações entre diferentes genomas, acerca da sua ocorrência, sequência, organização gênica, número e tamanho (JANSEN *et al.*, 2002; HAFT *et al.*, 2005; MAKAROVA *et al.*, 2011; SAMPSON; WEISS, 2014).

Figura 6 – Organização estrutural do sistema CRISPR/Cas. O *locus* CRISPR é formado por repetições diretas, destacadas em rosa, que encontram-se intercaladas por sequências variáveis ou espaçadores, em amarelo. Os *loci* são flanqueados por uma estrutura conhecida como sequência líder, representada em verde, que atua como um promotor da transcrição dessa região. Além disso, também é possível encontrar a associação do CRISPR com os genes *cas*, representados pelas setas roxas, que codificam para uma variedade de proteínas Cas, envolvidas em diversas etapas do funcionamento do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: acervo pessoal (2018).

As repetições diretas (DRs) são compostas por sequências que variam de 27 a 50 nucleotídeos, parcialmente palindrômicas, que podem interagir entre si, possibilitando a formação de uma estrutura secundária estável, o *hairpin* (grampo). Devido à incorporação dos espaçadores próximos à sequência líder, as DRs que se encontram mais distantes dessa região são consideradas mais antigas. Embora essas sequências sejam altamente conservadas dentro de um *locus*, as DRs mais

antigas acumulam mutações que caracterizam sua degeneração. A última DR de um *locus* é a que mais diverge do padrão de repetições. O número de repetições de um CRISPR varia entre espécies, podendo ocorrer de duas a 375 cópias (JANSEN *et al.*, 2002; DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; HORVATH; BARRANGOU, 2010; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010; BARRANGOU, 2013).

As sequências intercalantes encontradas entre as DRs são denominadas espaçadoras e, geralmente, correspondem a porções do genoma de vírus, bactérias e plasmídeos (MGEs) com que a célula e seus antecessores tiveram contato. Os espaçadores são diretamente responsáveis por conferir imunidade através do material genético invasor correspondente, pois quando transcritos, atuam como guia para sua identificação. A região do genoma desses MGEs que irá ser incorporada ao *locus* (também chamada de protoespaçador) depende, parcialmente, do reconhecimento de uma pequena sequência composta por dois a cinco nucleotídeos, conhecida como motivo adjacente ao protoespaçador (*protospacer adjacent motif* ou PAM). A presença da PAM também ajuda a distinguir sequências inerentes à célula hospedeira, para evitar que o próprio genoma bacteriano seja alvo da maquinaria do CRISPR (MOJICA *et al.*, 2009; DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; TERNS; TERNS, 2011; BARRANGOU, 2013). No entanto, existem evidências da incorporação de porções do genoma do hospedeiro ao *locus* sob a forma de espaçadores. Apesar da hipótese de que esses espaçadores tenham sido gerados por engano e atuem como uma forma de autoimunidade, alguns estudos evidenciam o CRISPR como um mecanismo de regulação de determinados genes para que a bactéria possa escapar ao sistema imune do hospedeiro (STERN *et al.*, 2010; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014; LI *et al.*, 2016; WIMMER; BEISEL, 2020).

Os *loci* CRISPR não possuem fases de leitura aberta (*open reading frames* ou ORFs), ou seja, não são codificantes para proteínas. No entanto, existem sequências associadas aos *loci*, conhecidas como sequências líder, que atuam como promotores para sua transcrição em pré-crRNA. A sequência líder é uma região, composta por 200 a 500 pares de bases, rica em adeninas e timinas e encontra-se à montante da repetição mais recente presente no *locus* e, geralmente, à jusante do último gene *cas* associado. Sua presença é essencial para a orientação da incorporação de espaçadores novos aos *loci*. Essa estrutura é pouco conservada entre as espécies e é encontrada em tamanho maior e de composição mais

homogênea em arqueas, quando comparada com bactérias (JANSEN *et al.*, 2002; DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; YOSEF; GOREN; QIMRON, 2012; BARRANGOU, 2013; ALKHNABASHI *et al.*, 2016).

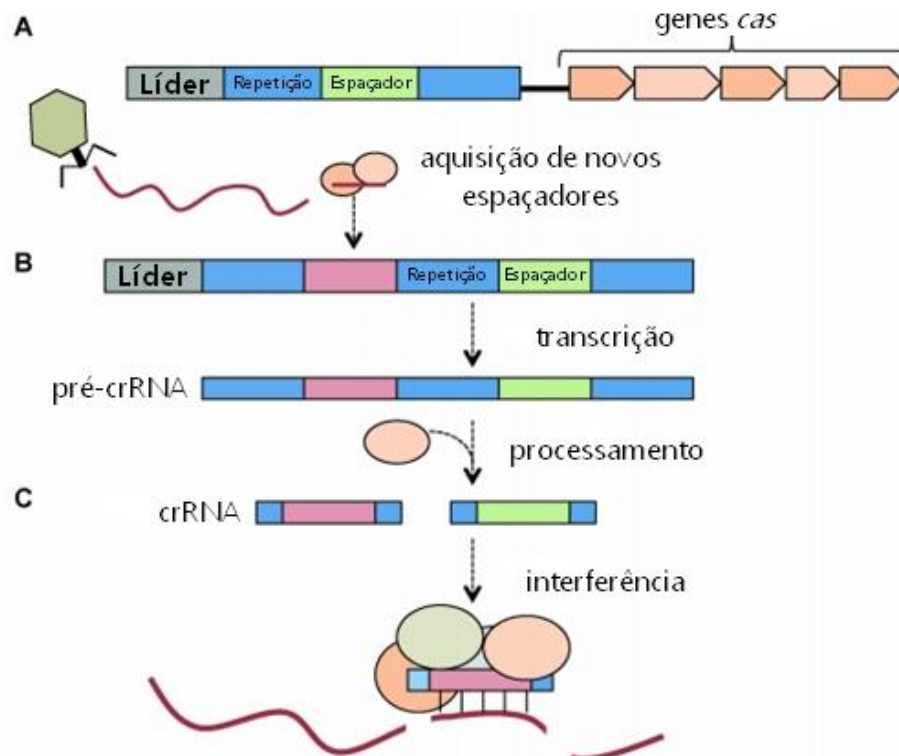
A presença de diferentes *loci* CRISPR em diferentes locais, em uma mesma célula hospedeira pode indicar que essa estrutura foi adquirida através da transferência horizontal de genes entre espécies não-relacionadas. Além disso, a inclusão de espaçadores correspondentes ao genoma próprio do hospedeiro pode indicar que um dos *loci* estaria executando sua função intrínseca, enquanto os demais estariam envolvidos com outras funções, como autoimunidade e regulação da expressão gênica (JANSEN *et al.*, 2002; WIMMER; BEISEL, 2020).

Nas proximidades dos *loci* CRISPR é possível encontrar uma variedade de genes *cas* codificando para proteínas com diversas funções, que participam nas fases da imunidade conferida pelo sistema. A presença e a organização dos diferentes genes *cas* são utilizadas para classificar os sistemas CRISPR/Cas associados (HILLE *et al.*, 2018). Devido às suas características, estes *loci* possuem inúmeras aplicações, como controle da disseminação de MGEs, tipagem molecular e modulação de resistência ao fago. Entre elas, podemos destacar a tipagem molecular que está intrinsecamente relacionada com a diversidade de espaçadores presentes nos *loci* e à sua dinâmica natural de aquisição (HORVATH; BARRANGOU, 2010; BARROS *et al.*, 2014).

4.3.3 Funcionamento do sistema CRISPR/Cas

O mecanismo de defesa conferido pelo sistema CRISPR/Cas ocorre em três estágios principais: adaptação via aquisição de espaçadores, expressão ou biogênese de crRNA e interferência (Figura 7). É necessário que haja a incorporação de fragmentos correspondentes ao invasor, sob a forma de espaçadores, para que sua transcrição possa gerar um crRNA. Esse crRNA se associa às proteínas Cas, formando um complexo que atua na destruição do material genético exógeno (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012). Os diferentes tipos de sistema CRISPR/Cas atuam de formas distintas durante as etapas da imunidade.

Figura 7 – Representação do mecanismo de defesa do sistema CRISPR/Cas e suas etapas. A etapa de adaptação (A) se inicia quando a célula entra em contato com um MGE e caracteriza-se pela incorporação de novos espaçadores ao locus. Durante a fase de expressão (B), todo o *locus* é transcrito para formar uma grande molécula de pré-crRNA, que será processado para formar pequenos crRNAs. O crRNA maduro, atua como guia para o reconhecimento e destruição do material genético invasor, durante a fase de interferência (C).



Fonte: adaptado de Richter *et al.*, 2012.

A etapa de adaptação é mediada por um complexo formado pelas proteínas Cas, cuja função é ligar-se ao material genético invasor para a seleção de protoespaçadores, através do reconhecimento da PAM. Após o reconhecimento da PAM, a porção do genoma correspondente ao protoespaçador é removida e, posteriormente, inserida ao *locus* CRISPR sob a forma de um novo espaçador. A inserção ocorre próximo à sequência líder, apresentando uma polaridade, e leva à duplicação da DR mais próxima (Figura 7B). Dessa forma, é possível identificar uma ordem cronológica da aquisição de espaçadores, sendo os mais recentes aqueles que estão mais próximos da sequência líder (AMITAI; SOREK, 2016; STERNBERG *et al.*, 2016). O complexo proteico é composto, geralmente, por dois dímeros da proteína Cas1 e um dímero de Cas2. Essas proteínas são tidas como as únicas necessárias para a aquisição de espaçadores. Embora a Cas1 tenha atividade de endonuclease, essencial para o processo de aquisição, Cas2 possui várias atividades de clivagem de DNA e RNA que não parecem estar diretamente

relacionadas com essa etapa. Ambas as proteínas são codificadas por um mesmo *operon* e podem ser encontradas sob a forma de um complexo Cas1-Cas2 (NUÑEZ *et al.*, 2014; NUÑEZ *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Este complexo é capaz de reconhecer a junção entre a sequência líder e a repetição direta mais próxima, além da região palindrômica dentro da DR, para realizar a inserção de novos espaçadores (AMITAI; SOREK, 2016).

Após a aquisição de espaçadores, o *locus* CRISPR é transcrito em uma longa molécula de pré-crRNA, que será processada para gerar pequenos crRNAs (Figura 7B). Os crRNAs correspondem a um espaçador e porções das repetições diretas adjacentes. Cada tipo de sistema CRISPR/Cas conta com diferentes complexos formados pelas proteínas Cas para realizar os processos de expressão e maturação do pré-crRNA. Por exemplo, nos sistemas tipo II, há a participação de um transcrito codificado em *trans* denominado crRNA de ativação em *trans* (*trans-activating crRNAs* ou *tracrRNA*). Os *tracrRNAs* possuem cerca de 25 pares de bases e são quase perfeitamente complementares aos espaçadores presentes nos *loci* CRISPR pertencentes ao tipo II. Além dos *tracrRNAs*, a proteína Cas9 e uma RNase III do hospedeiro são necessárias para o funcionamento dessa etapa. No entanto, a proteína Cas9 também participa na destruição do alvo, quando associada ao complexo *tracrRNA:crRNA* (DELTCHEVA *et al.*, 2011; JINEK *et al.*, 2012; CHARPENTIER *et al.*, 2015).

Na última etapa do mecanismo de imunidade conferido pelo sistema CRISPR/Cas, os crRNAs maduros são utilizados como cerne de um complexo ribonucleoproteico (crRNP) que atua na destruição do invasor. O crRNA serve como um guia para o direcionamento da maquinaria composta pelas proteínas Cas. A ausência da PAM no *locus* é o que impede que o crRNP destrua o próprio CRISPR, visto que a sequência no crRNA é complementar ao espaçador correspondente. Os crRNPs formados também diferem entre os tipos de sistema CRISPR/Cas. Nos sistemas pertencentes à Classe 1, o complexo formado é chamado Cascade (*CRISPR-associated complex for antiviral defence* ou complexo associado ao CRISPR para defesa antiviral), enquanto nos sistemas da Classe 2, apenas uma proteína efetora é necessária para realizar a destruição do invasor (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012; HILLE; CHARPENTIER, 2016; NISHIMASU; NUREKI, 2017; HILLE *et al.*, 2018).

Evidências indicam que há uma diminuição na expressão do sistema CRISPR/Cas na presença de elementos que possam trazer benefícios para a célula hospedeira. Porém, na presença de bacteriófagos, há um aumento na sua expressão para que possa conferir a defesa contra esse invasor. Os mecanismos de regulação desse sistema ainda não foram bem elucidados (RICHTER; CHANG; FINERAN, 2012)

4.3.4 Classificação do sistema CRISPR/Cas

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

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

A Classe 1 agrupa os tipos I, III e IV, entre outros e cerca de 12 subtipos que podem ser distinguidos através da similaridade entre as sequências de proteínas que participam do complexo efector, da organização dos *loci* e das

sequências de DRs. O tipo I é o mais numeroso e está distribuído em oito subtipos: A, B, C, G, D, E, F1 (anteriormente F), F2 (anteriormente variante F) e F3 (MAKAROVA *et al.*, 2020; KOONIN *et al.*, 2017). A Classe 2 inclui os tipos II, V e VI e 17 subtipos. É possível encontrar diversas variantes dos tipos V e VI e o tipo VI destaca-se por ser o único tipo conhecido que degrada exclusivamente RNA, até o momento (MAKAROVA *et al.*, 2015; MAKAROVA *et al.*, 2019).

4.3.5 Funções alternativas do sistema CRISPR/Cas

Estudos recentes têm demonstrado um papel funcional adicional do sistema CRISPR/Cas além da imunidade em algumas espécies de bactérias e arqueas (Tabela 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).

Tabela 1 – Funções alternativas do Sistema CRISPR/Cas.

Função	Tipo de 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 complementariedade 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	<i>Locus</i> CRISPR órfão	Regulação do <i>operon feoAB</i> por complementariedade parcial	
Remodelamento de genoma	I-F	Remoção de regiões genômicas por auto direcionamento	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
Reparo de 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).

4.4 PROTEÍNAS ANTI-CRISPR

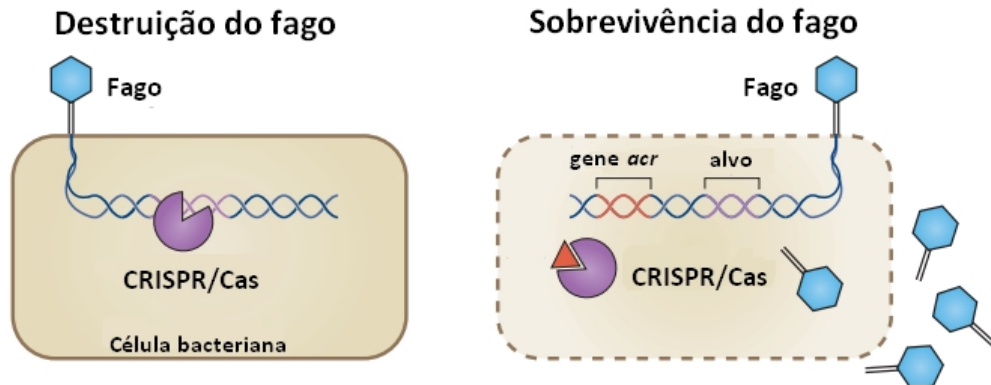
4.4.1 Descoberta e mecanismos de inativação das proteínas anti-CRISPR

Os vírus que infectam bactérias, conhecidos como bacteriófagos, já foram isolados de todos os tipos de ambientes habitados pelas bactérias e atuam como uma constante ameaça para essas formas de vida. Diante dos diversos mecanismos de defesa contra invasores, desenvolvidos pelas bactérias, os bacteriófagos continuaram evoluindo para garantir sua sobrevivência (SEED, 2015).

Antes da descoberta das proteínas anti-CRISPR (Acrs), a única forma de escape de bacteriófagos ao Sistema CRISPR/Cas se dava através de mutações pontuais em sequências protoespaçadoras. No entanto, a obtenção de novos espaçadores pelo CRISPR em diferentes células bacterianas de uma mesma população, permite que haja reimunização contra fagos mutantes. Dessa maneira, o acúmulo de mutações não é o suficiente para que bacteriófagos escapem à defesa promovida pelo CRISPR (SEMENOVA *et al.*, 2011; FINERAN *et al.*, 2014; VAN HOUTE *et al.*, 2016).

As proteínas anti-CRISPR foram primariamente descritas em um grupo altamente relacionado de fagos que infectam *Pseudomonas* spp. Devido à atuação desses inibidores, os fagos eram capazes de infectar e se reproduzir em *Pseudomonas aeruginosa*, apesar da atividade do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F e de possuírem sequências protoespaçadoras que seriam utilizadas como alvo (BONDY-DENOMY *et al.*, 2013) (Figura 8). Os profagos foram investigados através da comparação genômica, o que levou à descoberta de cinco genes inibidores do tipo I-F (*acrIF1-5*) e quatro do tipo I-E (*acrIE1-4*). A maioria dos fagos possuía os inibidores para ambos os tipos de Sistema (BONDY-DENOMY *et al.*, 2013; PAWLUK *et al.*, 2014).

Figura 8 – Bacteriófagos que possuem genes *acr* podem evadir à defesa promovida pelo Sistema CRISPR/Cas através da inibição de suas proteínas Cas.



Fonte: adaptado de Pawluk *et al.*, 2018.

Embora as nove famílias de proteínas Acr inicialmente descritas não compartilhassem sequências semelhantes, foi identificada a presença de um gene altamente conservado em suas proximidades, conhecido como gene *anti-CRISPR-associated 1* (associado ao anti-CRISPR 1; *aca1*) e codificante para um regulador transcricional. Tal achado permitiu que novos genes Acr para o tipo I-F (*acrIF6-10*) e um novo regulador (*aca2*) fossem descobertos, bem como para outros tipos de Sistema, como o II-A e II-C (*acrIIA1-4*, *acrIIC1-3*) (PAWLUK *et al.*, 2016a e b; RAUCH *et al.*, 2017).

Até o momento, foram descritas 40 famílias de proteínas Acr (Tabela 2). No entanto, não existem sequências ou motivos estruturais comuns entre as proteínas. Os mecanismos de inibição já elucidados se referem apenas à fase de interferência, através da ligação e clivagem do DNA alvo (HWANG; MAXWELL, 2019) (Figura 9). Das 11 proteínas com mecanismos conhecidos, oito realizam inibição através da ligação ao DNA alvo: AcrIF1, AcrIF2 e AcrIF10 atuam nos Sistemas tipo I-F impedindo a ligação do complexo Cascade com o alvo (GUO *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2017); AcrIIC3 inibe Sistemas tipo II-C dimerizando a Cas9 (HARRINGTON *et al.*, 2017); AcrIIC4 e AcrIIC5 impedem a ligação de NmeCas9 com o alvo (LEE *et al.*, 2018); AcrIIA2 mimetiza o DNA e ocupa o sítio de ligação da Cas9 (LIU *et al.*, 2019) e AcrIIA4 liga-se ao domínio de interação com a PAM, impedindo seu

reconhecimento (DONG *et al.*, 2017). As demais proteínas com mecanismo conhecido impedem a clivagem do DNA alvo: AcrIE1 se liga à nucleasse Cas3, inibindo-a (PAWLUK *et al.*, 2017); AcrIF3 também se liga à Cas3 na forma de um dímero, bloqueando seus sítios de ligação ao alvo e ao complexo Cascade (WANG *et al.*, 2016) e AcrIC1 impede a clivagem do alvo através da ligação com o domínio HNH da endonuclease Cas9 (HARRINGTON *et al.*, 2017).

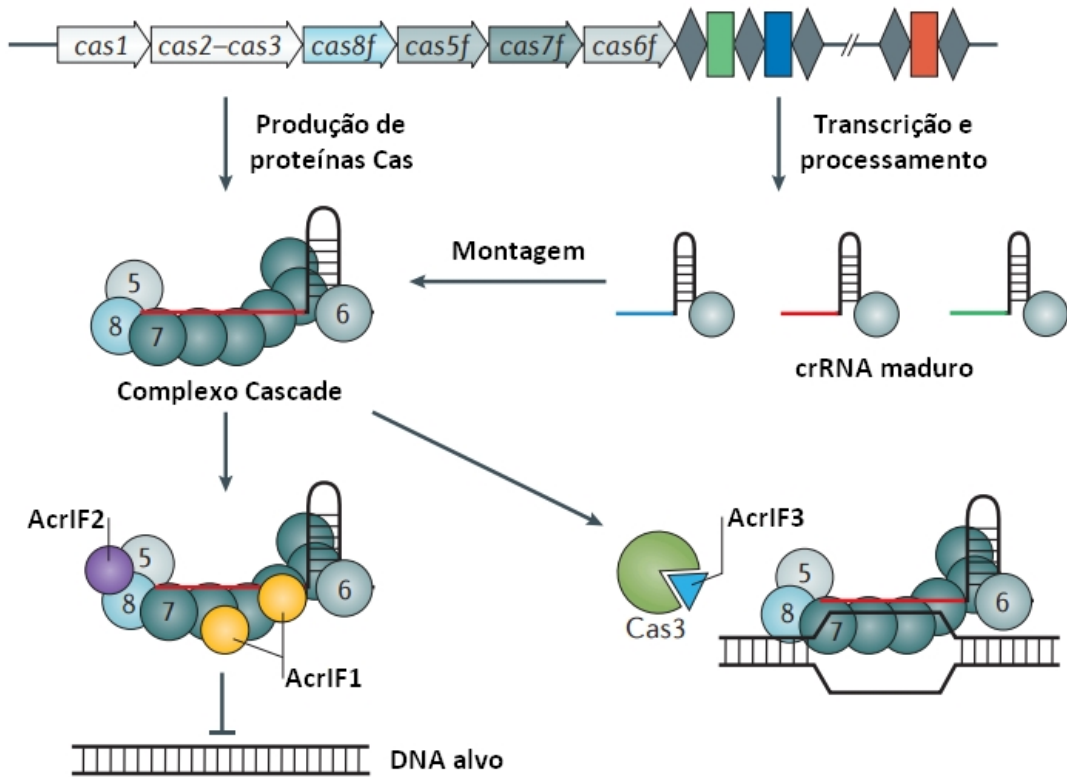
Tabela 2 – Nome das famílias de proteínas anti-CRISPR (Acr), organismos em que foram primariamente descritos e os tipos de Sistema CRISPR/Cas inibidos.

Família	Origem	Tipo de Sistema CRISPR/Cas inibido
AcrIC1	<i>Moraxella bovoculi</i> prophage	I-C
AcrID1	<i>Sulfolobus islandicus</i> rudivirus 3	I-D
AcrIE1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> phage JBD5	I-E
AcrIE2	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD88a	I-E
AcrIE3	<i>P. aeruginosa</i> phage DMS3	I-E
AcrIE4	<i>P. aeruginosa</i> phage D3112	I-E
AcrIE4-F7	<i>P. citronellolis</i> prophage	I-E/I-F
AcrIE5	<i>P. otitidis</i> prophage	I-E
AcrIE6	<i>P. aeruginosa</i> prophage	I-E
AcrIE7	<i>P. aeruginosa</i> prophage	I-E
AcrIF1	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD30	I-F
AcrIF2	<i>P. aeruginosa</i> phage D3112	I-F
AcrIF3	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD5	I-F
AcrIF4	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD26	I-F
AcrIF5	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD5	I-F
AcrIF6	<i>P. aeruginosa</i> prophage	I-E/I-F
AcrIF7	<i>P. aeruginosa</i> prophage	I-F
AcrIF8	<i>Pectobacterium</i> phage ZF40	I-F
AcrIF9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> mobile element	I-F
AcrIF10	<i>Shewanella xiamenensis</i> prophage	I-F
AcrIF11	<i>P. aeruginosa</i> prophage	I-F

AcrIF12	<i>P. aeruginosa</i> mobile element	I-F
AcrIF13	<i>Moraxella catarrhalis</i> prophage	I-F
AcrIF14	<i>Moraxella</i> phage Mcat5	I-F
AcrIIA1	<i>Listeria monocytogenes</i> prophage J0161a	II-A
AcrIIA2	<i>L. monocytogenes</i> prophage J0161a	II-A
AcrIIA3	<i>L. monocytogenes</i> prophage SLCC2482	II-A
AcrIIA4	<i>L. monocytogenes</i> prophage J0161b	II-A
AcrIIA5	<i>Streptococcus thermophilus</i> phage D4276	II-A
AcrIIA6	<i>S. thermophilus</i> phage D1811	II-A
AcrIIC1	<i>Neisseria meningitidis</i>	II-C
AcrIIC2	<i>N. meningitidis</i> prophage	II-C
AcrIIC3	<i>N. meningitidis</i> prophage	II-C
AcrIIC4	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> prophage	II-C
AcrIIC5	<i>Simonsiella muelleri</i> prophage	II-C
AcrVA1	<i>M. bovoculi</i> prophage	V-A
AcrVA2	<i>M. bovoculi</i> prophage	V-A
AcrVA3	<i>M. bovoculi</i> prophage	V-A
AcrVA4	<i>M. bovoculi</i> mobile element	V-A
AcrVA5	<i>M. bovoculi</i> mobile element	V-A

Fonte: adaptado de Marino et al., 2020.

Figura 9 – Mecanismo de ação das proteínas AcrIF1, AcrIF2 e AcrIF3. As proteínas AcrIF1 e AcrIF2 impedem a ligação do complexo Cascade com o DNA alvo; a proteína AcrIF3 liga-se à Cas3, inibindo seus sítios de ligação com o alvo e com o complexo Cascade, impedindo a destruição do alvo.



Fonte: adaptado de Pawluk *et al.*, 2018.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Caracterizar e avaliar a expressão do Sistema CRISPR/Cas tipo I-F1 em isolados clínicos de *A. baumannii*.

5.2 Objetivos específicos

1. Investigar a presença de profagos nos genomas dos isolados clínicos de *A. baumannii*;
2. Identificar espaçadores correspondentes a bacteriófagos nos *loci* CRISPR estudados;
3. Avaliar a presença de genes anti-CRISPR inseridos nos genomas dos isolados;
4. Analisar qualitativamente a expressão dos genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F1.

6 METODOLOGIA

6.1 Amostras de *Acinetobacter baumannii*

Para a realização do estudo foi analisado um total de 14 genomas de *A. baumannii* positivos para o *locus* CRISPR (SILVA, 2019). Estes isolados foram previamente sequenciados e armazenados em banco de dados no Instituto Aggeu Magalhães (IAM)/Fiocruz – PE (LEAL *et al.*, 2020). Os isolados clínicos foram obtidos de diversas origens de infecção, tanto de pacientes internados em UTIs e enfermarias, quanto de amostras ambulatoriais de cinco diferentes hospitais da cidade de Recife/Pernambuco (Tabela 3).

Os genomas foram avaliados anteriormente acerca da classificação dos Sistemas CRISPR/Cas, seguindo critérios descritos por Makarova e colaboradores (2019), sendo todos pertencentes à classe 1, subtipo I-F1 (SILVA, 2019).

Os isolados clínicos de *A. baumannii*, encontram-se estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz, em criotubos a -80°C, contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol a 30% na proporção de 1:1.

Tabela 3 – Isolados clínicos utilizados para a realização do estudo, obtidos de diferentes sítios de infecção e setores de internação, em cinco hospitais da cidade do Recife/Pernambuco. Todos os isolados são pertencentes ao ST 113, com a exceção do isolado Acb_41, pertencente ao ST 25.

Isolado	Data de coleta	Sítio de Infecção	Setor	Hospital	ST
Acb_1	2012	Líquor	UTI	H1	113
Acb_4	2012	Líquor	UTI	H1	113
Acb_5	2012	Líquor	UTI	H1	113
Acb_8	2012	Líquor	UTI	H1	113
Acb_21	2014	Secreção traqueal	-	H2	113
Acb_24	2010	Sangue	UTI	H3	113

Acb_29	2010	Swab retal	Unidade Coronariana	H3	113
Acb_33	2014	Sangue	UTI	H4	113
Acb_35	2014	Cateter	UTI	H4	113
Acb_36	2014	Cateter	UTI	H4	113
Acb_38	2014	Ferida	Ambulatório	H4	113
Acb_41	2014	Osso	-	H4	25
Acb_44	2014	Secreção traqueal	UTI	H5	113
Acb_47	2014	Líquido cavitário	UTI	H5	113

Fonte: Leal *et al.*, 2020.

6.2 Investigação da presença de profagos nos genomas de *A. baumannii*

A presença de profagos nos genomas dos 14 isolados de *A. baumannii* estudados foi verificada através da ferramenta Phaster (ARNDT *et al.*, 2016; <https://phaster.ca/>), com o intuito de avaliar o funcionamento do sistema CRISPR/Cas, visto que sua função primária está relacionada à imunidade contra invasores. As sequências foram submetidas no formato FASTA e considerados como resultado apenas regiões estabelecidas pela ferramenta como intactas ou questionáveis. As regiões questionáveis não possuem genes de profago suficientes para serem consideradas profagos completos e funcionais, embora possam ser reorganizadas para recuperar tal função; enquanto regiões incompletas podem estar relacionadas a profagos crípticos, que perderam a capacidade de formar partículas virais ou lisar o hospedeiro (WANG; WOOD, 2016). A atribuição de cada região a determinado fago também foi realizada de forma automática pelo Phaster.

6.3 Identificação de espaçadores correspondentes a bacteriófagos e profagos

Para identificação de espaçadores contra bacteriófagos e possíveis profagos inseridos nos genomas estudados, cento e cinquenta sequências espaçadoras obtidas em trabalho anterior (SILVA, 2019), foram avaliadas. A busca foi realizada através do BLASTn contra os bancos de dados do NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997;

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>), CRISPRTarget (<http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget>) e CRISPRdb (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>). Para aumentar a confiabilidade das análises e evitar similaridade aleatória com sequências depositadas nos bancos de dados, foram descartadas sequências com *e-value* maior que 1.0 (SEMENOVA *et al.*, 2009).

6.4 Pesquisa da presença de genes anti-crispr (*acr*) nos genomas de *A. baumannii*

A ferramenta AcrFinder (YI *et al.*, 2020; disponível em <http://bcbl.unl.edu/AcrFinder/>) foi utilizada para busca de genes anti-CRISPR nos genomas de *A. baumannii*, que pudessem estar inibindo o funcionamento do Sistema CRISPR/Cas. As sequências de proteínas Acr que têm como alvo o sistema tipo I-F1 foram obtidas a partir do banco de dados AcrHub (WANG *et al.*, 2021; disponível em <https://pacrispr.erc.monash.edu/AcrHub/index.jsp>) e foi realizada uma comparação de sequências em busca de similaridades através do *Translated BLAST: blastx*.

6.5 Análise qualitativa da expressão dos genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F1

A proteína Cas1 é tida como essencial para o funcionamento do Sistema CRISPR/Cas e representa a proteína mais conservada entre os *loci* CRISPR. O gene *csy1* é um dos genes assinatura que auxiliam na identificação do subtipo I-F, por ser específico para tal subtipo. Dessa forma, a técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa-PCR) foi aplicada para verificar a transcrição dos genes *cas1* e *csy1* nos isolados do estudo, em condições padrão de crescimento, pois refletiriam o funcionamento do Sistema.

O gene *rpoB*, por ser responsável pela codificação da subunidade β da enzima RNA polimerase, é considerado como um gene *housekeeping*, e também pode ser utilizado para identificação e classificação taxonômica de espécies bacterianas, o que indica sua alta taxa de conservação (NEMEC *et al.*, 2003). Dessa

maneira, sua expressão deve ser constitutiva e, por isso, o gene foi escolhido como controle para a expressão gênica.

Os isolados foram reativados em meio Luria-Bertani (LB) líquido, incubados a uma temperatura de 37°C, por 24h. Posteriormente, foram semeados em placa de petri contendo meio LB, para verificação de possíveis contaminações, incubados a uma temperatura de 37°C por 24h. O RNA total foi extraído segundo recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e visualizado em transiluminador de luz UV. A quantificação e grau de pureza deste RNA foram avaliados em NanoDrop 2000c (Thermoscientific) e sua integridade foi avaliada também através de eletroforese em gel de agarose.

O RNA total (20µL) foi tratado duas vezes com 4 U de TURBO DNA-free (ThermoFischer), seguindo o protocolo rigoroso proposto pelo fabricante. 1µL do RNA tratado foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se o kit GoScript Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA gerado foi submetido à PCR e eletroforese em gel de agarose a 2%, para melhor visualização dos fragmentos.

Os *primers* (Tabela 4) utilizados para amplificação dos genes *cas1* e *csy1* foram desenhados com o auxílio do *software* ApE (A plasmid editor, disponível em <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). As análises acerca da temperatura de *melting* (T_m), formação de *hairpins*, *self*-dímeros e heterodímeros foram realizadas utilizando a ferramenta OligoAnalyzer da Integrated DNA Technologies (IDT, disponível em <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Todos os *primers* foram submetidos a um teste com gradiente de temperaturas de *melting* (50°-60°C), utilizando o DNA dos isolados Acb_01 e Acb_41, para verificar as melhores condições das reações de PCR.

Tabela 4 – Informações dos *primers* utilizados no estudo.

Gene	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>casI</i> -F	GGAACAACCTTAACCCATCTGAC	773pb	Neste estudo
<i>casI</i> -R	CATCAAACACCAAAGCACCT		
<i>csyI</i> -F	CGGGTTACTCAACTTTCTATGG	480pb	Neste estudo
<i>csyI</i> -R	CTCTTTAGCCTGTTTGTCTC		
<i>casIq</i> -F	GAACAACCTTAACCCATCTGAC	200pb	Neste estudo
<i>casIq</i> -R	GAGTAATGGATGTACCTGTTC		
<i>csyIq</i> -F	AGCAGAATTACAGCAGCAAGC	225pb	Neste estudo
<i>csyIq</i> -R	GCAGCGGCATTACCAAATACA		
<i>rpoBq</i> -F	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC	175pb	ROYER <i>et al.</i> , 2018.
<i>rpoBq</i> -R	ATGCCGCCTGAAAAAGTAAC		

Fonte: acervo pessoal (2020).

Como controle positivo das reações de PCR a partir do cDNA gerado, foi utilizado o DNA do isolado Acb_41 e, como controle negativo, foi utilizada água DEPC.

7 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 estudos anteriores (LEAL *et al.*, 2020) e estão estocados na bacterioteca do Departamento de Microbiologia do IAM/Fiocruz. Todas as amostras clínicas foram identificadas com numeração, sem qualquer referência ao paciente ou ao hospital do qual a bactéria foi isolada.

8 RESULTADOS

8.1 Investigação da presença de profagos nos genomas de *A. baumannii*

A investigação da presença de profagos inseridos nos genomas dos 14 isolados clínicos utilizados no estudo, evidenciou que todos apresentam pelo menos uma região relacionada a profago considerada como intacta inserida em seu genoma, com exceção do Acb_29 e Acb_41. O isolado Acb_29 não possui regiões consideradas como intactas e o Acb_41, possui apenas regiões incompletas (Tabela 5).

Tabela 5 – Profagos inseridos nos genomas de *A. baumannii* estudados. Estão detalhados a numeração, o tamanho, denominação de cada região e a quantidade de regiões incompletas por isolado. Destacam-se, em verde os profagos intactos, em roxo os questionáveis e em negrito os profagos que estão diretamente relacionados com o gênero *Acinetobacter*. O isolado Acb_41 possui apenas regiões incompletas.

	Região	Tamanho	Profagos	Regiões incompletas
Acb_1	1	21.1Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(10)	6
	4	17.9Kb	PHAGE_Acinet_Bphi_B1251_NC_019541(8)	
Acb_4	6	39.4Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(8)	6
	8	34.6Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(11)	
Acb_5	2	43.4Kb	PHAGE_Acinet_Bphi_B1251_NC_019541(22)	5
	3	31.3Kb	PHAGE_Pseudo_B3_NC_006548(7)	
	6	51.4Kb	PHAGE_Acinet_vB_AbaS_TRS1_NC_031098(7)	
	9	38.2Kb	PHAGE_Acinet_vB_AbaS_TRS1_NC_031098(5)	
Acb_8			PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(10)	4
	4	21.1Kb)	
Acb_21			PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(12)	2
	3	39.3Kb)	
	4	37.4Kb	PHAGE_Pelagi_HTVC010P_NC_020481(5)	
Acb_24	5	42.6Kb	PHAGE_Acinet_Bphi_B1251_NC_019541(29)	3
	1	38Kb	PHAGE_Acinet_vB_AbaS_TRS1_NC_031098(5)	
	2	21.1Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(10)	
Acb_29	5	42.8Kb	PHAGE_Acinet_Bphi_B1251_NC_019541(23)	8
	6	66.9Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(7)	
	1	17.9Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(5)	
Acb_41	7	43.6Kb	PHAGE_Acinet_vB_AbaS_TRS1_NC_031098(7)	8
	10	10.5Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(4)	
	11	23.4Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(4)	

Acb_3 3	1	18.1Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(4)	7
	5	28.9Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(11)	
Acb_3 5	1	16.6Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(4)	4
	5	39.8Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(12)	
Acb_3 6	5	21.9Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(10)	9
Acb_3 8	5	24.3Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(10)	7
	6	16.6Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(4)	
Acb_4 1	-	-	-	8
Acb_4 4	1	36Kb	PHAGE_Psychr_Psymv2_NC_023734(6)	6
	5	38.5Kb	PHAGE_Pseudo_Dobby_NC_048109(17)	
	9	36.9Kb	PHAGE_Haemop_SuMu_NC_019455(12)	
Acb_4 7	1	38.2Kb	PHAGE_Escher_ECP1_NC_049926(5)	6
	4	13Kb	PHAGE_Pseudo_phiCTX_NC_003278(10)	
	6	41.6Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(12)	
	7	41Kb	PHAGE_Mannhe_vB_MhM_3927AP2_NC_028766(13)	

Fonte: acervo pessoal (2021).

Em toda a análise foram evidenciados oito profagos diretamente relacionados ao gênero *Acinetobacter*. Destas, 5/8 (62,5%) foram relacionados a regiões questionáveis e 3/8 (37,5%) foram definidas como regiões intactas (Tabela 5).

8.2 Identificação de espaçadores correspondentes a bacteriófagos

A pesquisa dos espaçadores em banco de dados demonstrou que 48/150 espaçadores (32%) mostrou similaridade com bacteriófagos. Dentre eles, 15/48 (31,2%) apresentaram correspondência com um bacteriófago e seu alvo bacteriano pôde ser identificado. Entretanto, 33/48 (68,8%) espaçadores que não puderam ser identificados quanto ao bacteriófago apresentaram similaridade com proteínas de fagos depositadas nos bancos de dados do Uniprot e do NCBI, porém não havia descrição do fago. A pesquisa nos bancos do CRISPR Target e CRISPRdb também não resultou em descrição do bacteriófago correspondente (Tabela 6).

Tabela 6 – Espaçadores correspondentes a bacteriófagos. Quinze espaçadores tiveram seus bacteriófagos correspondentes definidos, com a identificação das espécies bacterianas tidas como alvo. Em azul, destaca-se os espaçadores correspondentes a bacteriófagos específicos de *Acinetobacter*, e em laranja, a cianobactérias. Quatro fagos, destacados em negrito, apresentaram similaridade com mais de um espaçador.

Espaçador	Sequência	Bacteriófago	Gênero
s2	AAAAC TAAAACGGCAGTGTCTCGTCAGCATGACC	Psymv2	<i>Psychrobacter</i>
s5	AACGAGAAATTGGAAC TACAAAAGAACCAAAA	1.074.O_10N.222.49.B7	<i>Vibrio</i>
s7	AACGTTTCCGCAAATCTGCGAAATACTCGTTG	Desconhecido	-
s8	AATACGAACAGTATCAAGTTCAGTCGTTGGTA	Desconhecido	-
s12	ACAAACTAAACGTTTACCAC TTAGCAGTTGTTG	Desconhecido	-
s15	ACATGATATGAAGCGAAAGCCATATCAGTGTT	Desconhecido	-
s17	ACCGTTTGCTCTTCCAGCAAAAATAGGATCCG	Desconhecido	-
s18	ACGGTGT CAGAGTTTTAGAACTCAATGATGGC	Desconhecido	-
s21	AGAAGGTGGAAC TGTAAAAATTGTTGGCAATCT	Desconhecido	-
s25	AGCCACGTCAACAGCAGCATTGGCATTAGTAA	Abp53	<i>Acinetobacter</i>
s28	AGTCGGCACAGGTAGCAGTTGAGCAGTCATCG	Desconhecido	-
s35	ATAAAGCGCACAAACCCATTGATTTGTATTTTT	Desconhecido	-
s37	ATACACATGTTTTTCTAATAAGAATAAGACAA	G	<i>Bacillus</i>
s40	ATATGGTGGTTGTTATAAACCGCCTAATGATA	ACG-2014c	<i>Synechococcus</i>
		S-MbCM6	<i>Synechococcus</i>
		S-MbCM25	<i>Synechococcus</i>
s42	ATCATCGAAATTTAGTTCTAATTCTTTAATTT	Lj928	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
s44	ATCCTGTCTCTTGGTCAATCTTGGCACGTAGG	Desconhecido	-
s47	ATCTTCCGCAATGGCCTTTTTGAATGCTTCAT	HK225	Enterobacteria
s48	ATCTTGAGTTCAAATAAACGGACAAATGGGAT	Desconhecido	-
s53	ATTACCGACTGATTGTTGAGTGGCAATGTAA	Ldl1	<i>Lactobacillus</i>
s58	ATTTGGACGGCTTGAACCAATCCAACAAGAAC	Desconhecido	-
s60	CAAACGTGGGTTACATCTAGTTGCCTGAGGAG	Desconhecido	-
s61	CAATGGATTTAAAGATTTCAACCGCTTGGGAG	Desconhecido	-
s62	CACCATGCGTTTAGGTGTCTCGGTGAGCTGCATC	Desconhecido	-
s63	CAGCAAATGGGCGGTGTAATTGCTGATGGAGC	Desconhecido	-
s64	CAGCCAAAAAAGACTGGGAAAAAGGGATTGAT	Desconhecido	-
s65	CATGACCCAACCACGTAAATTCATACCACACG	Desconhecido	-
s67	CCAGACTTGATTTTTATCACCATTGAAGAGTT	Desconhecido	-
s69	CGCGGCCTTTATTCGCGTGTTTCGGTTGAGTT	Desconhecido	-
s74	GAAGTAGATAAACCTTTTTAAAGAAATACATAA	Desconhecido	-
s75	GAATTGCACTTGCTAAGCCAATAATGCCAACT	vB_AbaS_TRS1	<i>Acinetobacter</i>
s77	GACATGGCGAGTTGCAGCAGGAATACCATAAT	Desconhecido	-
s79	GACGAGCAACACGTCAACGAACTCAAAGCAAAA	vB_AbaS_TRS1	<i>Acinetobacter</i>
s81	GAGATTCAAGTTTCACCGGATGGCACAAGTAA	Desconhecido	-
s82	GAGTAATGCAGCACCAACAGCAGTAATCGCAG	NATL1A-7	-

s95	GTCCTGGTGAATTCGGGCAAGTCTCGATACTC	Desconhecido	-
s97	TAAAATCACATCAGGGAAGTGAAGGCGAGCTA	Mcat13	<i>Moraxella</i>
s107	TCAAAACGTATGGGTTATTGATGCTCAAGATT	Desconhecido	-
s109	TCAGGTAATAAAAAACCGCCCGAAGGCGGTAT	Ab105-3phi	<i>Acinetobacter</i>
		1.285.O. 10N.286.55.C12	<i>Vibrio</i>
		YMC11/02/R656	<i>Pseudomonas</i>
		Sf11	<i>Shigella</i>
		Eco_BIFF	<i>Escherichia</i>
		DU_PP_IV	<i>Pectobacterium</i>
		DU_PP_I	<i>Pectobacterium</i>
		vB_SfIS-ISF001	<i>Shigella</i>
s111	TCGCAGCTTCAAGCACACCTTCTTGATGAGCA	Desconhecido	-
s117	TGCATCGAAGTCATAGAACGCTTTGAGTTTCCA	Desconhecido	-
s118	TGCATTAAGACGAATGCGGGCAATTGGTAATG	Desconhecido	-
s131	TTAGTCGCATTAGCGCAAAGCTACGTGGATT	Desconhecido	-
s132	TTATAGATGGCTTTAACTGACTCCCAGCCCAT	Desconhecido	-
s133	TTCAATGTGTTTAAGATCGGGTCAAAGCTAC	Desconhecido	-
s134	TTCCTCAACTGACATTTCCAAATAGTAGAGGC	YMC11/11/R3177	<i>Acinetobacter</i>
		Bphi-B1251	<i>Acinetobacter</i>
		Ab105-2phi	<i>Acinetobacter</i>
		Ab105-3phi	<i>Acinetobacter</i>
s135	TTCGCTGGTTTGCTTCACAATTACACGCTCAG	Desconhecido	-
s139	TTGGTTGTTTAGTAAGTTCAAAGCCCGTTGTA	Ab105-2phi	<i>Acinetobacter</i>
		RL-2015	<i>Acinetobacter</i>
		YMC11/11/R3177	<i>Acinetobacter</i>
		Ab105-3phi	<i>Acinetobacter</i>
s147	TTGCCGATGCGTGCAAACATTTGCTCCGCTTC	Desconhecido	-

Fonte: acervo pessoal (2021).

Dos espaçadores que puderam ter suas origens especificadas, foram identificados 26 fagos distintos, dos quais sete possuem o gênero *Acinetobacter* como alvo (Abp53, vB_AbaS_TRS1, Ab105-3phi, YMC11/11/R3177, Bphi-B1251, Ab105-2phi e RL-2015). Quatro fagos apresentam similaridade com diferentes espaçadores (Tabela 7). Dentre os fagos obtidos, destaca-se ainda o cianofago NATL1A-7, que infecta cianobactérias.

Tabela 7 – Bacteriófagos que apresentam correspondência a mais de um espaçador.

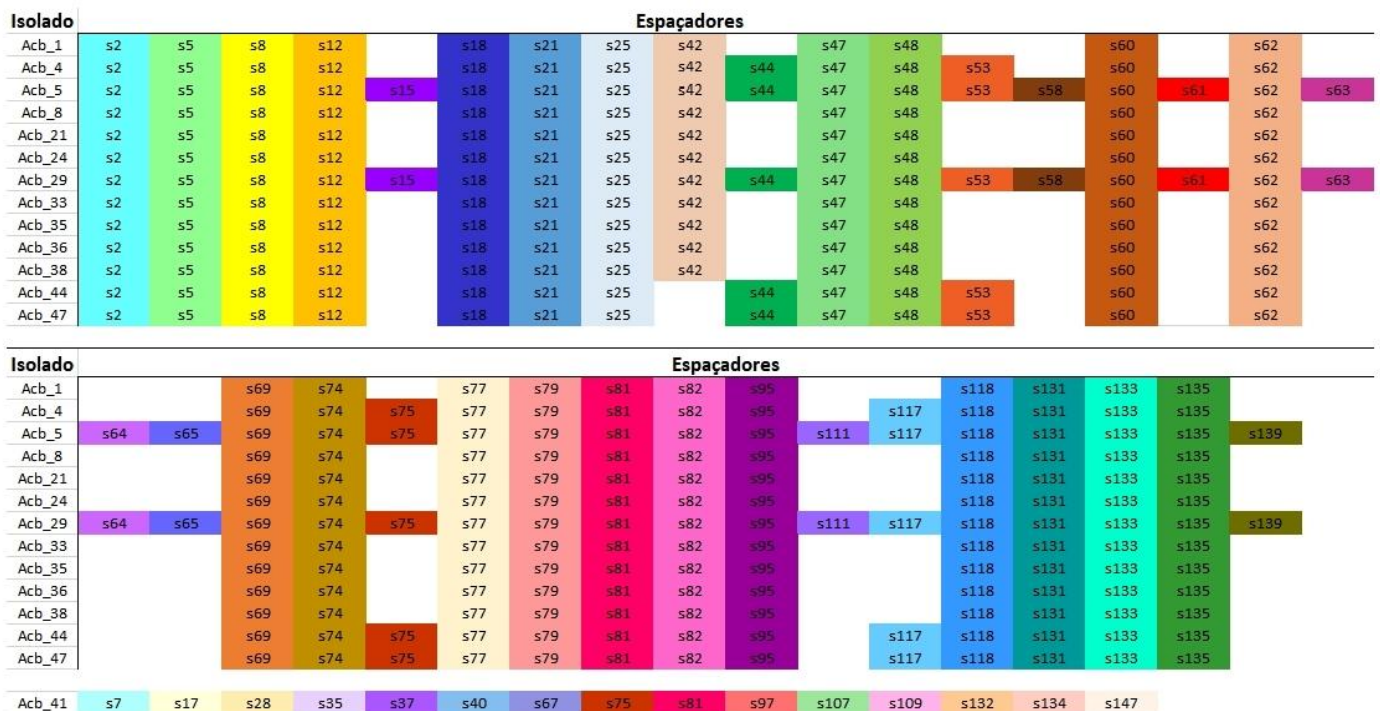
Bacteriófago	Espaçadores
vB_AbaS_TRS1	s75 e s79
Ab105-3phi	s109 e s134
YMC11/11/R3177	s134 e s139
Ab105-2phi	s134 e s139

Fonte: acervo pessoal (2021).

Os espaçadores s40, s109, s134 e s139 apresentaram similaridade com mais de um bacteriófago. Embora sejam fagos diferentes, estes apresentam como alvo o mesmo gênero bacteriano, com exceção apenas do espaçador s109 que corresponde a fagos que podem infectar diferentes gêneros.

A montagem de um mapa auxiliou na visualização da composição de espaçadores relacionados a fagos por isolado estudado, identificando a possível imunidade conferida por tais espaçadores (Figura 10). Todos os isolados compartilham um grupo com 22 espaçadores (s2, s5, s8, s12, s18, s21, s25, s47, s48, s60, s62, s69, s74, s77, s79, s81, s82, s95, s118, s131, s133 e s135) que estão presentes em todos os isolados, com exceção do Acb_41. O espaçador s81 é identificado em todos os genomas do estudo; com exceção desse espaçador, o isolado Acb_41 demonstra uma composição bastante distinta dos demais. Já Acb_4, Acb_5, Acb_29, Acb_44 e Acb_47, possuem um grupo de espaçadores em comum (s44, s53, s75 e s117); enquanto Acb_5 e Acb_29 compartilham dos mesmos espaçadores específicos (s15, s58, s61, s63, s64, s65, s111 e s139), assim como Acb_44 e Acb_47. Estes isolados (Acb_44 e Acb_47) são os únicos que não apresentam no *locus* CRISPR o espaçador s42.

Figura 10 – Mapa evidenciando a composição de espaçadores relacionados a fagos, por isolado. Cada espaçador é representado por uma cor diferente. O isolado Acb_41 encontra-se separado dos demais por apresentar uma composição bastante distinta.



Fonte: acervo pessoal (2021).

A partir de comparação entre os resultados obtidos, foi possível observar que, embora 13/14 isolados utilizados no estudo possuam regiões de profagos, seis genomas contavam com a presença do profago e do espaçador contra tal fago, simultaneamente (Tabela 8). O profago vB_AbaS_TRS1 pode ser encontrado nos isolados Acb_5, Acb_24 e Acb_29, porém todos eles também apresentam pelo menos um espaçador correspondente a esse fago (s75 e s79). Já o Psymv2, encontra-se inserido no genoma dos isolados Acb_24, Acb_29, Acb_33, Acb_35, Acb_38 e Acb_44, junto com seu espaçador correspondente (s2).

Tabela 8 – Isolados que possuem profago e espaçador correspondente ao fago, simultaneamente. Em verde, destacam-se o profago vB_AbaS_TRS1 e seu espaçador correspondente e, em rosa, o profago Psymv2 e seu espaçador.

Isolado	Profago	Espaçador correspondente
Acb_5	vB_AbaS_TRS1	s75 s79
Acb_24	vB_AbaS_TRS1	s79

	Psymv2	s2
Acb_29	vB_AbaS_TRS1	s75 s79
	Psymv2	s2
Acb_33	Psymv2	s2
Acb_35	Psymv2	s2
Acb_38	Psymv2	s2
Acb_44	Psymv2	s2

Fonte: acervo pessoal (2021).

8.3 Pesquisa da presença de genes anti-crispr (*acr*) nos genomas de *A. baumannii*

A utilização da ferramenta AcrFinder permitiu realizar a busca de genes *acr* nos 14 isolados de *A. baumannii* em estudo. Entretanto, nenhum gene anti-CRISPR foi identificado nos genomas analisados. Para confirmar os resultados obtidos, foram analisadas sequências de 65 proteínas Acr específicas para o Sistema tipo I-F a partir do banco de dados AcrHub (Apêndice A). Foi realizada a comparação dessas sequências com os genomas dos isolados estudados através do blastx e novamente nenhuma similaridade foi encontrada.

8.4 Análise qualitativa da expressão dos genes *cas* do sistema CRISPR/cas tipo I-F1

O RNA total de todos os 14 isolados de *A. baumannii* foi obtido de forma eficiente (Figura 11). No entanto, para completa purificação do RNA foi necessário adicionar o tratamento com a enzima TURBO DNA-free (Thermofischer) eliminando desta forma o DNA genômico (gDNA) contaminante. A eficiência do tratamento foi constatada através de uma PCR, utilizando-se os cDNAs teste e os cDNAs controles, nos quais não foi adicionada a enzima Transcriptase Reversa.

Os testes dos *primers* com gradiente de temperaturas de melting (T_m) permitiu identificar quais as temperaturas forneciam melhores condições para as reações de PCR (Tabela 9).

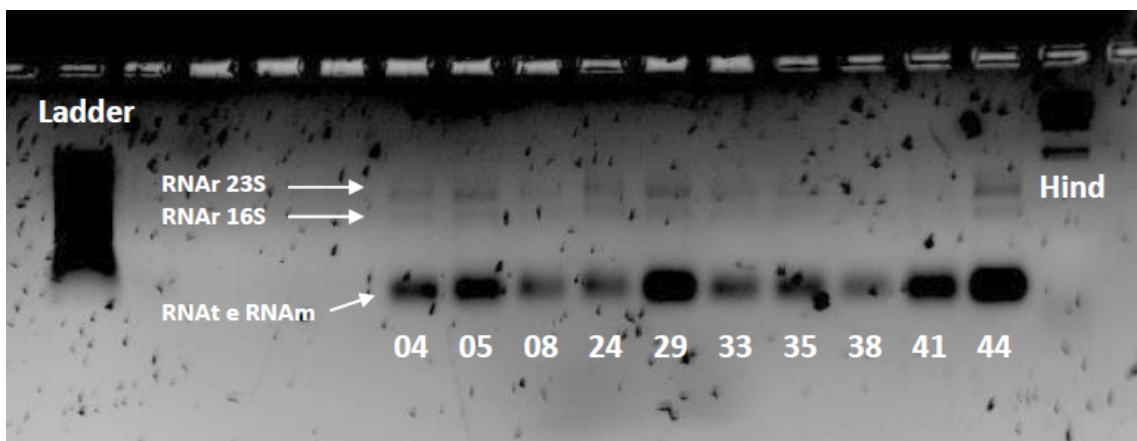
Tabela 9 – Temperaturas de melting utilizadas no estudo.

<i>Primer</i>	Temperatura de melting (T _m)
<i>casI</i> -F	51 °C
<i>casI</i> -R	
<i>csyI</i> -F	60 °C
<i>csyI</i> -R	
<i>casI</i> q-F	50 °C
<i>casI</i> q-R	
<i>csyI</i> q-F	60 °C
<i>csyI</i> q-R	
<i>rpoB</i> q-F	54 °C
<i>rpoB</i> q-R	

Fonte: acervo pessoal (2020).

Todos os 14 isolados utilizados no estudo foram submetidos à técnica de RT-PCR e o resultado da expressão qualitativa dos genes *cas* do sistema CRISPR/Cas tipo I-F1 foi analisado mediante a visualização de bandas específicas para cada gene investigado.

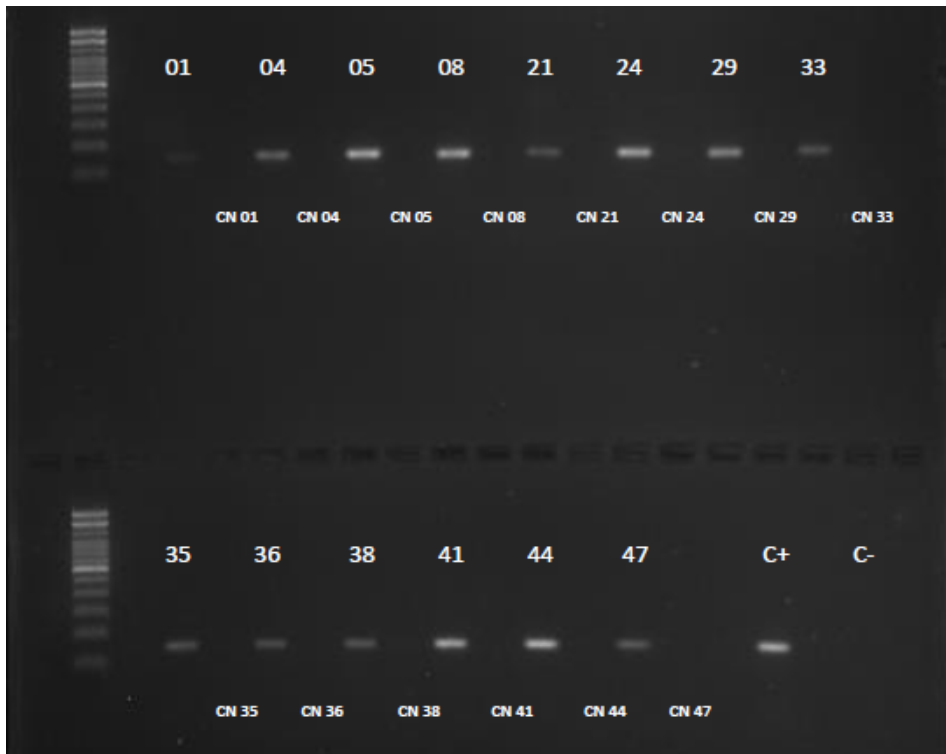
Figura 11 – Eletroforese representativa em gel de agarose a 1% do RNA extraído dos isolados de *A. baumannii* utilizando Trizol. Estão destacados os fragmentos correspondentes ao RNAr 23S, RNAr 16S, RNAt e RNAm. Os marcadores moleculares utilizados foram o Ladder 100pb (Invitrogen) e o DNA lambda digerido por Hind III.



Fonte: acervo pessoal (2020).

O gene *rpoB* foi estabelecido como controle para a expressão gênica e, portanto, foi possível afirmar que todos os isolados utilizados no estudo são viáveis pois estão realizando seu processo de transcrição de forma eficiente. Os controles negativos não geraram fragmentos (Figura 12).

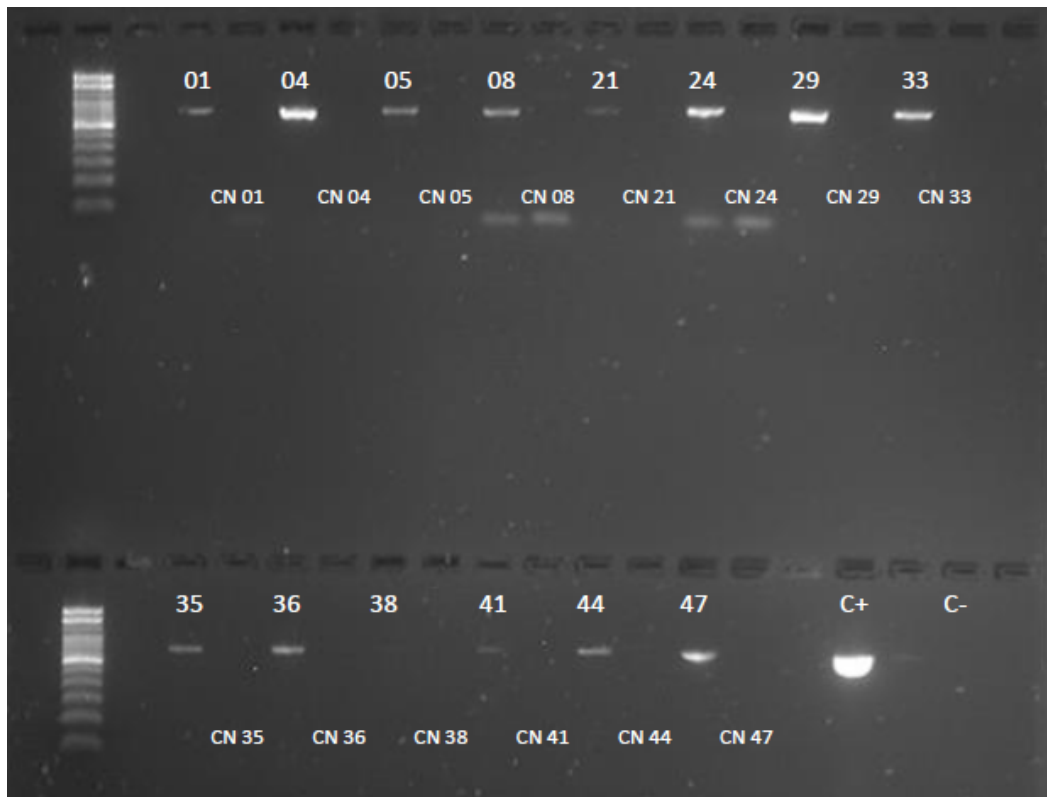
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene *rpoB*. Os isolados estão intercalados por seus respectivos controles negativos (CNs). Os controles positivo e negativo da reação são, respectivamente, o DNA do isolado Acb_41 e água DEPC. O marcador molecular utilizado foi o Ladder 100pb (Invitrogen).



Fonte: acervo pessoal (2020).

Todos os isolados apresentaram expressão gênica para *cas1* (Figura 13). Na foto o fragmento gerado a partir do isolado Acb_38 não foi visualizado no gel de agarose de forma nítida. Não foi identificado *amplicon* nos controles negativos.

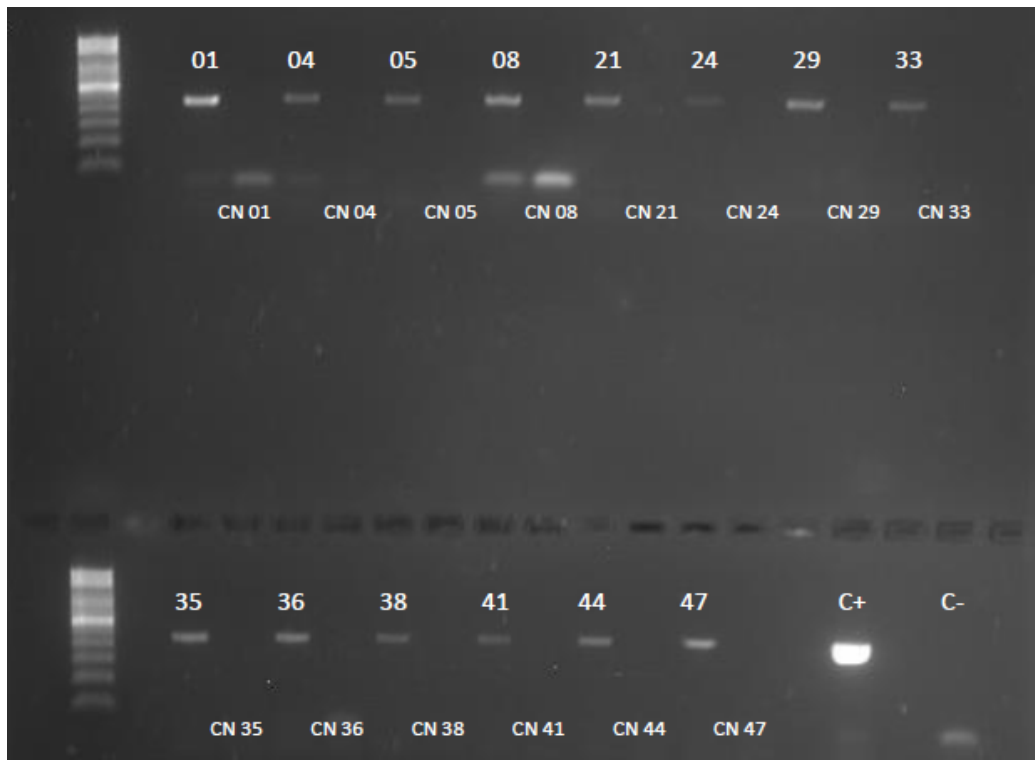
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene *cas1*. Os isolados estão intercalados por seus respectivos controles negativos (CNs). Os controles positivo e negativo da reação são, respectivamente, o DNA do isolado Acb_41 e água DEPC. O marcador molecular utilizado foi o Ladder 100pb (Invitrogen).



Fonte: acervo pessoal (2020).

Já para o gene *csy1*, foi constatada a sua expressão basal em todos os isolados utilizados no estudo (Figura 14). Também não foi identificado *amplicon* nos controles negativos.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para o gene *csy1*. Os isolados estão intercalados por seus respectivos controles negativos. Os controles positivo e negativo da reação são, respectivamente, o DNA do isolado Acb_41 e água DEPC. O marcador molecular utilizado foi o Ladder 100pb (Invitrogen).



Fonte: acervo pessoal (2020).

A ausência de fragmentos compatíveis com os tamanhos dos *amplicons* utilizados nos poços correspondentes aos controles negativos de cada isolado, confirma que as amplificações identificadas nos géis foram obtidas a partir do cDNA gerado no processo de transcrição reversa aplicada ao RNA extraído, e não do DNA genômico.

9 DISCUSSÃO

Acinetobacter baumannii possui um histórico de desenvolvimento de multirresistência aos antimicrobianos utilizados na clínica. Em estudo publicado em 2020, Camargo e colaboradores identificaram a ocorrência de cepas de *A. baumannii* com fenótipo de Resistência Extensiva às Drogas (XDR) em 26 hospitais brasileiros. Embora essa espécie tenha sido classificada pela OMS, em 2017, como patógeno de prioridade crítica para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (OMS, 2017; SHLAES; BRADFORD, 2018; TACCONELLI *et al.*, 2018), também se torna essencial a busca por novas estratégias terapêuticas.

A fagoterapia representa uma alternativa para o combate de infecções por microrganismos multirresistentes. Estudos recentes sugerem a eficácia dessa estratégia no tratamento de infecções por cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (HUA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2021). No entanto, devido à susceptibilidade a infecções por agentes virais, bactérias e arqueas evoluíram diversos sistemas de defesa contra tais invasores, como bloqueio de adsorção do fago, infecções abortivas e o sistema CRISPR/Cas (DORON *et al.*, 2018). Este sistema representa um tipo de mecanismo imune contra a invasão de elementos genéticos móveis, como bacteriófagos, e é considerado como um dos principais obstáculos para a aplicação da fagoterapia (AZAM; TANJI, 2019; CAFLISH; SUH; PATEL, 2019; PIRES *et al.*, 2020).

No presente estudo, os genomas investigados apresentaram diversas regiões correspondentes a bacteriófagos. As regiões consideradas incompletas, podem estar relacionadas a profagos crípticos, que perderam sua capacidade de montar partículas virais ou provocar a lise do hospedeiro, devido ao acúmulo de mutações. Essas regiões podem atuar como reservatórios de genes de virulência e resistência, também podendo colaborar na resposta do hospedeiro ao estresse ambiental (WANG; WOOD, 2016). As regiões questionáveis não contêm genes de profagos suficientes para serem consideradas profagos completos e funcionais, enquanto regiões intactas possuem a capacidade de realizar montagem da partícula viral e lisar a célula hospedeira, se induzidas (COLAVECCHIO *et al.*, 2017).

Existem evidências de que os fagos evoluíram formas de evadir essa defesa, para garantir sua sobrevivência e disseminação (MALONE; BIRKHOLZ; FINERAN, 2021), portanto, tais regiões podem ter sido geradas durante eventos de evasão à defesa conferida pelo sistema CRISPR/Cas (MALONE; BIRKHOLZ; FINERAN, 2021) ou herdadas a partir de células antecessoras, nas quais ocorrem as inserções dos bacteriófagos.

Dentre os espaçadores correspondentes a bacteriófagos, foram identificados fagos que possuem como alvo diferentes gêneros, além do gênero *Acinetobacter*, tendo em vista que a obtenção dos *loci* CRISPR também pode ocorrer por transferência horizontal de genes (GODDE; BICKERTON, 2006; HORVATH *et al.*, 2009). Esses espaçadores podem ter sido gerados por diferentes espécies durante contato com seus bacteriófagos específicos e obtidos por isolados de *A. baumannii*, já inseridos nos *loci* CRISPR.

Foi observada a similaridade de quatro bacteriófagos (vB_AbaS_TRS1, Ab105-2phi, Ab105-3phi e YMC11/11/R3177) com mais de um espaçador. A geração de múltiplos espaçadores, tanto para o profago quanto para regiões adjacentes do genoma, já foi evidenciada nos Sistemas tipo I e II. Essa geração ocorreria a partir de uma incorporação “acidental” do primeiro espaçador contra um profago já inserido, seguida de outros espaçadores, que garantiriam uma proteção completa (SEMENOVA, 2016; PYENSON; MARRAFFINI, 2020). Um dos mecanismos desenvolvidos pelos fagos para escape à defesa promovida pelo sistema CRISPR/Cas é o acúmulo de mutações pontuais. Dessa forma, quanto maior o número de espaçadores contra os invasores, presentes em um genoma, maior a capacidade do sistema em combater infecções promovidas por esses mutantes (MALONE; BIRKHOLZ; FINERAN, 2021).

Já os espaçadores que apresentam similaridade com mais de um bacteriófago, podem estar relacionados a genes codificantes para proteínas comuns entre diferentes bacteriófagos (ROHWER; EDWARDS, 2002).

O isolado Acb_41 apresentou um repertório de espaçadores contra bacteriófagos bastante divergente dos demais e é o único, entre os isolados estudados, que pertence ao ST 25. Cepas MDR pertencentes ao ST 25 e ao seu respectivo complexo clonal (CC25) foram identificadas em hospitais brasileiros,

sendo o CC25 considerado hiperendêmico no Brasil (DA SILVA *et al.*, 2018; CAMARGO *et al.*, 2020). Estudos anteriores evidenciaram que a estrutura e composição de espaçadores dos *loci* CRISPR dos genomas estudados, associadas às informações fornecidas pelo MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*), sugeriam que o isolado Acb_41 possui uma relação genética mais distante dos demais isolados estudados (SILVA, 2019).

Alguns isolados compartilham grupos específicos de espaçadores, como os isolados Acb_5 e Acb_29 que possuem oito espaçadores em comum. Esses, podem possuir relações genéticas mais próximas, como indicado em estudo anterior (SILVA, 2019).

Em sete dos 14 isolados estudados (Acb_5, Acb_24, Acb_29, Acb_33, Acb_35, Acb_38 e Acb_44) há a presença de profagos e de, pelo menos, um espaçador correspondente a eles, simultaneamente. Nos isolados Acb_24 e Acb_44, o fago Psymv2 corresponde a uma região classificada como intacta, ou seja, passível de indução. Tal fago pode estar sendo mantido em estado de dormência através da atuação do sistema CRISPR/Cas, cujos *loci* CRISPR contam com sequências espaçadoras específicas contra eles. As sequências espaçadoras correspondentes atuam como um guia para o reconhecimento das regiões de profagos, bloqueando sua expressão através da atuação das proteínas Cas. Assim, os profagos não poderiam sair do ciclo lisogênico para o ciclo lítico (EDGAR; QIMRON, 2010; NOBREGA, 2020).

Apesar de sua principal função ser inibir o sistema CRISPR/Cas para que elementos genéticos móveis possam evadir à imunidade promovida por ele, as proteínas anti-CRISPR também podem representar um papel protetor em relação à célula bacteriana. Os *loci* CRISPR que contenham espaçadores correspondentes a sequências próprias (STS, *Self-Targeting Spacers*), provavelmente, provocariam a morte celular quando expressos. Porém, a presença de genes *acr* inseridos no genoma dos hospedeiros, poderia impedir a clivagem do seu DNA, através da inibição do sistema CRISPR/Cas e do seu mecanismo de defesa (PAWLUK *et al.*, 2018). Estudos anteriores acerca da estrutura e composição dos *loci* CRISPR dos isolados utilizados evidenciaram a presença de espaçadores correspondentes aos genes próprios (SILVA, 2019); a ocorrência desses espaçadores não é rara, mas

existem sistemas que são muito mais propensos a incorporá-los, como o sistema tipo I-F (NOBREGA, 2020). No entanto, não foi possível identificar genes *acr* já descritos nos genomas estudados, sugerindo que o sistema CRISPR/Cas esteja livre para atuar no controle dos profagos. Dessa forma, a sobrevivência da célula, em relação aos espaçadores correspondentes a genes próprios, poderia estar relacionada a mecanismos de evasão à autoimunidade (NOBREGA, 2020).

A técnica de RT-PCR nos permitiu identificar os genes que são expressos em condições padrão de crescimento nos isolados utilizados no estudo. O gene *rpoB*, utilizado como controle da expressão gênica, foi amplificado em todos os isolados, e a ausência de amplificação para os controles negativos confirma que os *amplicons* identificados para os genes testados, foram formados a partir do cDNA e não de contaminações por DNA genômico.

O gene *cas1* codifica para a proteína Cas1, uma integrase, considerada como essencial para a etapa de adaptação e o processo de aquisição de novos espaçadores (WILKINSON *et al.*, 2016). Já o gene *csy1*, codifica para a proteína Csy1 que se associa às demais proteínas Csy (Csy2-4) para formar o complexo *csy*, em sistemas tipo I-F. Esse complexo é guiado até o alvo pelo crRNA (RICHTER *et al.*, 2012).

Estudos anteriores indicam a expressão constitutiva dos genes *cas*, bem como do crRNA, o que corrobora os resultados do presente estudo para *cas1* e *csy1* através da RT-PCR (DELTCHEVA *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2012). A produção constitutiva de tais proteínas e do crRNA é necessária para possibilitar uma resposta rápida às infecções, tendo em vista a velocidade com que bacteriófagos dominam a maquinaria do hospedeiro para a montagem de novas partículas virais. No, entanto, há a suposição de que o contato com os MGEs estimule a sinalização celular ou através de *quorum sensing* para aumentar o nível de expressão dos genes (PATTERSON *et al.*, 2016; PATTERSON; YEVSTIGNEYEVA; FINERAN, 2017). Para confirmação de tais informações, outros estudos são necessários sobre os mecanismos de ativação e funcionalidade do sistema CRISPR/Cas em isolados de *A. baumannii*.

10 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que, apesar da defesa promovida pelo sistema CRISPR/Cas, ainda podem ser identificadas regiões correspondentes a profagos passíveis de indução em genomas que contêm *loci* CRISPR. Tais regiões podem ter sido herdadas, adquiridas ou geradas durante eventos de evasão à defesa do sistema. Assim, quanto maior o repertório de espaçadores contra fagos e outros elementos genéticos móveis, maior a probabilidade e capacidade da célula bacteriana combater seus invasores. Além disso, a expressão constitutiva dos genes *cas1* e *csy1*, codificantes para proteínas essenciais ao funcionamento do sistema CRISPR/Cas, e a ausência de inibição por proteínas Anti-CRISPR indica que há uma resposta rápida aos contatos com elementos genéticos móveis, em condições normais de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ALKHNBASHI, O. S. *et al.* Characterizing leader sequences of CRISPR *loci*. **Bioinformatics**, v. 32, n. 17, p. i576–i585, 1 set. 2016.
- ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, H. B. Avaliação da atividade do sistema CRISPR/Cas de *Pseudomonas aeruginosa* e investigação de possíveis sistemas regulatórios. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, pg. 95, 2019
- AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 67, 2016.
- ANTUNES, L.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens and disease**, v. 71, n. 3, p. 292-301, 2014.
- ARANDA, J. *et al.* *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 15, p. 3740-3747, 2011.
- ARAÚJO LIMA, A. V. *et al.* Occurrence and diversity of intra-and interhospital drug-resistant and biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 7, p. 802-814, 2020.
- ARNDT, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.
- ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1249, 2018.
- AZAM, A. H.; TANJI, Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for

- phage therapy. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2121-2131, 2019.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.
- BARRANGOU, R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 4, n. 3, p. 267-278, 2013.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular cell**, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2014.
- BARROS, M. P. S. *et al.* Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. **PloS one**, v. 9, n. 9, 2014.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of bacteriology**, v. 95, n. 5, p. 1520-1541, 1968.
- BEGGS, C. B. *et al.* *Acinetobacter* spp. and the clinical environment. **Indoor and Built Environment**, v. 15, n. 1, p. 19-24, 2006.
- BEIJERINCK, M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. **Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam**, v. 19, p. 1092-103, 1911.
- BERGEY, D. H. *et al.* (EDS.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8th ed ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1974.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, abr. 1996.
- BOGAERTS, P. *et al.* Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4189-4192, 2006.
- BOLL, J. M. *et al.* Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00478-15, 2015.
- BOLOTIN, A. *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005.
- BONDY-DENOMY, J. *et al.* Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 429-432, 2013. BONOMO, R.

- A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. Supplement_2, p. S49-S56, 2006.
- BOUCHER, H. W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.
- BOUVET, P. J. M.; JEANJEAN, S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. **Research in microbiology**, v. 140, n. 4, p. 291-299, 1989.
- BRISOU, J.; PREVOT, A. R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. In: **Annales de l'Institut Pasteur**. 1954. p. 722-728.
- BROUNS, S. J. J. *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 960-964, 2008.
- BURMISTRZ, M.; PYRĆ, K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. **Polish journal of microbiology**, v. 64, n. 3, 2015.
- CAFLISCH, K. M.; SUH, G. A.; PATEL, R. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 17, n. 12, p. 1011-1041, 2019.
- CAI, Y. *et al.* Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1607-1615, 2012.
- CAMARENA, L. *et al.* Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, 2010.
- CAMARGO, C. H. *et al.* Genomic and phenotypic characterisation of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 6, p. 106195, 2020.

- CHANG, W. N. *et al.* Community-acquired *Acinetobacter* meningitis in adults. **Infection**, v. 28, n. 6, p. 395-397, 2000.
- CHARLEBOIS, R. L. *et al.* Sulfolobus genome: from genomics to biology. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 5, p. 584-588, 1998.
- CHARPENTIER, E. *et al.* Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 3, p. 428-441, 2015.
- CHEN, M.Z. *et al.* Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. **Chest**, v. 120, n. 4, p. 1072-1077, 2001.
- CHIANG, W.C. *et al.* Community-acquired bacteremic cellulitis caused by *Acinetobacter baumannii*. **Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi**, v. 102, n. 9, p. 650-652, 2003.
- CLEMMER, K. M.; BONOMO, R. A.; RATHER, P. N. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 9, p. 2534, 2011.
- COLAVECCHIO, A. *et al.* Prophage integrase typing is a useful indicator of genomic diversity in *Salmonella enterica*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1283, 2017.
- CONG, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.
- D'COSTA, V. M. *et al.* Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374-377, 2006.
- DE SÁ CAVALCANTI, F. L. *et al.* High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2017.
- DALLA-COSTA, L. M. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3403-3406, 2003.
- DEL MAR TOMAS, M. *et al.* Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonisation and infection. **Clinical microbiology and infection**, v. 11, n. 7, p. 540-546, 2005.
- DELTCHEVA, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602-607, 2011.

- DEXTER, C. *et al.* Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 5, p. 567-573, 2015.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939, 2007.
- DOI, Y. *et al.* Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 6, p. 980, 2009.
- DONG, D. *et al.* Structural basis of CRISPR–SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 436-439, 2017.
- DORON, S. *et al.* Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. **Science**, v. 359, n. 6379, 2018.
- DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 3, p. 349-358, 2013.
- DY, R. L. *et al.* Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. **Annual review of virology**, v. 1, p. 307-331, 2014.
- EDGAR, R.; QIMRON, U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from λ lysogenization, lysogens, and prophage induction. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 23, p. 6291-6294, 2010.
- EL SHAFIE, S. S.; ALISHAQ, M.; GARCIA, M. L. Investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in trauma intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 2, p. 101-105, 2004.
- EVANS, B. A.; HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 2, p. 223-238, 2013.
- FALAGAS, M. E. *et al.* Community-acquired *Acinetobacter* infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 12, p. 857-868, 2007.
- FARRUGIA, D. N. *et al.* The complete genome and phenome of a community-acquired *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

- FERNÁNDEZ-CUENCA, F. *et al.* Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: proyecto GEIH-Ab 2000. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 22, n. 5, p. 267-271, 2004.
- FINERAN, P. C. *et al.* Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. E1629-E1638, 2014.
- FISHBAIN, J.; PELEG, A. Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Clinical infectious diseases**, v. 51, n. 1, p. 79-84, 2010.
- FORTALEZA, C. M. C. B. *et al.* Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 2, p. 139-144, 2017.
- FOURNIER, P. E.; RICHET, H.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 5, p. 692-699, 2006.
- FRAGKOU, P. C. *et al.* The role of minocycline in the treatment of nosocomial infections caused by multidrug, extensively drug and pandrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a systematic review of clinical evidence. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 159, 2019.
- GALLAGHER, J. C.; ROUSE, H. M. Tigecycline for the treatment of *Acinetobacter* infections: a case series. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, n. 9, p. 1188-1194, 2008.
- GAO, J. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. **Plant molecular biology**, v. 87, n. 1-2, p. 99-110, 2015.
- GARNACHO-MONTERO, J.; AMAYA-VILLAR, R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. 4, p. 332-339, 2010.
- GARNACHO-MONTERO, J.; TIMSIT, J.F.. Managing *Acinetobacter baumannii* infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 32, n. 1, p. 69-76, 2019.
- GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J.. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 2, p. 277-282, 1991.

- GOTTESMAN, T. *et al.* An outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 dedicated hospital. **Infection Prevention in Practice**, v. 3, n. 1, p. 100113, 2021.
- GRADON, J. D.; CHAPNICK, E. K.; LUTWICK, L. I. Infective endocarditis of a native valve due to *Acinetobacter*: case report and review. **Clinical infectious diseases**, v. 14, n. 5, p. 1145-1148, 1992.
- GRASSELLI, G. *et al.* Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **Jama**, v. 323, n. 16, p. 1574-1581, 2020.
- GREENE, C. *et al.* Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. **Letters in applied microbiology**, v. 63, n. 4, p. 233-239, 2016a.
- GREENE, C. *et al.* The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. **American journal of infection control**, v. 44, n. 5, p. e65-e71, 2016b.
- GUO, T. W. *et al.* Cryo-EM structures reveal mechanism and inhibition of DNA targeting by a CRISPR-Cas surveillance complex. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 414-426. e12, 2017.
- HAFT, D. H. *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS computational biology**, v. 1, n. 6, 2005.
- HAN, W.; SHE, Q. CRISPR history: discovery, characterization, and prosperity. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2017. p. 1-21.
- HARDING, C. M. *et al.* *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00360-13, 2013.
- HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91, 2018.

- HARRINGTON, L. B. *et al.* A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1224-1233. e15, 2017.
- HASSAN, K. A. *et al.* Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20254-20259, 2013.
- HAUCK, Y. *et al.* Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeats analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.
- HENRICHSEN, J. Not gliding but twitching motility of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of clinical pathology**, v. 37, n. 1, p. 102, 1984.
- HENRIKSEN, S. D. Moraxella, *Acinetobacter*, and the Mimeae. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 4, p. 522–561, dez. 1973.
- HERMANS, P. W. *et al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Infection and immunity**, v. 59, n. 8, p. 2695-2705, 1991.
- HILLE, F.; CHARPENTIER, E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. **Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences**, v. 371, n. 1707, p. 20150496, 2016.
- HILLE, F. *et al.* The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.
- HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 167-170, 2010.
- HOWARD, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012.
- HSUEH, P.R. *et al.* Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 8, p. 827, 2002.
- HWANG, S.; MAXWELL, K. L. Meet the anti-CRISPRs: Widespread protein inhibitors of CRISPR-Cas systems. **The CRISPR journal**, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2019.

- ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.
- ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 7, p. e00580-17, 2018.
- ISLER, B. *et al.* New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01110-18, 2019.
- JANSSEN, P. *et al.* Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1179-1187, 1997.
- JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.
- JAWAD, A. *et al.* Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, 1998.
- JINEK, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.
- KARAH, N. *et al.* CRISPR-cas subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: evolution and utilization for strain subtyping. **PLoS One**, v. 10, n. 2, 2015.
- KAKASIS, A.; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 1, p. 16-21, 2019.
- KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current opinion in microbiology**, v. 37, p. 67-78, 2017.
- KULKARNI, S. S. *et al.* Identification of genus *Acinetobacter*: Standardization of in-house PCR and its comparison with conventional phenotypic methods. **Journal of laboratory physicians**, v. 9, n. 4, p. 279, 2017.
- LASHINSKY, J. N. *et al.* Minocycline for the treatment of multidrug and extensively drug-resistant *A. baumannii*: a review. **Infectious diseases and therapy**, v. 6, n. 2, p. 199-211, 2017.

- LEAL, N.C. *et al.* Comparative genomics of *Acinetobacter baumannii* clinical strains from Brazil reveals polyclonal dissemination and selective exchange of mobile genetic elements associated with resistance genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1176, 2020.
- LEE, J. *et al.* Potent Cas9 inhibition in bacterial and human cells by new anti-CRISPR protein families. bioRxiv, p. 350504, 2018.
- LESHO, E. *et al.* Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 7, p. 1142-1151, 2013-.
- LESSEL, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 213-214, 1971.
- LEUNG, W.S. *et al.* Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. **Chest**, v. 129, n. 1, p. 102-109, 2006.
- LEVY-BLITCHTEIN, S. *et al.* Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.
- LI, R. *et al.* Type I CRISPR-Cas targets endogenous genes and regulates virulence to evade mammalian host immunity. **Cell research**, v. 26, n. 12, p. 1273-1287, 2016.
- LIU, L. *et al.* Phage AcrIIA2 DNA mimicry: structural basis of the CRISPR and Anti-CRISPR arms race. **Molecular cell**, v. 73, n. 3, p. 611-620. e3, 2019.
- LOLANS, K. *et al.* Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2941-2945, 2006.
- LORTHOLARY, O. *et al.* Colonization by *Acinetobacter baumannii* in Intensive-Care-Unit Patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 188-190, 1998.
- MAEGELE, M. *et al.* The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. **Critical care medicine**, v. 33, n. 5, p. 1136-1140, 2005.

- MAKAROVA, K. S. *et al.* A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 2, p. 482-496, 2002.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology direct**, v. 1, n. 1, p. 7, 2006.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biology direct**, v. 6, n. 1, p. 38, 2011.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722-736, 2015.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-17, 2019.
- MAKAROVA KS *et al.* Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants **Nature Reviews Microbiology**, p. 67–83, 2020.
- MALI, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823-826, 2013.
- MALONE, L. M.; BIRKHOLZ, N.; FINERAN, P. C. Conquering CRISPR: how phages overcome bacterial adaptive immunity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, p. 30-36, 2021.
- MANCHANDA, V.; SINHA, S.; SINGH, N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 291, 2010.
- MARINO, N. D. *et al.* Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies. **Nature Methods**, p. 1-9, 2020.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **science**, v. 322, n. 5909, p. 1843-1845, 2008.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2010.

- MEDEIROS, M.; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 49, n. 6, p. 391-405, 2013.
- MOJICA, F. J. M. *et al.* Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 85–93, jul. 1995.
- 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*, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000.
- MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, v. 60, n. 2, p. 174-182, 2005.
- MOJICA, F. J. M. *et al.* Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, v. 155, n. 3, p. 733-740, 2009.
- MORRIS, F. C. *et al.* The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 1601, 2019.
- MONTERRUBIO-VILLAR, J. *et al.* Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 28, n. 10, p. 1281, 2009.
- MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. *Acinetobacter* infection. *New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 12, p. 1271-1281, 2008.
- MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Aerosolization of *Acinetobacter baumannii* in a trauma ICU. *Critical care medicine*, v. 41, n. 8, p. 1915-1918, 2013.
- MURRAY, C. K. *et al.* *Acinetobacter* infection: what was the true impact during the Vietnam conflict?. *Clinical infectious diseases*, v. 43, n. 3, p. 383-384, 2006.
- NAKATA, A.; AMEMURA, M.; MAKINO, K. O. Z. O. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*, v. 171, n. 6, p. 3553-3556, 1989.
- NAPIER, B. A. *et al.* Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *MBio*, v. 4, n. 3, p. e00021-13, 2013.

- NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 772-774, 2007.
- NEMEC, A. *et al.* *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1563-1567, 2003.
- NISHIMASU, H.; NUREKI, O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. **Current opinion in structural biology**, v. 43, p. 68-78, 2017.
- NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 209-211, 1988.
- NOBREGA, F. L. *et al.* Prophages are associated with extensive CRISPR–Cas auto-immunity. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 21, p. 12074-12084, 2020.
- NORTON, M. D.; SPILKIA, A. J.; GODOY, V. G. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 6, p. 1335-1345, 2013.
- NUÑEZ, J. K. *et al.* Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. **Nature structural & molecular biology**, v. 21, n. 6, p. 528, 2014.
- NUÑEZ, J. K. *et al.* Foreign DNA capture during CRISPR–Cas adaptive immunity. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 535-538, 2015.
- NWUGO, C. C. *et al.* Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **PloS one**, v. 7, n. 12, 2012.
- OLIVEIRA LUZ, A. C. *et al.* Analysis of direct repeats and spacers of CRISPR/Cas systems type IF in Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 294, n.5, p. 1095-1105, 2019.
- OLIVEIRA LUZ *et al.* Genetic characteristics and phylogenetic analysis of Brazilian clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* harboring CRISPR/Cas systems. **Current Genetics**, v. 1, p. 1-10, 2021. 10.1007/s00294-021-01173-4.
- PARTE, A. C. LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825-1829, 2018.

- PATTERSON, A.G. *et al.* Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems. **Molecular cell**, v. 64, n. 6, p. 1102-1108, 2016.
- PATTERSON, A.G.; YEVSTIGNEYEVA, M.S.; FINERAN, P.C. Regulation of CRISPR-Cas adaptive immune systems. **Current opinion in microbiology**, v. 37, p. 1-7, 2017.
- PAWLUK, A. *et al.* A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. **MBio**, v. 5, n. 2, 2014.
- PAWLUK, A. *et al.* Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. **Nature microbiology**, v. 1, n. 8, p. 1-6, 2016a.
- PAWLUK, A. *et al.* Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. **Cell**, v. 167, n. 7, p. 1829-1838. e9, 2016b.
- PAWLUK, A. *et al.* Disabling a Type I E CRISPR-Cas nuclease with a bacteriophage-encoded anti-CRISPR protein. **MBio**, v. 8, n. 6, 2017.
- PAWLUK, A.; DAVIDSON, A. R.; MAXWELL, K. L. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12, 2018.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- PENG, R. *et al.* Alternate binding modes of anti-CRISPR viral suppressors AcrF1/2 to Csy surveillance complex revealed by cryo-EM structures. **Cell research**, v. 27, n. 7, p. 853-864, 2017.
- PÉREZ-VARELA, M. *et al.* Mutations in the β -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Infection and immunity**, v. 85, n. 8, p. e00327-17, 2017.
- 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**, v. 151, n. 3, p. 653-663, 2005.
- PYENSON, N. C.; MARRAFFINI, L. A. Co-evolution within structured bacterial communities results in multiple expansion of CRISPR loci and enhanced immunity. **Elife**, v. 9, p. e53078, 2020.

- QURESHI, Z. A. *et al.* Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. **Clinical infectious diseases**, v. 60, n. 9, p. 1295-1303, 2015.
- RAUCH, B. J. *et al.* Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 150-158. e10, 2017.
- REID, G. E. *et al.* Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 27, n. 8, p. 1198-1201, 2007.
- REZAI, M. S. *et al.* Emergence of extensively drug resistant acinetobacter baumannii-encoding integrons and extended-spectrum beta-lactamase genes isolated from ventilator-associated pneumonia patients. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 10, n. 7, 2017.
- RICHTER, C.; CHANG, J. T.; FINERAN, P. C. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems. **Viruses**, v. 4, n. 10, p. 2291-2311, 2012.
- RODRÍGUEZ-BAÑO, J. *et al.* Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 10, p. 819-824, 2004.
- ROSSAU, R. *et al.* Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 310-319, 1991.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.
- ROYER, SABRINA *et al.* Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial bla OXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198643, 2018
- SCHULTE, B. *et al.* Clonal spread of meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in hospitals in the Mediterranean region and transmission to South-west Germany. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 356-357, 2005.
- SEBENY, P. J.; RIDDLE, M. S.; PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 444-449, 2008.

- SEED, K. D. Battling phages: how bacteria defend against viral attack. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004847, 2015.
- SEIFERT, H. *et al.* Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2819-2825, 1997.
- SEMENOVA, E. *et al.* Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 110–116, 2009.
- SEMENOVA, E. *et al.* Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10098-10103, 2011.
- SEMENOVA, E. *et al.* Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type IE CRISPR-Cas interfering complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7626-7631, 2016.
- SHARIFIPOUR, E. *et al.* Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2020.
- SHE, Q. *et al.* Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. **Extremophiles**, v. 2, n. 4, p. 417-425, 1998.
- SHE, Q. *et al.* The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 14, p. 7835-7840, 2001.
- SHLAES, D. M.; BRADFORD, P. A. Antibiotics—From There to Where?: How the antibiotic miracle is threatened by resistance and a broken market and what we can do about it. **Pathogens & immunity**, v. 3, n. 1, p. 19, 2018.
- SHINOHARA, D. R. *et al.* Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)–specific intensive care unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, p. 1-3, 2021.
- SILVA, A. **Análise estrutural do Sistema CRISPR/Cas em *Acinetobacter baumannii***. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 53. 2019.

- SMITH, M. G.; DES ETAGES, S. G.; SNYDER, M. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 9, p. 3874-3884, 2004.
- SNEATH, P. H. A.; MCGOWAN, V.; SKERMAN, V. B. D. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 225–420, 1 jan. 1980.
- SOUSA, C. *et al.* MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex species. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 5-6, p. 669-677, 2014.
- SPELLBERG, B.; REX, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 963-963, 2013.
- STERN, A. *et al.* Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity?. **Trends in genetics**, v. 26, n. 8, p. 335-340, 2010.
- STERNBERG, S. H. *et al.* Adaptation in CRISPR-Cas systems. **Molecular cell**, v. 61, n. 6, p. 797-808, 2016.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- TAKEUCHI, N. *et al.* Nature and intensity of selection pressure on CRISPR-associated genes. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 5, p. 1216-1225, 2012.
- TARAZI, Z. *et al.* Pharmacodynamics of minocycline against *Acinetobacter baumannii* in a rat pneumonia model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. e01671-18, 2019.
- THOMPSON, M. G. *et al.* Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1332-1342, 2014.
- TERNS, M. P.; TERNS, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 321-327, 2011.
- TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **Apmis**, v. 115, n. 5, p. 646-656, 2007.
- TOGNIM, M. C. B. *et al.* Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains:

- five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 284-291, 2004.
- TOGNIM, M. C. B. *et al.* Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 742-747, 2006.
- TOWNER, K. The genus *Acinetobacter*. **The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass**, p. 746-758, 2006.
- UNAL, S.; GARCIA-RODRIGUEZ, J. A. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, v. 53, n. 4, p. 265-271, 2005.
- VAN DEN BROEK, P. J. *et al.* Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999–2001. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 9, p. 837-843, 2006.
- VAN DER OOST, J. *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 479-492, 2014.
- VAN HOUTE, S. *et al.* The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. **Nature**, v. 532, n. 7599, p. 385-388, 2016.
- VILLEGAS, M. V.; HARTSTEIN, A. I. *Acinetobacter* Outbreaks, 1977–2000. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 4, p. 284-295, 2003.
- YI, H. *et al.* AcrFinder: genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. **Nucleic Acids Research**, 2020.
- YOSEF, I.; GOREN, M. G.; QIMRON, U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 12, p. 5569–5576, jul. 2012.
- YOUNG, J. C. *et al.* Phage-induced expression of CRISPR-associated proteins is revealed by shotgun proteomics in *Streptococcus thermophilus*. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e38077, 2012.
- WAGENVOORT, J. *et al.* Epidemic *Acinetobacter baumannii* strain with MRSA-like behaviour carried by healthcare staff. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 326, 2002.

- WANG, J. *et al.* Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 840-853, 2015.
- WANG, J. *et al.* AcrHub: an integrative hub for investigating, predicting and mapping anti-CRISPR proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D630-D638, 2021.
- WANG, X. *et al.* Structural basis of Cas3 inhibition by the bacteriophage protein AcrF3. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 9, p. 868-870, 2016.
- WANG, X.; WOOD, T. K. Cryptic prophages as targets for drug development. **Drug resistance updates**, v. 27, p. 30-38, 2016.
- WESTRA, E. R.; BUCKLING, A.; FINERAN, P. C. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. **Nature reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 317-326, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. **World Health Organization**, 2017.
- WILHARM, G. *et al.* DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 18, p. 4146-4153, 2013.
- WILKINSON, M. E. *et al.* Structural plasticity and in vivo activity of Cas1 from the type I CRISPR–Cas system. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 8, p. 1063-1072, 2016.
- WILKS, Mark *et al.* Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 654-658, 2006.
- WIMMER, F.; BEISEL, C. L. CRISPR-Cas systems and the paradox of self-targeting spacers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3078, 2020.
- ZEANA, C. *et al.* The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* does the community represent a reservoir?. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 4, p. 275-279, 2003.
- ZHOU, Y. *et al.* PHAST: a fast phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W347-W352, 2011.

APÊNDICE

Apêndice A – Sequências de proteínas específicas para o Sistema tipo I-F, obtidas a partir do banco de dados AcrHub. Destacadas em laranja estão as sequências de proteínas Acr validadas para o gênero *Acinetobacter*.

Anti-CRISPR (AcrHub)				
AcrHub ID	Nome (anti-CRISPRdb)	CRISPR alvo	Espécie (fonte)	Sequência
Acr00079	anti_CRISPR0015	I-F	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	MNAEYIVCAALWDMDFSKLVPFFAMDHTV RHPKFTSEYLAGQYAYYAATSRDVTNKRFT KDELKFLRELGIKFDADQALRYAVYLSGIL DYQSSKLLKWL
Acr00081	anti_CRISPR0017	I-F	<i>Acinetobacter sp. 1461402</i>	MNTFMTLSNADSVSAVVDVFINTVNDRKDH LVDHYGWGDVAATYELNDYAAAQYAWEA SEDNSIESIEANLEFIKDEGAKFNTENALKIA QLFLEA
Acr00082	anti_CRISPR0018	I-F	<i>Acinetobacter sp. 1461402</i>	MTLSNADSVSAVVDVFINTVNDRKDHLDH YGWGDVAATYELNDYAAAQYAWEASEDN SIESIEANLEFIKDEGAKFNTENALKIAQLFL EA
Acr00065	anti_CRISPR0001	I-F	<i>Pseudomonas phage JBD30</i>	MKFIKYLSTAHLNYMNIHAVYENGSKIKARV ENVVNGKSVGARDFDSTEQLESWFYGLPG SGLGRIENAMNEISRREN
Acr00066	anti_CRISPR0006	I-F	<i>Pseudomonas phage D3112</i>	MIAQQHKDTVAACEAAEAIKDKQVWDG EGYTKYTFDDNSVLIQSGTTQYAMDADDA DSIKGYADWLDDEARSAEASEIERLLESVE EE
Acr00067	anti_CRISPR0007	I-F	<i>Pseudomonas phage MP29</i>	MIAQQHKDTVAACEAAEAIKDKQVWDG EGYTKYTFDDNSVLIQSGTTQYAMDADDA DSIKGYADWLDDEARTAEDSEIKRLLLEAVE DEA
Acr00068	anti_CRISPR0003	I-F	<i>Pseudomonas phage JBD88a</i>	MSSTISDRIISRSVIEAARFIQSWEDADPDNL TESQVLAASSFAARLHEGLQATVLQRLVDE SNRDEYREFQAWEEALLNADGRVTSNPF DWGWYRIANVMLATASQNVGVAWGSH VHGRLMAIFQDRFQQHYEDEEC
Acr00069	anti_CRISPR0004	I-F	<i>Pseudomonas phage JBD5</i>	MSNTISDRIVARSVIEAARFIQSWEDADPDS LTEDQVLAAGFAARLHEGLQATVLQRLV DESNHEEYREFKAWEEALLNADGRVASSPF ADGWYRIANVMLATASQNVGVTWGS RVHGRLMAIFQDKFKQRYEEQA
Acr00070	anti_CRISPR0002	I-F	<i>Pseudomonas phage JBD24</i>	MMTISKTDIDCYLQTYVVIDPVSNGWQWG IDENGVGGALHHGRVEMVEGENGYFGLRG ATHPTEKEAMAAALGYLWKCRQDLVAIAR NDAIEAEKYRAKA

Acr00071	anti_CRISPR0005	I-F	<i>Pseudomonas phage JBD5</i>	MSRPTVVTVTETPRNPGSYEVNVERDGKM VVGRARAGSDPGAAAAMQAMAMEWGS PNYVILGSNKVLAFIPEQLRVKM
Acr00073	anti_CRISPR0009	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MKVPAFFAANILTIEQIIEAINNDGSAMTSAP EIAGYYAWDAATDALESENDLEQLTEDDFV AHLEVLEERGAKIDRDAAVAVALQFQAAAV NDLHSGDE
Acr00074	anti_CRISPR0010	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MKVPAFFAANILTIEQIIEAINNDGSAMTSAP EIAGYYAWDAATDALESENDLEQLTEDDFV AHLEVLEERGAKINRDAIAVALQFQAAAV NDLHSGDE
Acr00075	anti_CRISPR0011	I-F	<i>Oceanimonas smirnovii</i>	MTIYLSNAIENATSIEQVVELINEGTCEGME GIEFTADILAGQYAWSAAKDFVDSAGMTA DDLEAQLFLSAAGAVFSESVAVDHGLKLA AADTE
Acr00076	anti_CRISPR0012	I-F	<i>Methylophaga nitratireducenticr escens</i>	MAADFIKDANSIEQIVDGINTEASSEVKYF GEYKLDSGEKLAHYAYEQVANYEHISDD EIKTHLQELKSKDAHFDMNESLQIAKQFCS KCET
Acr00077	anti_CRISPR0013	I-F	<i>Methylophaga frappieri</i>	MISTALKQADSIEQVVQIIDNGGTAQHGPEE IAGQYAYLVMLHQKTVDKQAVKKPLDDL SQGAMFDYDLALQQAENLLLNLVET
Acr00078	anti_CRISPR0014	I-F	<i>Plesiomonas sp. ZOR0011</i>	MIDFNSIDHAIALIQKDPEQANAIAGEYAYQ MAREAYEIASESGFGMEDEDFEDQLEFLIN AGLVFDVQEAINKARSLHIANQSPC
Acr00080	anti_CRISPR0016	I-F	<i>Pasteurella multocida subsp. multocida str. Anand1 goat</i>	MTQLTAQQEKSIRAFKFQFNYPYGACGLGDV LTADEFERDDEESCIFMATAYALDGAYESGY FDIDNTEAQLALREHGAKFDFGKALEL
Acr00083	anti_CRISPR0019	I-F	<i>Proteobacteria bacterium CAG:139</i>	MRFTSPSRRTIPSICLAIYGCGQLDRVADFINN SGEYVEDGVTFTPGMIAGQYAFEQVKLDR KGYDTRRLQKYLFLADAGAFFSEEEALQR ADDLNNFTADFGHDEDGDATFRIKAQSYR LKKYDCHALWSMINQASLTIESVKPETFCD EDSDEDISSDSLVLTSRLFNKQNEAFATL TQYYTVSEGMLTVEDLLDYSLLDYPNFHD ESGKTYNLMENIAQRYYTECIKVVMDFYFR DAHKELPDVIRSEEITSMILQPMKLPIMAN
Acr00084	anti_CRISPR0021	I-F	<i>Pseudomonas phage LPB1</i>	MCLIWRHASHNGEAPTRIEAMTTFTSIVTT NPDFGGFEFYVEAGQQFDDSAAYEEAYGVS VPTAVVEEMNAKAAQLKDGEWLNVSHEA
Acr00085	anti_CRISPR0022	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MSHASHNGEAPKRIEAMTTFTSIVTTNPDF GGFEFYVEAGQQFDDSAAYEEAYGVSVP SAVVEEMNAKAAQLKDGEWLNVSHEA
Acr00086	anti_CRISPR0023	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDD SAAYEEAYGVSVP SAVVEEMNAKAAQLKDGEWLNVSHEA

Acr00087	anti_CRISPR0024	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDDS AYEEAYGVSVPASAVVEEMNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00088	anti_CRISPR0025	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDDS AYEEAYGVSVPPTAVVEEMNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00089	anti_CRISPR0026	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDDS AYEEAYGVSVPASAVIEEMNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00090	anti_CRISPR0027	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDES AYEEAYGVSVPASAVVEEMNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00091	anti_CRISPR0028	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDDS AYEEAYGVSVPASAVVEEVNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00092	anti_CRISPR0029	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTTFTSIVTTNPDFGGFEFYVEAGQQFDES AYEEAYGVSVPSSVVEEMNAKAAQLKDGE WLNVSHEA
Acr00093	anti_CRISPR0030	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTKFTSSVTTNPDFDGFNFYIEKGRQFDAE VYKEAYGINVPQDVIDDLNLKAEQLKDGE WLNVSHEA
Acr00094	anti_CRISPR0031	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTKFTSSVTTNPDFDGFNFYIEKGRQFDAE VYKEAYGINVPEVIDDLNLKAESLKDGE WLNVSHEA
Acr00095	anti_CRISPR0032	I-F	<i>Janthinobacterium sp. RA13</i>	MNNVTLEYSVVTNPDSFVGFKYYVKAGQ AFDADDFAYSYKLNRSDDLDPDSVLATREAA ANLQPGEWLTVSHSIAA
Acr00096	anti_CRISPR0033	I-F	<i>Janthinobacterium</i>	MNNVTLEYSVVTNPDSFVGFKYYVKAGQ AFDADDFAYSYKLNRSDDLDPDSVLATREAA ENLQPGEWLTVSHSIAA
Acr00097	anti_CRISPR0034	I-F	<i>Pectobacterium phage ZF40</i>	MARIAPNEDSTMSTAYIIFNSSVAAVVDTEI ANGANVTFSTVTVKEEINANRDFNLVNAQ NGKISRAKRWGNEASKCEYFGREINPTEFFI K
Acr00098	anti_CRISPR0035	I-F	<i>Serratia marcescens</i>	MVAIATYNVFNCSGWLEPILLRTMKMNIAY IIRNNTVIATVSTGLPNGTEIQYSHEKTREEL DANRDYNLLNAKSASAKISRAQRWEKEASKC SASAVEINPLEFLIVD
Acr00099	anti_CRISPR0036	I-F	<i>Delftia sp. 670</i>	MSYLISNGQIIAKTSATLASGQSVAFSGTRV AEEINAGRQWNLVNAQHATIGNGKTWDAK WAKLENGRMASEINPGEFFIA
Acr00100	anti_CRISPR0037	I-F	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	MSYLISNGQIVAKTSATLASGQSVAFSGTRV SEEINAGRKWNLVNAQRATIGNGKTWDAK WAKLEDGRMASEINPGEFFIA
Acr00101	anti_CRISPR0038	I-F	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MKAAYIIKEVQNINSEREGTQIEATSLSQAK RIASKEQCFHGTVMRIETVNLGLWLAYKED GKRWVDCQ

Acr00102	anti_CRISPR0039	I-F	<i>Proteus penneri</i> ATCC 35198	MKSTYIIKEVQNINSDREGVKVETTSLSAK RIASKNQFFHGTVLRIESESIGNWLAYKEDG KRWIECE
Acr00103	anti_CRISPR0040	I-F	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ATCC 33389	MIYYIVRYNIDHVSKRDAAPSLQHYQPAAG DIKMTTTTTYYFSESSSVNAIAQAEMLKATN LSDAKREASRRQCFQGTALKIGTIYSLNAN GLLVDEIASKEDGKKWVDY
Acr00104	anti_CRISPR0041	I-F	<i>Aggregatibacter actinomycetemco mitans serotype e str. SC1083</i>	MTNVVYYFTETNNINAYATAEALKAQTLA DAKREASRRQCFQGTTLKIGTIYSLNSDGL LVDEITSKEDGKKWVDY
Acr00105	anti_CRISPR0042	I-F	<i>Uncultured bacterium</i>	MNTTYVLRQSDNLVFNIEGETFTFMARRLA DVKRRAIRKQFHEDSNLRLLEDENGNVISIK RSGFKWEDKR
Acr00106	anti_CRISPR0043	I-F	<i>Aggregatibacter actinomycetemco mitans serotype b str. SCC1398</i>	MTTYFSETSNINAYATAEALKAQTLADAK REASRRQCFQGTTLKIGTIYSLNSDGLLVDE ITSKEDGKKWVDY
Acr00107	anti_CRISPR0044	I-F	<i>Aggregatibacter actinomycetemco mitans serotype b str. SCC1398</i>	MTNVIYYFTETNNINAYTTAEALKAQTLAD AKREASRRQCFQGTTLKIGTIYSLNSDGLLV DEITSKEDGRKWVDY
Acr00108	anti_CRISPR0045	I-F	<i>Aggregatibacter actinomycetemco mitans D11S-1</i>	MINERQEIKMTTYFSETSNINAYATAEAL KAQTLADAKREASRRQCFQGTTLKIGTIYS LNSDGLLVDEITSKEDGKKWVDY
Acr00109	anti_CRISPR0046	I-F	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	MTTTTTYYFSESSSVNAIAQAEMLKATNLSD AKREASRRQCFQGTALKIGTIYSLNANGLL VDEIASKEDGKKWVDY
Acr00110	anti_CRISPR0047	I-F	<i>Haemophilus ducreyi</i>	MTTYFETETNDRKAYRQAEALKAQTLADA KREATRRQVFYGTVLKIGTIYSLNANGLLV SEISYKDGDKWTDI
Acr00111	anti_CRISPR0048	I-F	<i>Desulfobulbus sp. Tol-SR</i>	MKYIVKEMQGAQSLRDGMVVEAKTLRWA KCLAAKLQAFRGTVMRVEDMDGTILALKV NRKWENVNPDNNS
Acr00112	anti_CRISPR0049	I-F	<i>Xanthomonas fragariae LMG 25863</i>	MGP GKKEKIIMANPVYYIREAQGWAAACN AKTMPAAKRAAVRAQMFQGTDVVWGSVV GEVIEPVAIKRHPDALNMSSRGRWVELDPA HCSVGDGFGRI
Acr00113	anti_CRISPR0050	I-F	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	MTTFHIENARIETITDFDMVIFDLVTDLGRV DLAEHINYDRDGDGFKSIESTDNSIRCNLEEE LCSVDFMSEKPSLMPEIDYVPFAEVIEAVEE MLEA
Acr00114	anti_CRISPR0051	I-F	<i>Shewanella xiamenensis</i>	MTTFRIENVRIETINDFDMVKFDLVTDLGR VELAEHVNYDSEGDFKSVEYTDNIRYNM VDELCSVFDLTDKPSLMPAIDYVTFAEIIEAV EEMLEA
Acr00115	-	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MSMELFHGSYEEISEIRDSGVFGGLFGAHE KETALSHGETLHRIISPLPLTDYALNYEIESA WEVALDVAGGDENVAEAIMAKACESDSND

				GWELQRLRGVLAVRLGYTSVEMEDEHGTT WLCLPGCTVEKI
Acr00116	-	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MAYEKTWHRDYAAESLKRAETSRWTQDA NLEWTQLALECAQVVHLARQVGEELGNE KIIGIADTVLSTIEAHSQATYRRPCYKRITTA QTHLLAVTLLERFGSARRVANAVWQLTDE IDQAKA
Acr00117	-	I-F	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MKLLNIKINEFAVTANTEAGDELYLQLPHTP DSQHSINHEPLDDDDFVKEVQEICDEYFGK GDRTLARLSYAGGQAYDSYTEEDGVYTTN TGDQFVEHSYADYYNVEVYCKADLV
Acr00118	-	I-F	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MKKIEMIEISQNRQNLTAFLHISEIKAINAKL ADGVDVDKKSFDEICIVLEQYQAKQISNK QASEIFETLAKANKSFKIEKFRCSHGYNIEY KYSPDHEAYLFYCKGGQGQLNKLIAENGR FM
Acr00119	-	I-F	<i>Klebsiella michiganensis</i>	MTTITIAEYVSNDK VETIKTMVESQQIHNV NFNNGEFTIERGDFTSIDKDEAEHVKLLNKI QDIIHGYS
Acr00120	-	I-F	<i>Pectobacterium parmentieri</i>	MSLSDKKEQKEAYLDALRIAPLDRGV LKRI HAVNDNTLDKWLYVADRYPTFRACWELW MFQRKRRVLISRKLHVLINRSTNRTIEAFEK TYPPEERVVGKSYRDLVTEKGERSANMYII NGEVVGAKDASILLGYSSYNTLYAKMKRL GIQPGDDISHLKPEKRGRKKECS
Acr00121	-	I-F	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	MFSEIKFSSLSHDHALAELIKMAMEEFQQR LI KPGVNTIKTVDVEPVVLHAPSDNEMVFINN CLKKRRAGEYIHASHMKDKYRDLTRKYPQW FSVKAYPDDLGRGSVSKHYVDYFTKKE
Acr00123	-	I-F	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	MKPLHTMNYDNNQMSLVYESYDEYGF EY SVKLLKISVRDYRGIDVSAFNAFPEWEDTLR MRDRVMSVEEIENAMISRYKSLFIAPPDCTY EFDI
Acr00124	-	I-F	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	MTKSEIFKFAWVDAHYLATTGGNAVEYFA ECLKKSHMINRTTAVSFEQKEYAVDVAYAAI TILADGAVL
Acr00125	-	I-F	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	MTSIKTIEYKGNTLTLQKDSADCISYEILL RDPIKHWVGRDVQILNIDSSTSVDVFYK KF SDSELASMMQREYDDCFPLQVTATLESVIE AGDINTKWFVNDDETGALSGKYGSVYTES GWYICNESGEKIENKLTENQISSIRVAMDRG DTATYSWEFDD
Acr00127	-	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MTNFQTWLDSADIPVQQNGQWIDLETGIA YDPSYNYAANTRRASLSPRGIDARAVAKTF GGRALTGTARQKEWAEKIRAEKVQQMNQ DQAEMACDPSGLLTAAKFWIENRNDSAQEI AGFVMQQKALLAQHRSAKAAGQADKVAK IAAEYNALTARWGF

Acr00128	-	I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MNAIHIGPFSITPAARGLHYGGLPHHQWTL YYGPREMAIKTLPDSYTSSEVRDEFSDIAE FVIDARHRYAPDVLELVNSDGDVAVLARVAV SRLPEALSGCIPDDRFPYWLLTASRPRGLP VTLNEYTALAVELSAPPLAWITGLLPGEVLT HDAEEWRPPTSWELRHVVGEGSFTGVSGA AAAALLGMSATNFRKYTAGDSAANRQKIS FAAWHYLLDRLGVKRAS
Acr00063	-	I-E, I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MSTQYTYQQIAEDFRLWSEYVDTAGEMSK DEFNSLSTEDKVRLQVEAFGEEKSPKFSTK VTTKPDFDGFQFYIEAGRDFDGDAYTEAYG VAVPTNIAARIQAQAAELNAGEWLLVEHEA
Acr00072	anti_CRISPR0008	I-E, I-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MKVPAFFAANILTIEQIIEAINNDGSAMTSAP EIAGYYAWDAATDALESENDLEQLTEDDFV AHLEVLEERGAKIDRDAIAVALQFQAAAV NDLHSGDE
Acr00122	-	I-E, I-F	<i>Serratia marcescens</i>	MTTIKAAYISKDQNWNDGTTTYWFDVNGE TFGVVHGGESWNAKVVDGCDGAPSDQYTV DQFNITEDMIAE
Acr00126	-	I-E, I-F	<i>Pectobacterium parmentieri</i>	MSKKFLEIVGNASTSATFNGKLIGHNVNAS AYEKDGEIIIHLETNGSRWKSSPEVRMTKEE YDSFCEKQSRPLFVRGIELFGAEALLS

Fonte: AcrHub (<https://pacrispr.erc.monash.edu/AcrHub/browse.jsp>, acesso em 8 de janeiro de 2021 às 11:47).