



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JESARELA MERABE SILVA FREIRE

ANÁLISES *IN SILICO* DE ILHAS GENÔMICAS EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* COM ÊNFASE A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

**JOÃO PESSOA
2019**

JESARELA MERABE SILVA FREIRE

ANÁLISES *IN SILICO* DE ILHAS GENÔMICAS EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* COM ÊNFASE A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado a/ao Coordenação /Departamento do Curso Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito final à obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular/ Bioinformática.

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Santos Pontes

Coorientadora: Prof. Ms. Nyedja Fialho Morais Barbosa

**JOÃO PESSOA
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F866a Freire, Jesarela Merabe Silva.
Análise in silico de ilhas genômicas em *Acinetobacter baumannii* com ênfase a genes de resistência a antibióticos [manuscrito] / Jesarela Merabe Silva Freire. - 2019.
46 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Daniela Santos Pontes ,
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
"Coorientação: Profa. Ma. Nyedja Fialho Morais Barbosa ,
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Ilhas genômicas. 3.
Transferência gênica horizontal. I. Título
21. ed. CDD 572.8

JESARELA MERABE SILVA FREIRE

ANÁLISES IN SÍLICO DE ILHAS GENÔMICAS EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* COM ÊNFASE A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado a/ao Coordenação /Departamento do Curso Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito final à obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular/Bioinformática

Aprovada em: 13/06/2019.

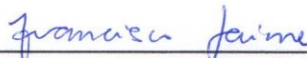
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniela Santos Pontes (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Brígida Thaís Luckwu de Lucena
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A meus pais, minha irmã e amigos,
pela compreensão, companheirismo
e amizade, DEDICO.

“Ser biólogo não é um trabalho, é um modo de vida”
Ernst Mayr

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fluxograma das etapas e programas utilizados no trabalho.....	16
Figura 2 –	Padrão das IGs em relação aos genomas.....	21
Figura 3 –	Padrão das IGs em relação à presença de genes de resistência...	23
Figura 4 –	Distribuição das proteínas dentro dos IGs de acordo com a COG	27
Figura 5 –	Representação gráfica dos arranjos dos cassetes gênicos presentes nos integrons em <i>A. baumannii</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genomas e isolados estudados.....	19
Tabela 2 – Genes de resistência presentes nas IGs.....	25
Tabela 3 – Profagos anotados nas IGs de <i>A. baumannii</i>	28
Tabela 4 – Arranjos dos cassetes gênicos presente nos integrons em <i>A. baumannii</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC3-I	Aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase
AAC6-Ib	Aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase
Acetyltransf_10	Acetiltransferase
AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
ANT2	Aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase
ANT3	Aminoglicosídeo 3-N-Acetiltransferase
<i>attI</i>	Sítio de recombinação
C	Produção e conversão de energia
CALIN	Grupos de sítios attC sem integrons-integrases
CDD	Banco de Dados de Domínio Conservado
CDS	Sequência codificadora
CAT	Cloranfenicol acetiltransferase
COG	Grupos de genes ortólogos
D	Controle do ciclo celular, divisão celular, partição de cromossomos
E	Transporte e metabolismo de aminoácidos
emrE	Transportador de efluxo de drogas
F	Transporte e metabolismo de nucleotídeos
G	Transporte de carboidratos e metabolismo
H	Transporte de coenzima e metabolismo
HMM	Modelo Oculto de Markov
I	transporte lipídico e metabolismo
ICEs	Elementos integrativos e conjugativos
IGs	Ilhas genômicas
IS	Sequência de Inserção
J	Tradução, estrutura ribossômica e biogênese
K	Transcrição
Kb	Quilobase – mil pares de bases
L	Replicação, Recombinação e Reparo
M	Biogênese da parede celular / membrana / envelope
MB	Megabase – um milhão de pares de bases
SMR	Proteína pertencente à família de pequenas proteínas Resistentes
N	Motilidade celular
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O	Modificação pós-traducional, turnover de proteína chaperonas
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
P _c	Promotor constitutivo
P _{intl}	Promotor
Q	Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários
QAC	Compostos de amônio quaternário
QCCs	Compostos de cátions quaternários
S	Função desconhecida
TGH	Transferência Gênica Horizontal
Tn	Transposon
U	Tráfego, secreção e transporte vesicular intracelular
V	Mecanismos de defesa

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
\geq	Maior ou igual que
<	Menor que
ρ	Rho
%	Porcentagem
P	p-valor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	METODOLOGIA.....	14
2.1	Levantamento de dados.....	14
2.2	Caracterização dos genomas completos.....	14
2.3	Caracterização das Ilhas Genômicas preditas pelo <i>ISLANDVIEWER 4</i>	15
2.3.1	<i>Levantamento e caracterização dos genes de resistência presentes nas IGs</i>	16
2.4	Classificação funcional das proteínas nas IGs de acordo com o grupo de proteínas ortológicas (COG).....	17
2.5	Detecção de profagos nas IGs de <i>A. baumannii</i>	17
2.6	Detecção de integrons nas IGs de <i>A. baumannii</i>	18
2.7	Detecção das Sequências de Inserção (ISs) e Transposons (Tns) nas IGs	18
2.8	Análises estatísticas.....	18
3	RESULTADOS.....	18
3.1	Caracterização dos genomas completos.....	18
3.2	Caracterização das Ilhas Genômicas preditas pelo <i>ISLANDVIEWER 4</i>	20
3.2.1	<i>Levantamento e caracterização dos genes de resistência presentes nas IGs</i>	24
3.3	Classificação funcional das proteínas nas IGs de acordo com a COG.....	27
3.4	Detecção de profagos nas Ilhas genômicas de <i>A. baumannii</i>	27
3.5	Detecção de integrons nas IGs de <i>A. baumannii</i>	29
3.6	Identificação das ISs e Tns.....	31
4	DISCUSSÃO.....	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICE 1 – DADOS DAS ILHAS E DOS GENOMAS.....	43
	APÊNDICE 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ISS E TNS DE ACORDO COM A FAMÍLIA.....	44

ANÁLISE *IN SILICO* DE ILHAS GENÔMICAS EM *ACINETOBACTER BAUMANNII* COM ÊNFASE A GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

ANALYSIS *IN SILIC* OF GENOMIC ISLANDS IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* WITH EMPHASIS ON ANTIBIOTICS RESISTANCE GENES

Jesarela Merabe Silva Freire¹
Nyedja Fialho Morais Barbosa²
Daniela Santos Pontes³

RESUMO

Ilhas genômicas (IGs) são definidas como grandes regiões do genoma bacteriano que são transferidas horizontalmente, e podem conter genes que codificam funções adaptativas como a resistência aos antibióticos. A transferência gênica horizontal (TGH) é o principal mecanismo responsável pela disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos em procariotos. Em *Acinetobacter baumannii*, patógeno encontrado principalmente em ambientes nosocomiais, a presença das IGs contribui para a diversidade e evolução dessas bactérias e emergência de linhagens multirresistentes. A resistência na espécie *A. baumannii* representa um risco a saúde pública. Diante da escassez de estudos comparativos sobre a presença de IGs em diferentes isolados dessa espécie, este estudo teve como principal objetivo analisar e caracterizar as ilhas genômicas presentes em diferentes isolados nosocomiais de *A. baumannii* considerando a presença de genes de resistência aos antibióticos e os elementos genéticos móveis. Para as análises das IGs foram utilizados todos os 82 genomas de *A. baumannii* disponíveis no servidor *ISLANDVIEWER 4*. As IGs foram exploradas em relação a presença de genes de resistência aos antibióticos, fagos, integrons, sequências de inserção (IS) e transposons (Tn), além da importância desses fatores para a disseminação e evolução da resistência antimicrobiana e adaptação e diversificação desses microrganismos. Dos 82 genomas de *A. baumannii* analisados foram detectadas 878 ilhas genômicas abrangendo um total de 21 Mb. Foi observado que o tamanho dos genomas de *A. baumannii* sofre influência do número e do tamanho total de ilhas por genoma. Contudo, o número de genes de resistência presentes nas IGs por genoma não apresentou relação direta com o número e tamanho total de ilhas por genoma. Dentro das IGs várias proteínas funcionalmente identificadas representam importantes adaptações adquiridas para evolução dessas bactérias, incluindo genes de resistência aos antibióticos. Foram encontrados 621 genes de resistência nas IGs analisadas com prevalência dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas, beta-lactâmicos e cloranfenicol. Os resultados mostram a diversidade dos elementos geneticamente móveis identificados e associação desses elementos aos genes de resistência, mostrando a importância dos mesmos no processo de TGH da resistência em ambientes hospitalares. A análise das IGs, mostrou a importância dessas regiões na aquisição de genes de resistência pelo *A. baumannii* de origem clínica, representando, também, uma fonte de

¹ Graduanda, aluna, Ciências Biológicas.

Jesarela-msf@hotmail.com

² Mestre, professora, Ciências Biológicas.

nyedjaf@gmail.com

³ Doutorado, professora, Ciências Biológicas.

danisp_bio@cbsa.uepb.edu.br

disseminação desses genes para outras espécies bacterianas. A presença de IGs em *A. baumannii* é relevante para a compreensão da multiresistência apresentada por este microrganismo e para o desenvolvimento de novas drogas.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. Ilhas genômicas. Transferência Gênica Horizontal.

ABSTRACT

Genomic islands (GIs) are defined as large regions of the bacterial genome that are transferred horizontally, and may contain genes encoding adaptive functions such as resistance to antibiotics. Horizontal gene transfer (TGH) is the main mechanism responsible for the spread of antimicrobial resistance genes in prokaryotes. In *Acinetobacter baumannii*, a pathogen found mainly in nosocomial environments, the presence of GI contributes to the diversity and evolution of these bacteria and the emergence of multiresistant strains. The resistance to the *A. baumannii* species represents a public health risk. In view of the scarcity of comparative studies on the presence of GIs in different isolates of this species, this study had as main objective to analyze and characterize the genomic islands present in different nosocomial isolates of *A. baumannii* considering the presence of resistance genes to antibiotics and the elements genetics. For the GI analyzes, all 82 *A. baumannii* genomes available on the *ISLANDVIEWER 4* server were used. The GIs were explored for the presence of antibiotic resistance genes, phages, integrons, insertion sequences (IS) and transposons (Tn), besides the importance of these factors for the dissemination and evolution of antimicrobial resistance and adaptation and diversification of these microorganisms. Of the 82 *A. baumannii* genomes analyzed, 878 genomic islands were detected covering a total of 21 Mb. It was observed that the size of the *A. baumannii* genomes is influenced by the number and size of islands per genome. However, the number of resistance genes present in IGs per genome was not directly related to the number and total size of islands per genome. Within the GIs several functionally identified proteins represent important acquired adaptations for evolution of these bacteria, including antibiotic resistance genes. We found 621 resistance genes in the GIs analyzed with prevalence of resistance genes to aminoglycosides, sulfonamides, beta-lactams and chloramphenicol. The results show the diversity of the genetically modified elements identified and the association of these elements with the resistance genes, showing the importance of these elements in the TGH process of resistance in hospital environments. The analysis of the GIs showed the importance of these regions in the acquisition of *A. baumannii* resistance genes of clinical origin, also representing a source of dissemination of these genes to other bacterial species. The presence of GIs in *A. baumannii* is relevant for the understanding of the multiresistance presented by this microorganism and for the development of new drugs.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*. Genomic Islands. Horizontal Gene Transfer.

1 INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii (BOUVET; GRIMONT, 1986) é um cocobacilo gram-negativo (CHANG et al., 2015; CHERKAOUI et al., 2015), não fermentativo, estritamente aeróbio, não móvel, catalase positivo e oxidase negativo. Esses microrganismos pertencem ao Filo das Proteobactérias, família Moraxellaceae (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Essa bactéria tem sido isolada de solos contaminados por petróleo, solos agrícolas, animais, humanos, plantas, rios, lagos, esgotos e de superfícies inanimadas, e essa ubiquidade se deve a capacidade que o *A. baumannii* possui de utilizar diversas fontes metabólicas de carbono, permitindo assim, sua sobrevivência nos mais diferentes ambientes (JUNI, 1978; ALSAN; KLOMPAS, 2010; EVEILLARD et al., 2013); *A. baumannii* tem emergido como um importante patógeno nosocomial (SARHADDI et al., 2017), sendo encontrado principalmente em unidades de terapia intensiva (SEWARD; LAMBERT; TOWNER, 1998; ZANDER et al., 2014; MORADI, 2015). É uma bactéria oportunista e mais comumente envolvida em infecções hospitalares (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; ZANDER et al., 2014) sendo associada a infecções de pele, do trato urinário, septicemia, e a doenças como pneumonia, meningite e endocardite (PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; RAZAVI NIKOO; ARDEBILI; MARDANEH, 2017).

A. baumannii destaca-se por sua resistência antimicrobiana inata e adquirida (HIGGINS et al., 2009). E apresenta uma excelente capacidade de adquirir DNA exógeno, que conferem resistência a antibióticos e patogenicidade, aumentando sua diversidade genética (ZHU et al., 2013). Atualmente, é possível encontrar isolados dessa espécie que apresentam resistência a maioria dos antibióticos clinicamente disponíveis (LEE et al., 2017), causando preocupação aos sistemas de saúde, devido ao aumento dos casos de incidência das infecções hospitalares causadas por *A. baumannii* e do rápido aumento e disseminação da resistência (MORADI et al., 2015; NOWAK et al., 2017). Em uma lista publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, *A. baumannii* resistente aos carbapenems é a primeira bactéria na classificação crítica da lista de patógenos prioritários para a pesquisa de novos antibióticos (<https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>) (TACCONELLI et al., 2018).

O rápido aumento de isolados de *A. baumannii* multirresistentes, não é apenas resultado do aumento do uso de antibióticos ou da presença de genes intrínsecos de resistência, mas principalmente, da excelente capacidade que eles possuem de adquirir genes através da transferência gênica horizontal (TGH). A TGH é um importante mecanismo na evolução de bactérias (SOUCY; HUANG; GOGARTEN, 2015), pois permite a disseminação e a aquisição de genes que conferem características adaptativas, como os genes de resistência a antibióticos (BURMEISTER, 2015). A TGH pode ocorrer por transformação, conjugação ou transdução. A transformação é um mecanismo que permite que a bactéria incorpore DNA livre ao seu genoma. A conjugação ocorre através do contato direto entre uma célula doadora e uma célula receptora, e permite a transferência unidirecional de material genético. A transdução, por sua vez, ocorre através de um bacteriófago que transfere o DNA de uma célula para outra (RAZ; TANNENBAUM, 2010; ARBER, 2014; DAUBIN; SZÖLLÖSI, 2016). Através da TGH, a aquisição de elementos gênicos móveis (MGEs), como transposons (Tns), integrons e Ilhas genômicas (IGs) (DEYLAM SALEHI et al.,

2017) constitui um importante fator para emergência de bactérias resistentes (TUON; ROCHA; MERLINI., 2015; CHA et al., 2018).

Regiões maiores do genoma, denominadas IGs, podem ser transferidas de uma bactéria para outra (MESSERER; FISCHER; SCHUBERT, 2017). As IGs são definidas como segmentos discretos de DNA, e que diferem entre bactérias estreitamente relacionadas (JUHAS et al., 2009). São sequências grandes de DNA, com um comprimento variando normalmente entre 4,5 kb a 600 kb (LU; LEONG, 2016). Possuem um conteúdo diferente de G + C em comparação com o resto do genoma hospedeiro, são frequentemente flanqueadas por genes que codificam RNA transportadores (tRNA), e por repetições diretas (JUHAS et al., 2009; DOBRINDT et al., 2004). Além disso, são conhecidas por transportarem e codificarem fragmentos de outros elementos genéticos móveis funcionais ou degenerados, como bacteriófagos, sequência de inserção (IS), Tns, plasmídeos e integrases (DOBRINDT et al., 2004; DARMON; LEACH, 2014; ZHANG et al., 2015; AL-JABRI et al., 2018). As IGs móveis podem ser transferidas para um novo hospedeiro como elementos integrativos e conjugativos (ICEs) e por meio dos profagos (LU; LEONG, 2016). Ao longo dos anos, várias funções adaptativas importantes codificadas por genes presentes nas ilhas bacterianas foram observadas, e mostraram contribuir para o estilo de vida único das bactérias (HSIAO et al., 2005). As IGs carregam genes associados a atividades metabólicas adicionais e codificam proteínas de superfície celular, de interação com o hospedeiro, de ligação ao DNA, relacionadas aos fagos, de resistência a antibióticos e metais, e de simbiose (HACKER; KAPER, 2000; WAACK et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

As IGs podem ser subclassificadas pela função que os genes desempenham, como ilhas de resistência, ilhas de patogenicidade, ilhas metabólicas ou de ilhas de simbiose (JUHAS et al., 2009; SHAH et al., 2014). As IGs que contêm marcadores de resistência são classificadas como Ilhas de Resistência (REIs), e possuem grupos de genes que conferem resistência a diversos antibióticos e a metais pesados (PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; LIU et al., 2013; LU; LEONG, 2016). Pagano et al., 2016) (Liu et al., 2013) (LU; LEONG, 2016). Estudos revelaram que os genomas de alguns isolados de *A. baumannii* abrigam grandes IGs que apresentam entre o grupo gênico adquirido horizontalmente, genes que conferem resistência a múltiplos antibióticos. (KRIZOVA; DIJKSHOORN; NEMEC, 2011; FARRUGIA et al., 2013; PAGANO; MARTINS; BARTH, 2016; ZHANG et al., 2017). Além disso, a presença dessas ilhas associadas a elementos móveis contribui para plasticidade genômica de *A. baumannii*, e também pode explicar em parte a evolução bem sucedida dessa bactéria como um importante patógeno nosocomial (ROCA SUBIRÀ et al., 2012).

O aumento de genomas de isolados de *A. baumannii* sequenciados, mostrou a presença de uma extraordinária variedade de IGs, que contribui para a diversidade e adaptação dessa bactéria (SHAH et al., 2014). A identificação de IGs em *A. baumannii* é de interesse médico e mundial. Com o crescente e contínuo avanço das tecnologias para estudos moleculares, a bioinformática tornou-se fundamental para o processamento dos milhares de dados gerados. Atualmente diversas ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas para identificar e analisar IGs, uma vez que estas constituem importantes componentes do genoma com papel relevante na adaptação e evolução bacteriana (BUSH et al., 2018). O ISLANDVIEWER é considerado uma das melhores ferramentas disponíveis para análise de IGs em genomas bacterianos e de arqueias e integra quatro diferentes métodos de predição

dessas ilhas (LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2010; FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012; DA SILVA FILHO, 2018). Considerando que a presença de IGs associadas a genes de resistência aos antibióticos é uma evidência da sua importância no desenvolvimento e dispersão da resistência hospitalar, este trabalho teve como objetivo principal realizar uma análise e caracterização das IGs encontradas em diferentes isolados nosocomiais de *A. baumannii*, disponíveis no programa ISLANDVIEWER 4, com ênfase na presença de genes de resistência a antibióticos. A análise e caracterização de IGs em diferentes isolados de *A. baumannii* nosocomiais é relevante para uma melhor compreensão da resistência nessa espécie e da emergência de isolados multirresistentes, e as consequências que podem advir para saúde pública e ambiental

2 METODOLOGIA

2.1 Levantamento de dados

Neste trabalho, 82 isolados da bactéria *A. baumannii* foram coletados. Todos os 82 genomas de *A. baumannii* disponíveis no banco de dados do programa computacional *ISLANDVIEWER4* foram selecionados para este trabalho. Os genomas e as IGs foram obtidos diretamente no *ISLANDVIEWER4* durante o período de levantamento de dados (agosto de 2018). O *ISLANDVIEWER4* é um software de acesso livre de previsão e análise de ilhas genômicas, e também funciona como banco de dados de IGs de genomas de bactérias e arqueas (DHILLON et al., 2015; BERTELLI et al., 2017). Essa ferramenta integra quatro métodos para identificação e visualização de IGs: *IslandPick* que se baseia em uma abordagem genômica comparativa, o *IslandPath-DIMOB* que se baseia no viés de nucleotídeos e na presença de genes de mobilidade, o *SIGI-HMM* que baseia-se no viés de uso de códons e o *Islander* baseado na presença de genes tRNA e tmRNA (RNA transferência-mensageiro) como sítios de integração de IGs (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012) (BERTELLI et al., 2017). A ferramenta fornece uma plotagem interativa de cada genoma e das IGs preditas pelo método ou métodos selecionados, sendo possível obter informações dos genes encontrados naquela ilha com o número de acesso no NCBI. As IGs coletadas foram baseadas nos dados fornecidos pelos métodos integrados no *ISLANDVIEWER4* e dessas, apenas as ilhas com tamanho ≥ 9.5 kb foram selecionadas, critério estabelecido em estudo anterior (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012). Os arquivos de saídas referentes aos dados coletados foram armazenados em arquivo do Excel (Fig.1).

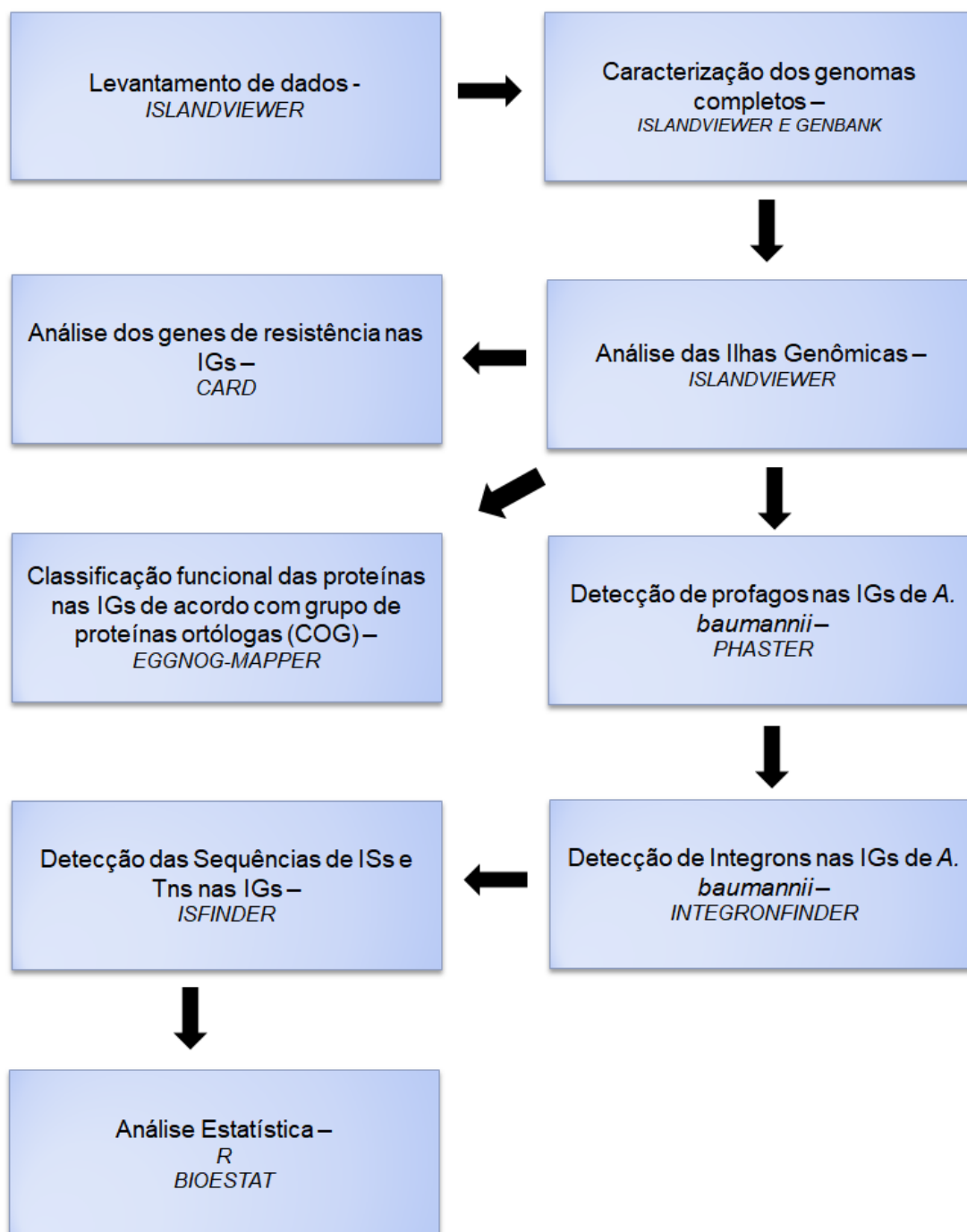
2.2 Caracterização dos Genomas completos

Para a caracterização dos genomas, foi realizada uma consulta ao *GenBank* de acordo com o número de acesso do genoma no NCBI fornecido no *ISLANDVIEWER4*. Foram levantados dados sobre a origem do genoma (hospitalar ou ambiental), o país no qual a bactéria foi isolada, e em qual hospedeiro foi encontrado, e o tamanho dos genomas. O *GenBank* é um banco de dados públicos acessado através da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível através do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, e disponibiliza sequências de vários genomas (Fig.1).

2.3 Caracterização das Ilhas Genômicas preditas pelo *ISLANDVIEWER 4*

Foram baixadas as sequências de nucleotídeos e de proteínas referentes a todas as ilhas com tamanho ≥ 9.5 kb preditas pelo método integrado no *ISLANDVIEWER 4*, a partir dos 82 genomas de *A. baumannii*. Um levantamento de dados foi realizado para obtenção de informações sobre as IGs como tamanho das ilhas, quantidade de ilhas por genoma, e também, a presença de genes de resistência encontrados dentro das IGs. Essas informações foram obtidas no *ISLANDVIEWER4* e analisadas quantitativamente utilizando o programa computacional Excel, a fim de organizar e filtrar os dados coletados dos preditores em relação as ilhas genômicas dos isolados de *A. baumannii* (Fig.1).

Figura 1 – Fluxograma das etapas e programas utilizados no trabalho



2.3.1 Levantamento e caracterização dos genes de resistência presentes nas IGs

Foi realizado o levantamento de todos os genes, identificados como de resistência, dentro das IGs das espécies *A. baumannii* selecionadas neste trabalho. Os genes foram classificados quanto o mecanismo de ação e a classe de antibióticos que apresentam resistência de acordo com o banco de dados

curado *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD; <https://card.mcmaster.ca/>). O CARD é um banco de dados de genes de resistência, seus produtos e fenótipos associados.

2.4 Classificação funcional das proteínas nas IGs de acordo com o grupo de proteínas ortológicas (COG)

Para a classificação funcional foram utilizadas as sequências de proteínas referentes aos genes presentes nas IGs levantadas neste trabalho, utilizando o programa *EGGNOG-MAPPER* (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/emapper>). O *EGGNOG-MAPPER* é um programa de acesso livre que anota sequências baseadas em atribuições de ortologia rápida usando clusters pré-computados e filogenias do banco de dados do EGGNOG. O programa segue três passos para realizar a anotação. O primeiro passo é o mapeamento das sequências, na qual o programa irá consultar o *HMMER 3* em busca de correspondências significativas usando o modelo oculto de Markov (*Hidden Markov Model* -HMM) no banco de dados do EGGNOG. Depois, as proteínas mais bem representadas no HMM são comparadas com o conjunto de proteínas disponíveis no *EGGNOG* pela ferramenta *PHMMER* e a melhor sequência proteica correspondente é armazenada como ortóloga. O segundo passo é a atribuição ortóloga, nessa etapa a melhor sequência selecionada, passa por outro processo, a fim de refinar mais o resultado e evitar a inferência de sequências sem homologia suficiente. A terceira e última etapa é a anotação funcional, aqui os ortólogos são separados taxonomicamente, a fim de evitar falsas atribuições (Huerta-Cepas et al., 2017).

O programa BioEstat (versão 5.0) foi utilizado para a construção do gráfico de barras da distribuição das proteínas dentro das IGs de acordo com os COGs identificados pelo *EGGNOG-MAPPER*.

2.5 Detecção de profagos presentes nas IGs de *A. baumannii*

Os profagos foram detectados usando o programa *PHASTER* (disponível gratuitamente através do endereço eletrônico <http://phaster.ca/>) que identifica e anota de forma rápida sequências de profagos em genomas e plasmídeos bacterianos (ARNDT et al., 2016). As sequências de nucleotídeos das IGs extraídas do *ISLANDVIEWER4* foram salvas no formato FASTA para posterior análise. O *PHASTER* separa os profagos identificados em intactos, incompletos e questionáveis, de acordo com o número de sequências codificadoras no DNA (CDSs), de uma região atribuível as CDS do profago e à presença de genes relacionados com fagos (ZHOU et al., 2011). Os fagos intactos aferidos como fagos funcionais completos, os fagos questionáveis e incompletos não contêm genes de profago suficientes e são considerados fagos não funcionais. Apenas as proteínas dos profagos intactos foram considerados, seguindo os critérios do trabalho de MONTEIRO; COSTA; AZEREDO (2018). As sequências consideradas profagos intactos são assim classificadas, pois apresentam genes de um fago já conhecido (ZHOU et al., 2011).

2.6 Detecção de Integrons presentes nas IGs de *A. baumannii*

Os integrons foram identificados através do programa de acesso livre *INTEGRONFINDER* (disponível no endereço eletrônico https://galaxy.pasteur.fr/root?tool_id=toolshed.pasteur.fr%2Frepos%2Fkhillion%2Fintegron_finder%2Fintegron_finder%2F1.5.1). O *INTEGRONFINDER* é um programa que detecta integrons e seus componentes usando perfis HMM e sítios *attC* usando um modelo de covariância. As características mais marcantes do integron são a presença da enzima integrase (*intI*) e um conjunto de sítios *attC*. O programa também detecta os locais *attI* (locais de recombinação), P_{intI} (promotor) e P_C (promotor constitutivo), e genes codificadores de proteínas nos cassetes gênicos. O programa detecta três tipos de elementos, os integrons completos, que possuem a estrutura descrita acima, o elemento In_0 que possui apenas a enzima da integrase, e os grupos de sítios *attC* sem integrases (CALIN). O programa anota as sequências pelo software Prodigal v2.6.2. Os sítios *attC* foram identificados via *INFERNAL* 1.1, as enzimas integrase (*intI*) foram identificados através do HMMER, assim como, as anotações funcionais das proteínas integradas nos cassetes gênicos. As sequências dos promotores constitutivos P_C , dos promotores P_{intI} e dos sítios *attI* foram identificadas pelo *INTEGRALL* para os integrons das classes 1, 2 e 3. CURY et al., 2016). Apenas os integrons completos foram considerados, neste trabalho.

2.7 Detecção das Sequências de Inserção (ISs) e Transposons (Tns) presentes nas IGs de *A. baumannii*

Para as análises, foram utilizadas as sequências de nucleotídeos das Ilhas genômicas. As ISs e os Tns foram identificados pelo programa ISFINDER. O programa é de acesso livre e está disponível através do site (<https://isfinder.biotoul.fr/blast.php>). O ISFINDER é um programa que detecta ISs em genomas bacterianos, porém esse programa também é capaz de detectar Tns.

2.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R (versão 3.5.1). O programa R foi utilizado para as análises de correlação. A matriz de correlação usada foi a de Spearman, que é uma correlação não paramétrica, visto que, os dados não apresentaram normalidade. Um coeficiente de correlação $< 0,4$ foi considerado como correlação fraca, $\geq 0,4$ a $< 0,5$ correlação moderada e $\geq 0,5$ uma correlação forte. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização dos Genomas completos

Dos 82 genomas completos de *A. baumannii* selecionados para este trabalho (Tabela 1), 62% foram isolados na Ásia, 22% na América do Norte, 10% na Europa, e apenas 5% e 1% na Oceania e na América do Sul, respectivamente. O tamanho dos genomas dos isolados variaram de 3,68 Mb a

4,34 Mb. Todos os genomas de *A. baumannii* disponíveis no *ISLANDVIEWER4* foram isolados de humanos e em ambientes hospitalares.

Tabela 1 – Genomas e isolados estudados

Localização	Isolados	Nº identificação
Ásia		
	1656-2	NC_017162.1
	BJAB07104	NC_021726.1
	BJAB0715	NC_021733.1
	BJAB0868	NC_021729.1
	IOMTU433	NZ_AP014649.1
	DU202	NZ_CP017152.1
	MDR-TJ	NC_017847.1
	MDR-ZJ06	NC_017171.1
	NCGM 237	NZ_AP013357.1
	BAL062	NZ_LT594095.1
	AC29	NZ_CP007535.2
	HRAB-85	NZ_CP018143.1
	KAB01	NZ_CP017642.1
	KAB02	NZ_CP017644.1
	KAB03	NZ_CP017646.1
	KAB04	NZ_CP017648.1
	KAB05	NZ_CP017650.1
	KAB06	NZ_CP017652.1
	KAB07	NZ_CP017654.1
	KAB08	NZ_CP017656.1
	KBN10P02143	NZ_CP013924.1
	XDR-BJ83	NZ_CP018421.1
	XH386	NZ_CP010779.1
	XH856	NZ_CP014541.1
	XH857	NZ_CP014540.1
	XH858	NZ_CP014528.1
	XH859	NZ_CP014539.1
	XH860	NZ_CP014538.1
	YU-R612	NZ_CP014215.1
	TYTH – 1	NC_018706.1
	ZW85-1	NC_023028.1
	Ab4568	NZ_CP024613.1
	Ab4653	NZ_CP024612.1
	Ab4977	NZ_CP024611.1
	AbPK1	NZ_CP024576.1
	B8300	NZ_CP021347.1
	B8342	NZ_CP021342.1
	CBA7	NZ_CP020586.1
	HWBA8	NZ_CP020597.1
	JBA13	NZ_CP020584.1
	SAA14	NZ_CP020579.1
	SSA12	NZ_CP020578.1
	SSA6	NZ_CP020591.1
	SSMA17	NZ_CP020581.1
	USA15	NZ_CP020595.1
	USA2	NZ_CP020592.1

	WKA02	NZ_CP020598.1
	A1296	NZ_CP018332.1
	BL01	NZ_CP025266.1
	15A5	NZ_CP020574.1
	15A34	NZ_CP020590.1
Europa		
	ACICU	NC_010611.1
	R2090	NZ_LN868200.1
	R2091	NZ_LN997846.1
	AYE	NC_010410.1
	A1	NZ_CP010781.1
	AbH12O-A2	NZ_CP009534.1
	ATCC 17978	NZ_CP018664.1
	A388	NZ_CP024418.1
América do Norte		
	LAC4	NZ_CP018677.1
	ab736	NZ_CP015121.1
	AB307-0294	NZ_CP024911.1
	CMC-CR-MDR-Ab4	NZ_CP016295.1
	CMC-CR-MDR-Ab66	NZ_CP016300.1
	CMC-MDR-Ab59	NZ_CP016298.1
	AF-401	NZ_CP018254.1
	AF-673	NZ_CP018256.1
	AB030	NZ_CP009257.1
	AB031	NZ_CP009256.1
	AB042	NZ_CP019034.1
	AB5075-UW	NZ_CP008706.1
	3207	NZ_CP015364.1
	LAC-4	NZ_CP007712.1
	CIP70.10	NZ_LN865143.1
	ATCC 17978-mff	NZ_CP012004.1
	AB0057	NC_011586.2
	Ab04-mff	NZ_CP012006.1
Oceania		
	D1279779	NC_020547.2
	D36	NZ_CP012952.1
	AYP-A2	NZ_CP024124.1
	A85	NZ_CP021782.1
América do Sul		
	6200	NZ_CP010397.1

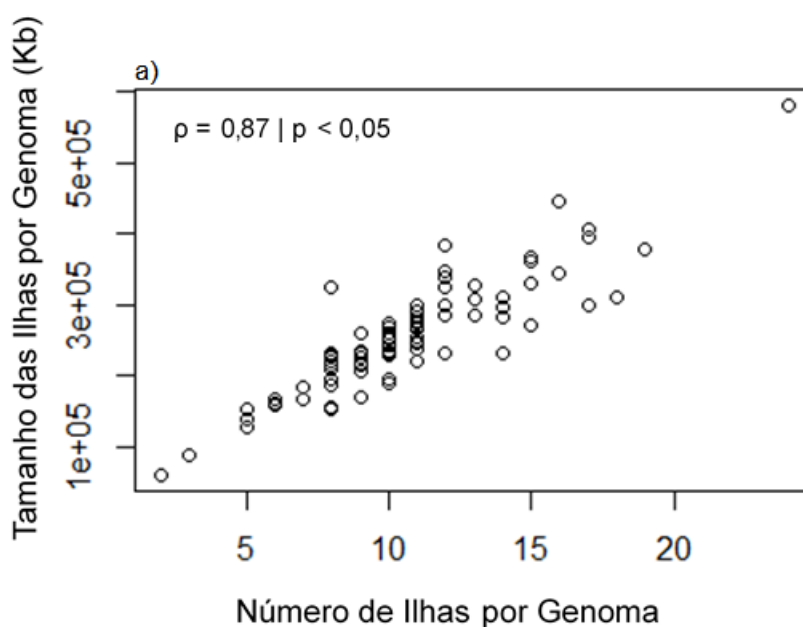
Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

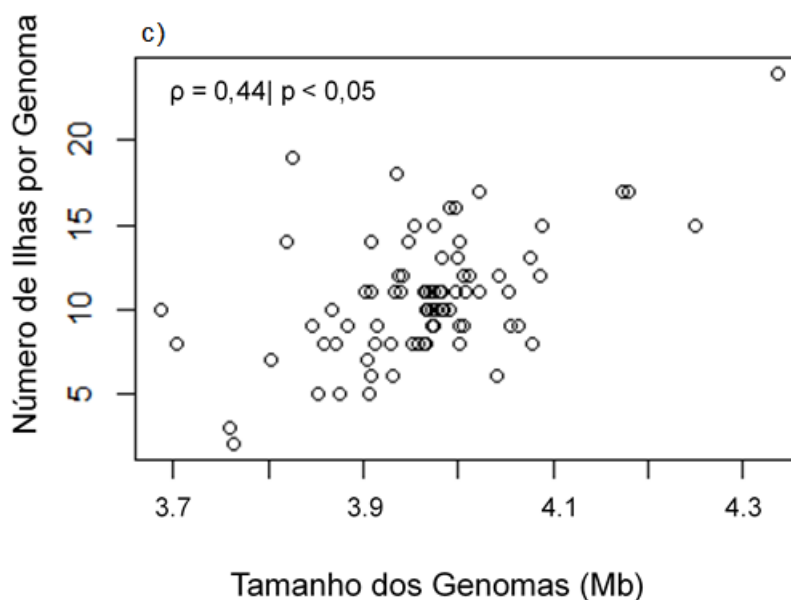
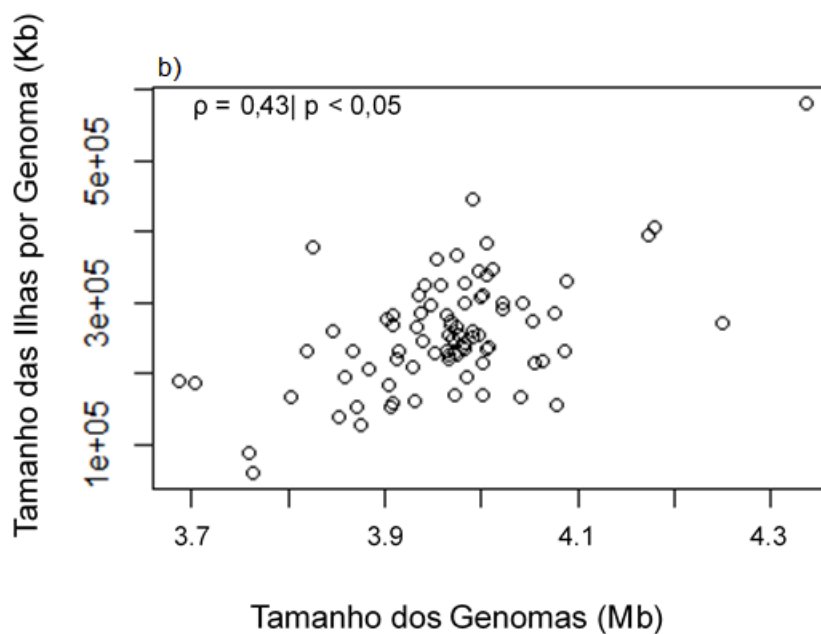
3.2 Caracterização das Ilhas Genômicas previstas pelo *ISLANDVIEWER 4*

Com base nas informações levantadas no *ISLANDVIEWER4* foram detectadas um total de 878 ilhas genômicas abrangendo um total de 21 Mb. O tamanho individual das Ilhas variou de 9.5 kb a 85 kb. Todos os genomas de *A. baumannii* selecionados neste trabalho apresentaram a presença de IGs. A fração do genoma representado por IGs variou de 1,6% até 13,4% entre os isolados analisados.

Para os dados referentes ao tamanho do genoma, tamanho das ilhas por genoma, número de ilhas por genoma e número de genes de resistência por genoma, foram realizados testes de correlação para verificar se havia alguma relação entre as variáveis (Apêndice 1). Foi observada uma forte e significativa correlação entre o número de ilhas por genoma e o tamanho total das ilhas por genoma e ($\rho = 0,87$, $p < 0,05$) (Fig. 2a). Também foram observadas correlações significativas, no entanto moderadas, entre o tamanho total dos genomas e o tamanho de ilhas por genoma ($\rho=0,43$, $p < 0,05$) (Fig.2b) e entre o tamanho total dos genomas e o número de ilhas por genoma ($\rho = 0,44$, $p < 0,05$) (Fig. 2c).

Figura 2 – Padrão das IGs em relação aos genomas.



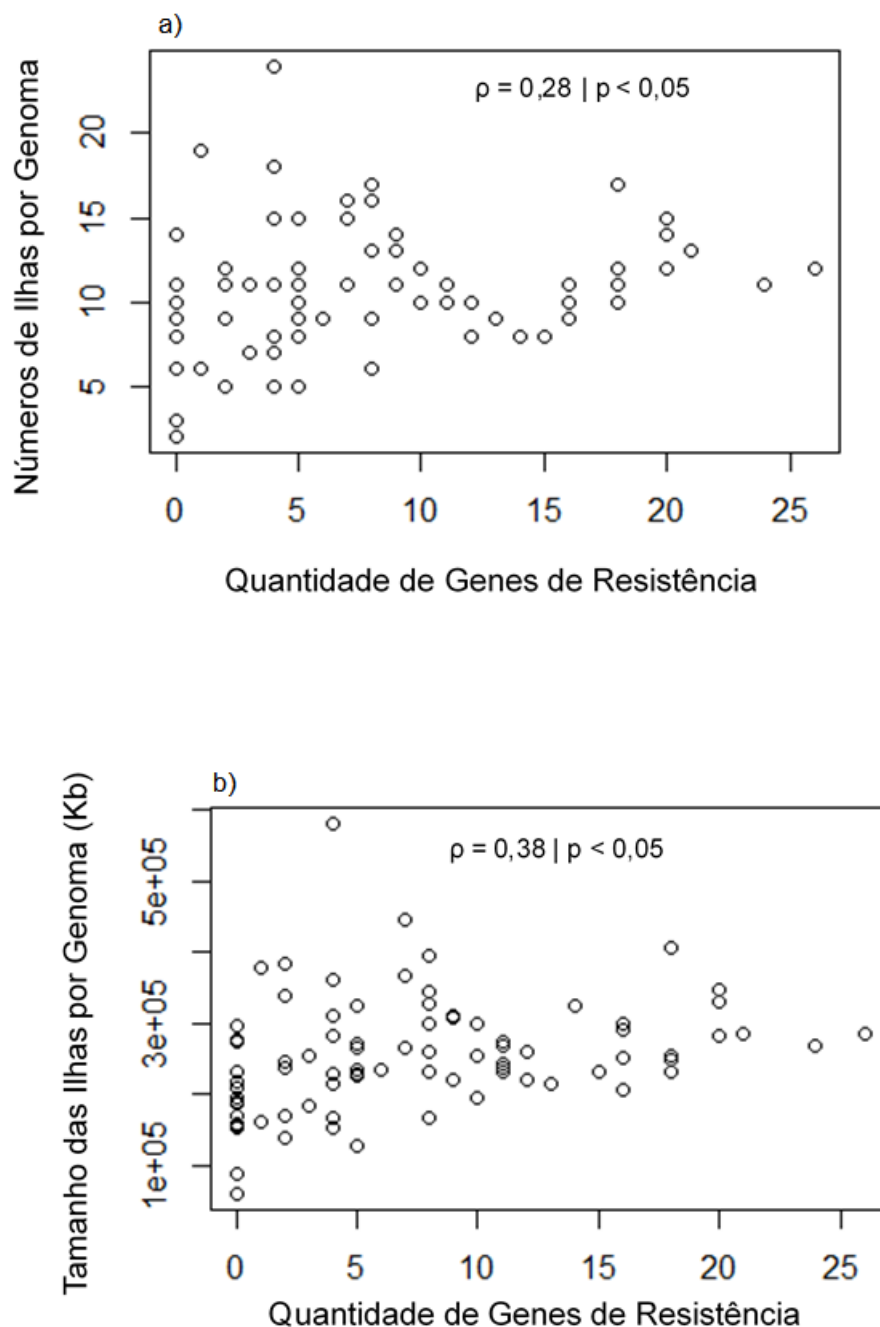


a) Gráfico que representa a relação entre o número de IGs por genoma e o tamanho das IGs por genoma (em Kb). **b)** Gráfico que representa a relação entre o tamanho do Genoma (em Mb) e o tamanho das IGs por genoma (em Kb). **c)** Gráfico que representa a relação entre o tamanho do Genoma (em MB) e o número de IGs por genoma. **Fonte:** Elaborada pelo autor, 2019.

Em relação à quantidade de genes de resistência por ilha genômica, foram observadas correlações significativas, mas fracas com o número de ilhas por genoma ($\rho = 0,28 \mid p < 0,05$) (Fig.3a) e com o tamanho das ilhas por genoma ($\rho = 0,38 \mid p < 0,05$) (Fig. 3b). Do total de genes de resistência encontrados por genoma, a fração desses genes presentes nas IGs variou de 0% a 47.1%. Em 15 genomas não foi observada a presença de genes de

resistência nas IGs, sendo referentes aos genomas dos isolados de *A. baumannii* ATCC 17978-mff, D1279779, CIP70.10, R2090, 6200, A1, AB5075-UW, D36, ZW85-1, AB307-0294, AbPK1, B8342, HWBA8, WKA02, A1296.

Figura 3 – Padrão das IGs em relação à presença de genes de resistência



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. a) Gráfico que representa a relação entre o número de ilhas por genoma e a quantidade de genes de resistência nas ilhas por genoma. b) Gráfico que representa a relação entre o tamanho das Ilhas por genoma e a quantidade de genes de resistência nas ilhas por genoma.

3.2.1 Levantamento e caracterização dos genes de resistência presentes nas IGs

Foram identificados 621 genes de resistência dentro das IGs pelo programa *ISLANDVIEWER 4* e os mesmos foram classificados de acordo com a classe de antibióticos que apresentam resistência e em relação ao mecanismo de resistência do gene (Tabela 2). Os genes de resistência aos aminoglicosídeos foram os mais encontrados (*armA*, *aac(3)*, *aacA4*, *aac(6)*, *aph(3)*, *aph(6)*, n-acetiltransferase) representando um total de 40,6% de todos os genes de resistência encontrados nas IGs. Os genes de resistências *sul1* e *sul2*, que conferem resistência as sulfonamidas também foram amplamente identificados dentro das IGs, representando 19,2%. Genes de resistência aos beta-lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclina também foram encontrados. Outros genes de resistência foram encontrados com baixa expressividade dentro das IGs (*msrE*, *mexW/mexI*, *mexH*, *blmA*, *adel*, *adeB*, *emrA*, *emrK*, *ndm-1*, *per-1*, *tetA*, *tet B*, transportadores *MFS*). Existe uma variabilidade entre os isolados referentes aos marcadores de resistência e os perfis das IGs

Tabela 2 - Genes de resistência presentes nas IGS

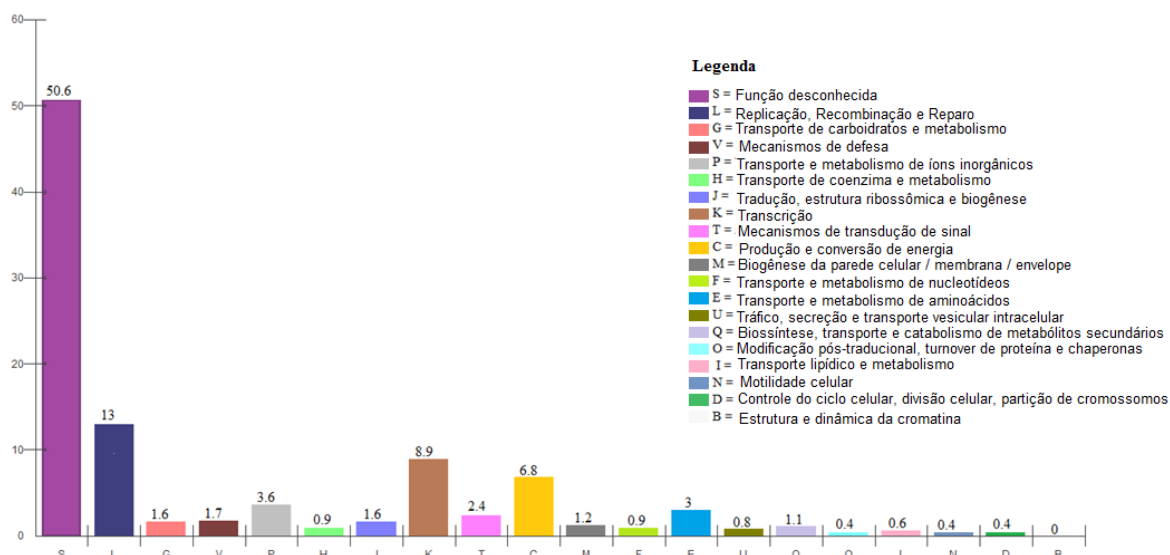
GENES DE RESISTÊNCIA ENCONTRADOS NAS IGS	CLASSE DE ANTIBIÓTICOS	MECANISMO DE RESISTÊNCIA
<i>ArmA</i>	Aminoglicosídeos	Alteração do alvo
<i>aac(3)</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>aacA4</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>Aac(6)</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>aph(3'')-Ib (strA)/Ia</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>aph(6)-Id(strB)</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>N-acetyltransferase (9)</i>	Aminoglicosídeos	Inativação da droga
<i>mcr(E)</i>	Macrolídeos/Estreptogramina	Protege o alvo da droga
<i>mexW/mexI</i>	Tetraciclinas/Fluoroquinolonas	Efluxo da droga
<i>MexH</i>	Tetraciclinas/Fluoroquinolonas	Efluxo da droga
<i>BlmA</i>	Glicopeptídeos	Inativação da droga
<i>adel/adeK (2)</i>	Carbapenêmicos/Tetraciclinas/Lincosamida/ Fluoroquinolonas/Cefalosporinas/Macrolídeos/ Cloranfenicol	Efluxo da droga
<i>adeB (1)</i>	Tetraciclina/ Glicilciclina	Efluxo da droga
<i>emrA/emrK</i>	Fluoroquinolonas/ tetraciclinas	Efluxo de droga
<i>MphE</i>	Macrolídeos	Inativação da droga
<i>oxa-23</i>	Beta-lactâmicos	Inativação da droga
<i>ndm-1</i>	Beta-lactâmicos	Inativação da droga
<i>tem-1</i>	Beta-lactâmicos	Inativação da droga
<i>per1</i>	Beta-lactâmicos	Inativação da droga
<i>catB8</i>	Cloranfenicol	Inativação da droga
<i>sul1</i>	Sulfonamidas	Substituição do alvo
<i>sul2</i>	Sulfonamidas	Substituição do alvo

<i>TetB</i>	Tetraciclina	Efluxo da droga
<i>TetA</i>	Tetraciclina/Glicilciclina	Efluxo da droga
Transportadores MFS	-	Efluxo da droga

3.3 Classificação funcional das proteínas nas IGs de acordo com a COG

Foram levantadas um total de 24.439 proteínas presentes nas 878 IGs. Estas proteínas foram analisadas e classificadas de acordo com seu grupo de proteínas ortológicas (categoria COG) através do *EGGNOG-MAPPER*. As proteínas de funções desconhecidas (categoria S) corresponderam a mais de 50% do total das sequências gênicas encontradas nas IGs. Em seguida, estão as proteínas envolvidas nos processos de replicação, recombinação e reparo (categoria L) com 13%. Proteínas envolvidas na transcrição (categoria K) e na produção e conversão de energia (categoria C), representaram 8.9% e 6.8%, respectivamente. Já as proteínas envolvidas no transporte de carboidratos e metabolismo (categoria G), mecanismos de defesa (categoria V), transporte e metabolismo de íons inorgânicos (categoria P), transporte de coenzima e metabolismo (categoria H), tradução, estrutura ribossômica e biogênese (categoria J), biogênese da parede celular / membrana / envelope (categoria M), transporte e metabolismo de nucleotídeos (categoria F), transporte e metabolismo de aminoácidos (categoria E), tráfico, secreção e transporte vesicular intracelular (categoria U), biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários (categoria Q), modificação pós-traducional, turnover de proteína chaperonas (categoria O), transporte lipídico e metabolismo (categoria I), motilidade celular (categoria N) e controle do ciclo celular, divisão celular, partição de cromossomos (categoria D), corresponderam a menos de 5% de todas as proteínas encontradas nas IGs (Fig. 4). A classificação funcional das proteínas nas IGs baseada na ortologia mostrou que nessas regiões, estão presentes uma grande quantidade de proteínas com funções ainda desconhecidas.

Figura 4 – Distribuição das proteínas dentro dos IGs de acordo com o COG



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

3.4 Detecção de profagos presentes nas Ilhas genômicas de *A. baumannii*

Foram encontrados um total de 199 sequências de profagos integrados nas ilhas genômicas de 62 isolados de *A. baumannii* analisados neste estudo. Contudo, apenas 81 sequências de profagos foram classificadas como intactas. Foi identificado um total de 8 bacteriófagos diferentes, sendo eles pertencentes

a três famílias: à família *Siphoviridae*, à família *Myoviridae* e à família *Podoviridae*.

Tabela 3 – Profagos intactos anotados nas IGS de *A. baumannii*

Bacteriófago	Família	Intactos	Nº Referência
Acinetobacter phage Bphi-B1251	<i>Siphoviridae</i>	37	NC_019541
Acinetobacter phage vB_AbaS_TRS1	<i>Siphoviridae</i>	12	NC_031098
Burkholderia virus BcepMu	<i>Myoviridae</i>	1	NC_005882
Enterobacteria phage mEp235	<i>Siphoviridae</i>	4	NC_019708
Enterobacteria phage VT2phi_272	<i>Podoviridae</i>	1	NC_028656
Mannheimia phage vB_MhM_3927AP2	<i>Myoviridae</i>	19	NC_028766
Pseudomonas virus phiCTX	<i>Myoviridae</i>	6	NC_003278
Salmonella phage SEN34	<i>Myoviridae</i>	1	NC_028699

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Nas sequências de profagos intactos foram encontradas proteínas envolvidas na degradação da parede celular bacteriana (Ligação a peptidoglicano (PGRP), proteínas envolvidas na formação do capsídeo do bacteriófago (P22 coat protein), e na formação da cabeça viral dos fagos (Fago Mu proteína F). Proteínas envolvidas na replicação, recombinação e reparo (DNA adenina metilase, DNA invertase, resolvase recombinase sítio-específica Pin, DNA metilase citosina-específica C-5, DNA recombinase sítio-específica relacionada a DNA invertase Pin- gp6 e proteína de ligação a fita simples de DNA). Proteases (Proteína proteica central do pró-capsídeo, protease da maturação da cabeça do fago e protease putativa dependente de ATP), fosfatases (fosfoproteína fosfatase), oxiredutases (proteína putativa da superfamília da desidrogenase alcoólica contendo zinco), e proteínas envolvidas na transcrição e mecanismos de transdução de sinal (proteína umuD). Também foram encontradas proteínas envolvidas na virulência e na adaptação bacteriana associadas a reguladores transcricionais (TraR/DksA family protein, putativo repressor cl - HipB), a membrana (lipoproteína putativa, lipoproteína) e a chaperonas (Chaperona molecular da classe DnaJ com domínio do dedo do Zn do C-terminal putativo). Proteínas envolvidas com a resistência aos aminoglicosídeos como a proteína bifuncional AAC/APH que foi encontrada em IGS de 14 isolados, associada aos fagos *Acinetobacter phage Bphi-B1251*, *Mannheimia phage vB_MhM_3927AP2*, *Acinetobacter phage vB_AbaS_TRS1*, *Salmonella phage SEN34*, *Enterobacteria phage VT2phi_272* e *Pseudomonas virus phiCTX*. O transposon Tn5041, *Acetiltransferase*, e a

proteína putativa de resistência ao composto quaternário de amônio (*qacE*) também foram encontradas nos fagos intactos identificados.

3.5 Detecção e identificação dos Integrons presentes nas IGs

Foram identificados 47 integrons completos presentes nas IGs, encontrados em 30 isolados. Os integrons apresentaram 7 diferentes grupos de cassetes gênicos (Tabela 4, Figura 5). Entre os genes cassetes foram identificados os genes de resistência aminoglicosídeo 3-N-acetiltransferase (*AAC3-I*), aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase (*AAC6-Ib*), aminoglicosídeo nucleotidiltransferase (*ANT3*) que conferem resistência aos aminoglisídeos; o gene cloranfenicol acetiltransferase (*CAT*) que confere resistência ao cloranfenicol; o gene acetiltransferase (*Acetyltransf_10*); o cassete transportador de efluxo de drogas (*emrE*) e a proteína identificada pertencente a família de pequenas proteínas resistentes (*SMR*). Todos os integrons encontrados pertenciam a classe 1.

Tabela 4 - Arranjo dos cassetes gênicos presente nos integrons em *A. baumannii*.

Arranjo de cassetes gênicos	Presente nos isolados	Porcentagem nos isolados %
<i>AAC3-I - Acetyltransf_10 - ANT3 - MSR</i>	BALO62	1.2
<i>AAC6-Ib - CAT - ANT3 - emrE</i>	AF673, HRAB-85, XDR-BJ83, XH356, XH856, 15A34, MDR-ZJ06, MDR-TJ, NCGM 237, CMC-CR-MDR-Ab4, XH857, CMC-CR-MDR-Ab59	14.6
<i>emrE - ANT3 - AAC3-I - AAC6-Ib</i>	A388	1.2
<i>emrE - ANT3 - CAT - AAC6-Ib</i>	TYTH-1, SSA6, DU202	3.7
<i>AAC3-I - ANT3 - emrE</i>	A1, AB0057, XH856, BL01, A85, MDR-TJ e Ab4653	8.5
<i>emrE - ANT3 - AAC3-I</i>	str.AYE, KBN10P02143, Ab4977, Ab4568	4.9
<i>emrE - ANT3</i>	1656-2 e AYP-A2	2.4

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. Aminoglicosídeo 3-N-Acetiltransferase (*AAC3-I*), aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase (*AAC6-Ib*), aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*); cloranfenicol acetiltransferase (*CAT*), acetiltransferase (*Acetyltransf_10*); transportador de efluxo de drogas (*emrE*), proteína identificada pertencente a família de pequenas proteínas resistentes (*SMR*).

Figura 5 – Representação gráfica dos arranjos dos cassetes gênicos presentes nos integrons em *A. baumannii*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019. **a)** Representação gráfica do arranjo de cassetes presente no isolado BALO62 contendo os genes Aminoglicosídeo 3-N-Acetiltransferase (*AAC3-l*), aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*), acetiltransferase (*Acetyltransf_10*) e uma proteína identificada pertencente à família de pequenas proteínas resistentes (*SMR*). **b)** Arranjo de cassetes presente nos isolados AF673, HRAB-85, XDR-BJ83, XH356, XH856, 15A34, MDR-ZJ06, MDR-TJ, NCGM 237, CMC-CR-MDR-Ab4, XH857, CMC-CR-MDR-Ab59 contendo os genes aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase (*AAC6-lb*), cloranfenicol acetiltransferase (*CAT*), aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*) e o transportador de efluxo de drogas (*emrE*). **c)** arranjo de cassetes presente no isolado A388 contendo o transportador de efluxo de drogas (*emrE*), aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*); Aminoglicosídeo 3-N-Acetiltransferase (*AAC3-l*), aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase (*AAC6-lb*). **d)** Arranjo de cassetes presente nos isolados TYTH-1, SSA6, DU202 contendo o transportador de efluxo de drogas (*emrE*) e os genes aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*), cloranfenicol acetiltransferase (*CAT*) e aminoglicosídeo 6-N-acetiltransferase (*AAC6-lb*). **e)** Arranjo de cassetes presente nos isolados A1, AB0057, XH856, BL01, A85, MDR-TJ e Ab4653 contendo os genes aminoglicosídeo 3-N-acetiltransferase (*AAC3-l*), aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*) e o transportador de efluxo de drogas (*emrE*). **f)** Arranjo de cassetes presente nos isolados str.AYE, KBN10P02143, Ab4977, Ab4568 contendo o transportador de efluxo de drogas (*emrE*) e os genes aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*) e aminoglicosídeo 3-N-acetiltransferase (*AAC3-l*). **g)** Arranjo de cassetes presente nos isolados 1656-2 e AYP-A2 contendo o transportador de efluxo de drogas (*emrE*) e o gene aminoglicosídeo Nucleotidiltransferase (*ANT3*).

3.6 Identificação das ISs e Tns

Foram identificadas 239 ISs integrados nas IGs e 7 Tns (Apêndice 2), distribuídas em 17 famílias, sendo 16 famílias de ISs (IS1, IS3, ISL3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS256, IS481, IS630, IS701, IS982 e ISNCY) e uma família de Tn (Tn3). Os 7 transposons identificados foram o TnAs3, Tn5393, TnAs2, Tn2, Tn3, TnShfr1 e TnAs1. Dentre os Tns identificados, o Tn5393 apresentou uma ORF que codificava o gene *strA* que confere resistência a estreptomicina e o Tn2 que é considerado pelo programa como pertencente a família Tn3 possui uma ORF que codifica o gene *blaTEM-1b*.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que 100% dos genomas de *A. baumannii* disponíveis no *ISLANDVIEWER4* foram isolados de ambientes nosocomiais. Nenhum dos isolados disponíveis eram de origem ambiental. Embora a maioria das bactérias *A. baumannii* sejam ambientais e ubíquas, elas são amplamente encontradas em ambientes hospitalares e causam problemas significativos a saúde dos pacientes internados (EVEILLARD et al., 2013; HRENOVIC et al., 2014;). Em um estudo, realizado por Weinstein et al (2005), sobre infecções nosocomiais causadas por bacilos gram-negativos foi mostrado que o gênero *Acinetobacter* foi o único patógeno associado a proporções consistentemente crescentes de pneumonias, infecções cirúrgicas e infecções do trato urinário.

Os 82 genomas de *A. baumannii* possuíam IGs, contabilizando um total de 878 IGs. O número de ilhas por genoma varia consideravelmente entre os isolados, variando de 2 a 24 ilhas por genoma analisado. As IGs podem representar uma parcela significativa dos genomas. Os tamanhos das ilhas também variam consideravelmente. Como esperado, o número de ilhas por genoma estava fortemente e positivamente correlacionado com o tamanho total das ilhas por genoma. Além disso, também foi mostrado a correlação significativa e moderada do tamanho total dos genomas entre o tamanho de ilhas por genoma e entre o número de ilhas por genoma. Isso reflete que essas regiões contribuem para variação genômica entre os isolados. A alta variabilidade intra-específica do tamanho das IGs e as correlações aqui

observadas foram mostradas em análises do padrão e arquitetura de ilhas genômicas em bactérias marinhas (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2012). Essa variabilidade no número e no tamanho das ilhas podem ter implicações para evolução e diversidade de *A. baumannii*.

Dentro das IGs, foi observada uma proporção alta de proteínas hipotéticas mostrando que essas regiões são um depósito de novos genes. Outros trabalhos também chamaram atenção para a quantidade de proteínas existentes em IGs que ainda não tinham sido identificadas. Farrugia et al. (2015) classificou a alta quantidade de proteínas hipotéticas nas IGs como uma característica que as definem. Hsiao et al. (2005) definiu essas proteínas como proteínas novas, evidenciando que as IGs são reservatórios de novidade genética. Em IGs identificadas no genoma de *Corynebacterium efficiens* e, 96% das proteínas codificadas eram hipotéticas (ZHANG; ZHANG, 2005). Resultados semelhantes foram observados também para *Corynebacterium diphtheriae* (ENCINAS et al., 2015). As IGs analisadas apresentaram uma diversidade de genes de resistência evidenciando a capacidade dessas regiões de abrigarem esses elementos e de contribuir para o surgimento de isolados multirresistentes e para disseminação da resistência. Os isolados de *A. baumannii* encontrados em ambientes hospitalares sofrem pressão seletiva aumentada em decorrência da ampla utilização de antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas. Assim, a TGH através de bactérias estritamente relacionadas ou bactérias de outras espécies ou gêneros é uma das formas de aquisição e aumento de resistência nas espécies de *A. baumannii* (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016). Nos dados aqui levantados é possível notar a importância das IGs na resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, sulfonamidas, cloranfenicol, quinolonas e tetraciclina. É notável como genes de resistência aos aminoglicosídeos são amplamente encontrados nas IGs analisadas dos diferentes isolados.

Recentemente vem sendo mostrado que vários *A. baumannii* podem apresentar ilhas de resistência. O isolado *A. baumannii* AYE entre os isolados analisados é o que apresentou a maior IG (85 Kb), sendo esta a primeira ilha de resistência identificada em *A. baumannii* e denominada AbaR1, com 22 genes de resistência conhecidos, compreendendo aproximadamente 85% dos genes de resistência dessa bactéria (FOURNIER et al, 2006). Esses genes apresentam resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetracilina e rifampicina

A resistência aos aminoglicosídeos do *A. baumannii*, de origem nosocomial, vem sendo constantemente relatada em diferentes países. É conhecido que muito desses genes de resistência podem ser adquiridos por TGH. Um estudo realizado na Índia, mostrou que 79,2 % de *A. baumannii* isolados de pacientes internados na unidade de tratamento intensivo (UTI) eram resistentes aos aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina). Mostraram que os genes *aph(3')I*, *aph(3')VIa* e *armA* eram predominantes e horizontalmente transferíveis (UPADHYAY et al., 2018). Em um hospital do Nepal também foi observado a emergência da resistência aos aminoglicosídeos, decorrentes da presença do gene *armA*, em isolados de *A. baumannii* multirresistentes (SHRESTHA et al., 2016). Embora no ISLANDVIEWER4 estivesse disponível apenas um genoma de *A. baumannii* isolado na América do Sul, trabalhos relatam a análise de isolados hospitalares nessa região de espécies que também apresentaram alta resistência aos aminoglicosídeos (MARTÍNEZ RAMOS; MÁTTAR VELILLA, 2012; BALLABEN et al., 2018).

Além da resistência aos aminoglicosídeos, podemos também destacar nas IGs dos genomas aqui levantados a presença de genes de resistência aos beta-lactâmicos, principalmente *oxa-23* e *tem-1*. As carbapenases OXA-23 são prevalentes e encontradas em isolados de *A. baumannii* do mundo todo (LEE et al., 2017). Estudos mostraram que a inserção da IS*Aba1* pode ser encontrada a montante a esse gene de resistência e parece estar associada com a super expressão do gene *oxa-23* em *A. baumannii*. A IS*Aba1* foi responsável pela mobilização do gene *oxa-23* de *A. radioresistens* para *A. baumannii* (POIREL et al., 2016; ROYER et al., 2018). Vários estudos também mostraram a coexistência do gene *oxa-23* com o gene de resistência aos aminoglicosídeos *armA* (LEE et al., 2017). A presença do gene TEM-1 em ilhas genômicas de outros isolados de *A. baumannii*, não relatados neste trabalho, também foram verificados nas linhagens HK302 (KRIZOVA; NEMEC, 2010), WM99c e A91 (NIGRO et al., 2013). Nossos resultados, comparando 82 genomas diferentes de *A. baumannii*, mostram que as IGs são elementos relevantes na disseminação da resistência aos aminoglicosídeos e aos beta-lactâmicos em ambientes hospitalares, principalmente pela presença dos genes *aac*, *aph*, *arm A*, *oxa-23* e *tem-1*.

Sequências de profagos, ISs, Tns, e integrons também foram consideravelmente observadas nas IGs analisadas. Esses elementos representam importantes mediadores da TGH, ademais, como foi observado no estudo, podem carrear e codificar importantes genes de resistência, influenciando na adaptação da bactéria a diferentes ambientes.

Em relação aos profagos, que são fagos lisogênicos que se integram no genoma da bactéria e são replicados junto com o cromossomo do hospedeiro (CASJENS, 2003; ZHOU et al., 2011). Foram encontradas 81 sequências de fagos intactos presentes nas IGs de *A. baumannii*, o que pode corresponder a uma infecção e integração recente no genoma do hospedeiro (COSTA; MONTEIRO; AZEREDO, 2018). Grande parte das bactérias carregam profagos em seus genomas, que podem estar presentes apenas como fragmentos virais ou podem estar completo e serem infecciosos (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012). Ao longo da evolução observa-se que os profagos e as bactérias têm tido uma coevolução para alinhar seus interesses, esta é a possível razão que faz alguns profagos fornecerem características interessantes para a bactéria hospedeira, tais como, tolerância a antibióticos e toxinas, proteção à infecção por outros fagos e melhoramento da aptidão do hospedeiro (COSTA; MONTEIRO; AZEREDO, 2018).

Os profagos Bphi-B1251 e vB_AbaS_TRS1 tem como hospedeiro a espécie *A. baumannii*, mostrando que estes fagos provavelmente estão envolvidos na TGH entre espécies mais próximas. Muitos dos fagos intactos identificados neste trabalho foram relatados pela primeira vez dentro das IGs de *A. baumannii*. O profago *Mannheimia* vB_MhM_3927AP2 tem como hospedeiro a bactéria *Mannheimia haemolytica* e foram encontrados de forma intacta em mais de um isolado de *A. baumannii*. Muito pouco se sabe sobre esse fago e sobre a sua participação na TGH entre essas bactérias. Também foi mostrado pela primeira vez a presença do *Salmonella* fago SEN34, *Pseudomonas* fago PhiCTX e Burkholderia virus BcepMu em IGs de *A. baumannii*.

A presença da proteína bifuncional AAC/APH em alguns isolados de *A. baumannii*, associada aos fagos *Acinetobacter phage Bphi-B1251*, *Mannheimia phage vB_MhM_3927AP2*, *Acinetobacter phage vB_AbaS_TRS1*, *Salmonella phage SEN34*, *Enterobacteria phage VT2phi_272* e *Pseudomonas virus*

phiCTX, e responsável pela resistência aos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina e tobramicina). Sequências de profagos foram relatadas associadas a IGs em outros trabalhos. O sequenciamento do isolado de *A. baumannii* K50 mostrou que seis IGs encontradas abrigavam sequências codificadoras de DNA relacionadas com fagos e alguns dos produtos gênicos dessas regiões eram importantes para a sobrevivência e patogenicidade da bactéria (WIBBERG et al., 2018).

Os Integrons são elementos genéticos capazes de adquirir cassetes gênicos através de recombinação sítio-específica (DEYLAM SALEHI, et al, 2017). Esses cassetes gênicos comumente carregam importantes genes de resistência (DEYLAM SALEHI, et al, 2017). Como relatado por Goudarzi et al. (2016) esses cassetes podem conter genes de bomba de efluxo, genes de resistência a aminoglicosídeos e de resistência a beta-lactâmicos em *A. baumannii*. Uma considerável quantidade de *A. baumannii* também apresentou integrons associados as IGs. Foi observado que genes de resistência relacionados a bombas de efluxo e de resistência aos aminoglicosídeos estavam presentes em seus cassetes gênicos. Os genes de resistência aos aminoglicosídeos foram frequentemente encontrados nos grupos de cassetes gênicos dos integrons, mostrando que esses elementos também contribuem para a resistência a essa classe de antibióticos.

Todos os arranjos de cassetes gênicos codificavam pelo menos um gene de resistência a aminoglicosídeos, mostrando que a disseminação da resistência a essa classe de antibióticos também pode ser mediada pela aquisição e transferência desses elementos. Os genes de resistência a aminoglicosídeos prevalentes neste estudo foram *ant3*, *aac3-I*, *aac6-Ib*. Outros estudos também relataram a prevalência desses cassetes em isolados de *A. baumannii* (HUANG et al., 2008; ÇIÇEK et al., 2013; LIU et al., 2014). Foi observado individualmente em outros trabalhos a presença desses cassetes, porém a presença dos arranjos de cassetes encontrado neste estudo, não foi encontrado em nenhum outro trabalho. O cassete gênico *aac3-I* foi relatado anteriormente em *A. baumannii* nos trabalhos de Japoni-Nejad et al. (2013) em um isolado de um hospital no Irã. Já a presença do cassete *aac3-I* juntamente com o gene *ant3* foi documentado por Çiçek et al. (2013), em isolados clínicos na Turquia, por Huang et al. (2008) em um hospital em Taiwan, e por Turton et al. (2005) em isolados clínicos do Reino Unido.

É conhecida a prevalência do Integron Classe 1 em *A. baumannii*, assim como a uma variedade de seus cassetes gênicos (PAGANO, MARTINS, BARTH, 2016). Ploy et al. (2000) em uma caracterização de integrons em *A. baumannii* observou que entre os vinte isolados estudados, dezesseis possuíam integrons de classe 1. Em um estudo realizado na China por Huang et al. (2015) dos 189 isolados de *A. baumannii* analisados 136 pertenciam a classe 1 dos integrons. No Iran também foi encontrado um resultado semelhante, na qual 89 dos 120 isolados apresentaram esse integron (GOUDARZI et al., 2016).

A resistência aos aminoglicosídeos em *A. baumannii* através da ação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) também tem sido associada aos integrons classe 1, principalmente em linhagens multirresistentes, como foi mostrado por Almasaudi (2016). Em um estudo conduzido por Upadhyay et al. (2018) na Índia mostrou que 109 dos 130 continham AMEs. Os genes que conferem resistência ao cloranfenicol também estão associados ao Integron classe 1 (FOURNIER et al, 2006; ROCA SUBIRÀ et al, 2012; HUANG et al, 2015).

Agrupamentos de genes de resistência como nas IGs também podem vir acompanhados de uma grande quantidade de ISs e Tns, visto que, esses elementos podem mediar a integração das ilhas no genoma bacteriano, e também facilitar a transferência de genes de resistência entre os isolados. A presença desses elementos também reflete a flexibilidade de recombinação durante a aquisição dos elementos de resistência (ZHU et al., 2013).

Sequências de Inserção (IS) são pequenos elementos transponíveis que codificam proteínas necessárias à sua transposição (HAWKEY et al, 2015). São segmentos simples de DNA menores que 2.5kb, e são capazes de se inserir em vários locais no genoma (MAHILLON, CHANDLER, 1998; PAGANO, MARTINS, BARTH, 2016). Enquanto os Tns são sequências que podem variar em tamanho de 3 a 40 kb, e conter dezenas de genes. Uma considerável quantidade de elementos ISs e Tns foram encontradas nas IGs estudadas e esse resultado mostra que essas regiões assim como os genes presentes foram adquiridos via TGH.

Entre as ISs, *Aba1* e *Aba125* são as mais bem caracterizadas e amplamente distribuídas em *A. baumannii* (MUGNIER, POIREL, NORDMANN, 2009; OWRANG et al, 2018). Estão associadas à resistência aos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, carreando principalmente os genes *oxa-51*, *oxa-23*, *oxa-58* e *ampC* (OWRANG et al, 2018; PAGANO, MARTINS, BARTH, 2016; NIGRO & HALL, 2016). Neste trabalho, 71% e 17% dos isolados apresentaram as ISs *Aba1* e *Aba125*, respectivamente, integradas nas IGs, contudo o programa *ISFINDER* não identificou nenhuma delas associada aos genes de resistência, mostrando a importância de se curar os dados manualmente. Os resultados mostram que a presença de elementos gênicos móveis, como as IGs, desempenham um importante papel na TGH, promovendo a aquisição e disseminação de genes de resistência na espécie *A. baumannii*, fato esse que preocupa a comunidade mundial, em relação ao crítico problema da resistência contra essas bactérias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As IGs presentes em isolados *A. baumannii* abrigam uma grande quantidade de MGEs e de genes de resistência a antibióticos. A presença desses elementos contribui significativamente para a adaptação e evolução bacteriana e para o surgimento de isolados multirresistentes. As IGs contribuem para a multirresistência principalmente envolvendo os genes de resistência aos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos. Os integrons são relevantes para a resistência aos aminoglicosídeos. Assim como os integrons, as ISs e Tns contribuem significativamente para a do *A. baumannii*. A grande quantidade de IS pode ser responsável pela transferência de genes de resistência entre bactérias, uma vez que esses elementos são capazes de transpor grupos maiores e menores de genes dentro do genoma ou entre isolados distintos. Além disso, podem ser responsáveis pela variação gênica entre os isolados de *A. baumannii*, uma vez que, podem promover mutações de inserção e rearranjos genômicos.

Nos últimos 30 anos, houve um acentuado aumento nas taxas de infecções hospitalares provocadas por *A. baumannii*. Esse aumento é consequência da rápida capacidade dessa bactéria de adquirir resistência antimicrobiana, culminando no surgimento de isolados multirresistentes (SNITKIN et al., 2011; LEAN; YEO, 2017). Mesmo sabendo que a resistência não é apenas um problema hospitalar, mas reconhecidamente um problema ecológico, ainda existe uma atenção maior direcionada as bactérias isoladas da clínica. No entanto, as bactérias ambientais constituem verdadeiras fontes para disseminação da resistência entre vários hospedeiros e reservatórios não-hospitalares e devem ser consideradas para a melhor compreensão e contenção do fenômeno da resistência (BERKNER; KONRADI; SCHÖNFELD, 2014; BERGLUND, 2015; BENGTSSON-PALME; KRISTIANSOON; LARSSON, 2017). Considerando que todos os isolados disponíveis e selecionados neste trabalho eram de origem nosocomiais, e que os hospitais são verdadeiros reservatórios de *A. baumannii*, a presença de IGs nesses isolados tem relevância para a compreensão do problema da multirresistência apresentada por este microrganismo.

REFERÊNCIAS

- AL-JABRI, Zaaima et al. **Integrase-controlled excision of metal-resistance genomic islands in *Acinetobacter baumannii***. *Genes*, v. 9, n. 7, p. 366, 2018.
- ALSAN, Marcella; KLOMPAS, Michael. ***Acinetobacter baumannii*: an emerging and important pathogen**. *Journal of clinical outcomes management: JCOM*, v. 17, n. 8, p. 363, 2010.
- ARBER, Werner. **Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution**. *Life*, v. 4, n. 2, p. 217-224, 2014.
- BAILEY, Jannine K. et al. Distribution of the bla TEM gene and bla TEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. ***Journal of antimicrobial chemotherapy***, v. 66, n. 4, p. 745-751, 2011.
- BALLABEN, Anelise S. et al. **Diversity of high-level aminoglycoside resistance mechanisms among Gram-negative nosocomial pathogens in Brazil**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. AAC. 01550-18, 2018.
- BENGTSSON-PALME, Johan; KRISTIANSSON, Erik; LARSSON, DG Joakim. **Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance**. *FEMS microbiology reviews*, v. 42, n. 1, p. fux053, 2017.
- BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features**. *Clinical microbiology reviews*, v. 9, n. 2, p. 148, 1996.
- BERGLUND, Björn. **Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics**. *Infection ecology & epidemiology*, v. 5, n. 1, p. 28564, 2015.
- BERKNER, Silvia; KONRADI, Sabine; SCHÖNFELD, Jens. **Antibiotic resistance and the environment—there and back again: Science & Society series on Science and Drugs**. *EMBO reports*, v. 15, n. 7, p. 740-744, 2014.
- BERTELLI, Claire et al. **IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets**. *Nucleic acids research*, v. 45, n. W1, p. W30-W35, 2017.
- BOUVET, Philippe JM; GRIMONT, Patrick AD. **Taxonomy of the genus**. 1986.
- BURMEISTER, Alita R. **Horizontal gene transfer**. *Evolution, medicine, and public health*, v. 2015, n. 1, p. 193, 2015.
- BUSH, Eliot C. et al. **xenoGI: reconstructing the history of genomic island insertions in clades of closely related bacteria**. *BMC bioinformatics*, v. 19, n. 1, p. 32, 2018.
- CHA, Kyoungun et al. **Characterization of two novel bacteriophages infecting multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and evaluation of their therapeutic efficacy in vivo**. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 696, 2018.
- CHANG, Yaowen et al. **Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chinese teaching hospital**. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 910, 2015.
- CHE, Dongsheng; HASAN, Mohammad; CHEN, Bernard. **Identifying pathogenicity islands in bacterial pathogenomics using computational approaches**. *Pathogens*, v. 3, n. 1, p. 36-56, 2014.
- CHERKAoui, Abdessalam et al. **Characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Geneva during colonization or infection**. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 14, n. 1, p. 42, 2015.

- COSTA, Ana Rita; MONTEIRO, Rodrigo; AZEREDO, Joana. **Genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* prophages reveals remarkable diversity and suggests profound impact on bacterial virulence and fitness.** *Scientific reports*, v. 8, 2018.
- CURY, Jean et al. **Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes.** *Nucleic acids research*, v. 44, n. 10, p. 4539-4550, 2016.
- DA SILVA FILHO, Antonio Camilo et al. **Comparative Analysis of Genomic Island Prediction Tools.** *Frontiers in genetics*, v. 9, 2018.
- DARMON, Elise; LEACH, David RF. **Bacterial genome instability.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 78, n. 1, p. 1-39, 2014.
- DAUBIN, Vincent; SZÖLLÖSI, Gergely J. **Horizontal gene transfer and the history of life.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 8, n. 4, p. a018036, 2016.
- DEYLAM SALEHI, Mitra et al. **Integron-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients, Babol, North of Iran.** *BioMed research international*, v. 2017, 2017.
- DHILLON, Bhavjinder K. et al. IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic acids research*, v. 43, n. W1, p. W104-W108, 2015.
- DIJKSHOORN, Lenie; NEMEC, Alexandr; SEIFERT, Harald. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Nature reviews microbiology*, v. 5, n. 12, p. 939, 2007.
- DOBRINDT, Ulrich et al. **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 5, p. 414, 2004.
- DOUARD, Gregory et al. **The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family.** *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15302, 2010.
- DOUBLET, Benoît et al. Novel insertion sequence-and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SG11 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 10, p. 3745-3754, 2008.
- DUFRESNE, Alexis et al. **Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria.** *Genome biology*, v. 9, n. 5, p. R90, 2008.
- EVEILLARD, Matthieu et al. **Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections.** *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. e802-e805, 2013.
- FARRUGIA, Daniel N. et al. **The complete genome and phenome of a community-acquired *Acinetobacter baumannii*.** *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e58628, 2013.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, Beatriz et al. **Patterns and architecture of genomic islands in marine bacteria.** *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 347, 2012.
- HACKER, Jörg; KAPER, James B. **Pathogenicity islands and the evolution of microbes.** *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 641-679, 2000.
- HIGGINS, Paul G. et al. **Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 2, p. 233-238, 2009.
- FOURNIER, Pierre-Edouard et al. **Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *PLoS genetics*, v. 2, n. 1, p. e7, 2006.

- HUERTA-CEPAS, Jaime et al. **Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper.** *Molecular biology and evolution*, v. 34, n. 8, p. 2115-2122, 2017.
- HSIAO, William WL et al. **Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands.** *PLoS genetics*, v. 1, n. 5, p. e62, 2005.
- HRENOVIC, Jasna et al. **Occurrence of an environmental *Acinetobacter baumannii* strain similar to a clinical isolate in paleosol from Croatia.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 9, p. 2860-2866, 2014.
- JUHAS, Mario et al. **Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** *FEMS microbiology reviews*, v. 33, n. 2, p. 376-393, 2009.
- JUNI, Elliott. **Genetics and physiology of *Acinetobacter*.** *Annual Reviews in Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 349-371, 1978.
- KOBS, Vanessa Cristine et al. **The role of the genetic elements bla_{oxa} and IS Aba 1 in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 4, p. 433-440, 2016.
- KRIZOVA, Lenka; NEMEC, Alexandr. **A 63 kb genomic resistance island found in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of European clone I from 1977.** *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 65, n. 9, p. 1915-1918, 2010.
- KRIZOVA, Lenka; DIJKSHOORN, Lenie; NEMEC, Alexandr. **Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 7, p. 3201-3206, 2011.
- LANGILLE, Morgan GI; BRINKMAN, Fiona SL. **IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands.** *Bioinformatics*, v. 25, n. 5, p. 664-665, 2009.
- LANGILLE, Morgan GI; HSIAO, William WL; BRINKMAN, Fiona SL. **Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach.** *BMC bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 329, 2008.
- LEAN, Soo Sum; YEO, Chew Chieng. **Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: Good, bad, who knows?.** *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1547, 2017.
- LEE, Chang-Ro et al. **Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 55, 2017.
- LEE, Sang-Yeop et al. **Proteogenomic characterization of antimicrobial resistance in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* DU202.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 6, p. 1483-1491, 2014.
- LIU, Chih-Chin et al. **The origin of *Acinetobacter baumannii* TYTH-1: a comparative genomics study.** *International journal of antimicrobial agents*, v. 41, n. 4, p. 318-324, 2013.
- LU, Bingxin; LEONG, Hon Wai. **Computational methods for predicting genomic islands in microbial genomes.** *Computational and structural biotechnology journal*, v. 14, p. 200-206, 2016.
- MANCILLA-ROJANO, Jetsi et al. **Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 132, 2019.
- MARTÍNEZ RAMOS, Pedro; MÁTTAR VELILLA, Salim. **Aminoglycoside resistance by aph (3)-Vla and aac (3)-II genes in *Acinetobacter baumannii* isolated in Montería, Colombia.** *Revista Salud Uninorte*, v. 28, n. 2, p. 209-

217, 2012.

MESSERER, Maxim; FISCHER, Wolfgang; SCHUBERT, Sören. **Investigation of horizontal gene transfer of pathogenicity islands in *Escherichia coli* using next-generation sequencing.** PloS one, v. 12, n. 7, p. e0179880, 2017.

MORADI, Jale; HASHEMI, Farhad B.; BAHADOR, Abbas. **Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: a systemic review of the published literature.** Osong public health and research perspectives, v. 6, n. 2, p. 79-86, 2015.

MUGNIER, Pauline D.; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. **Functional analysis of insertion sequence ISAb₁, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*.** Journal of bacteriology, v. 191, n. 7, p. 2414-2418, 2009.

NIGRO, Steven J. et al. **A novel family of genomic resistance islands, AbGRI2, contributing to aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, n. 3, p. 554-557, 2012.

NOWAK, J. et al. **High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 72, n. 12, p. 3277-3282, 2017.

NOWAK, Pawel; PALUCHOWSKA, Paulina. ***Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases.** Folia histochemica et cytobiologica, v. 54, n. 2, p. 61-74, 2016.

OCHMAN, Howard; LAWRENCE, Jeffrey G.; GROISMAN, Eduardo A. **Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.** nature, v. 405, n. 6784, p. 299, 2000.

PAGANO, Mariana; MARTINS, Andreza Francisco; BARTH, Afonso Luis. **Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.** brazilian journal of microbiology, v. 47, n. 4, p. 785-792, 2016.

POIREL, Laurent et al. ***Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 52, n. 4, p. 1252-1256, 2008.

SEWARD, R. J.; LAMBERT, T.; TOWNER, K. J. **Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp.** Journal of medical microbiology, v. 47, n. 5, p. 455-462, 1998.

RAZ, Yoav; TANNENBAUM, Emmanuel. **The influence of horizontal gene transfer on the mean fitness of unicellular populations in static environments.** Genetics, v. 185, n. 1, p. 327-337, 2010.

RAZAVI NIKOO, Hadi; ARDEBILI, Abdollah; MARDANEH, Jalal. **Systematic review of antimicrobial resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates in Iran: an update.** Microbial Drug Resistance, v. 23, n. 6, p. 744-756, 2017.

ROCA SUBIRÀ, Ignasi et al. **The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace.** Frontiers in microbiology, v. 3, p. 148, 2012.

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.

SARHADDI, Nazanin et al. **Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest**

- burn centre of northeast Iran.** Journal of global antimicrobial resistance, v. 8, p. 60-66, 2017.
- SHAH, Bhumika S. et al. **Structure of a short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) within a genomic island from a clinical strain of Acinetobacter baumannii.** Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications, v. 70, n. 10, p. 1318-1323, 2014.
- SHRESTHA, S. et al. **Emergence of aminoglycoside resistance due to armA methylase in multi-drug resistant Acinetobacter baumannii isolates in a University Hospital in Nepal.** Journal of Nepal Health Research Council, 2016.
- SIEBOR, Eliane; NEUWIRTH, Catherine. **Proteus genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two Proteus mirabilis French clinical isolates.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, n. 12, p. 3216-3220, 2014.
- SIGUIER, Patricia et al. **ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences.** Nucleic acids research, v. 34, n. suppl_1, p. D32-D36, 2006.
- SNITKIN, Evan S. et al. **Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of Acinetobacter baumannii.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 108, n. 33, p. 13758-13763, 2011.
- SOUCY, Shannon M.; HUANG, Jinling; GOGARTEN, Johann Peter. **Horizontal gene transfer: building the web of life.** Nature Reviews Genetics, v. 16, n. 8, p. 472, 2015.
- TACCONELLI, E. et al. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.** World Health Organization, v. 27, 2017.
- TRAGLIA, German et al. **Genome sequence analysis of an extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii indigo-pigmented strain depicts evidence of increase genome plasticity.** Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 16961, 2018.
- TUON, Felipe F.; ROCHA, Jaime L.; MERLINI, Alexandre B. **Combined therapy for multi-drug-resistant Acinetobacter baumannii infection—is there evidence outside the laboratory?** Journal of medical microbiology, v. 64, n. 9, p. 951-959, 2015.
- UPADHYAY, Supriya et al. **High-level aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii recovered from Intensive Care Unit patients in Northeastern India.** Indian journal of medical microbiology, v. 36, n. 1, p. 43, 2018.
- VANNUCCI, Fabio A.; KELLEY, Molly R.; GEBHART, Connie J. **Comparative genome sequencing identifies a prophage-associated genomic island linked to host adaptation of Lawsonia intracellularis infections.** Veterinary research, v. 44, n. 1, p. 49, 2013.
- WAACK, Stephan et al. **Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models.** BMC bioinformatics, v. 7, n. 1, p. 142, 2006.
- WIBBERG, Daniel et al. **Complete genome sequencing of Acinetobacter baumannii strain K50 discloses the large conjugative plasmid pK50a encoding carbapenemase OXA-23 and extended-spectrum β -lactamase GES-11.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 62, n. 5, p. e00212-18, 2018.
- WEINSTEIN, Robert A. et al. **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.** Clinical infectious diseases, v. 41, n. 6, p. 848-854, 2005.

- WRIGHT, Meredith S. et al. **Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment.** *Genome medicine*, v. 8, n. 1, p. 26, 2016.
- ZANDER, Esther et al. **Characterization of blaOXA-143 variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2704-2708, 2014.
- ZHANG, Gang et al. **A new subclass of intrinsic aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT (3'')-II, is horizontally transferred among *Acinetobacter* spp. by homologous recombination.** *PLoS genetics*, v. 13, n. 2, p. e1006602, 2017.
- ZHANG, Ren; ZHANG, Chun-Ting. **Genomic islands in the *Corynebacterium efficiens* genome.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n. 6, p. 3126-3130, 2005.
- ZHANG, Xi et al. **Comparative analysis of essential genes in prokaryotic genomic islands.** *Scientific reports*, v. 5, p. 12561, 2015.
- ZHU, Lingxiang et al. **Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements.** *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e66584, 2013.
- ZHU, Yuying et al. **Distribution and molecular profiling of class 1 integrons in MDR *Acinetobacter baumannii* isolates and whole genome-based analysis of antibiotic resistance mechanisms in a representative strain.** *Microbiological research*, v. 169, n. 11, p. 811-816, 2014.

APÊNDICE 1 – DADOS DAS ILHAS E DOS GENOMAS

Nº identificação	Tamanho do genoma	Tamanho da Ilha	Total de ilhas	Q genes de resistência
NC_017162.1	3940614	324632	12	5
NC_011586.2	4055148	216061	9	13
NZ_CP012006.1	3935688	311893	18	4
NC_010611.1	3904116	185032	7	3
NZ_CP012004.1	3857743	195481	8	0
NC_021726.1	3951920	230237	8	4
NC_021733.1	4001621	310088	14	9
NC_021729.1	3906795	153344	5	4
NC_020547.2	3704284	186679	8	0
NZ_AP014649.1	4000970	170582	9	2
NZ_CP017152.1	4178958	405335	17	18
NZ_LN865143.1	3928513	208535	8	0
NZ_LN868200.1	3819158	231776	14	0
NZ_LN997846.1	3939746	247404	11	2
NZ_CP007712.1	3954354	360960	15	4
NC_017847.1	3964912	233166	8	15
NC_017171.1	3991133	445713	16	7
NZ_AP013357.1	4021920	298285	17	8
NC_010410.1	3936291	285103	12	26
NZ_LT594095.1	4042750	299680	12	10
NZ_CP015364.1	3998012	345313	16	8
NZ_CP010397.1	3902527	277520	11	0
NZ_CP010781.1	3909008	158655	6	0
NZ_CP009257.1	4335793	581900	24	4
NZ_CP009256.1	3803317	166032	7	4
NZ_CP019034.1	4004719	339358	12	2
NZ_CP008706.1	3972672	170137	9	0
NZ_CP009534.1	3875775	127733	5	5
NZ_CP007535.2	3851648	139540	5	2
NZ_CP018254.1	4250048	270211	15	5
NZ_CP018256.1	3982140	298233	11	16
NZ_CP018664.1	4004792	383065	12	2
NZ_CP016295.1	3970947	247805	11	18
NZ_CP016300.1	3990003	251769	10	16
NZ_CP016298.1	3965390	254947	10	18
NZ_CP012952.1	4063596	218947	9	0
NZ_CP018143.1	4021072	290415	11	16
NZ_CP017642.1	3963217	282979	11	4
NZ_CP017644.1	4004978	235662	9	6
NZ_CP017646.1	3983069	328220	13	8
NZ_CP017648.1	4006639	238459	11	11
NZ_CP017650.1	3967717	274171	10	11
NZ_CP017652.1	3967831	268872	10	11
NZ_CP017654.1	3982361	243612	10	11
NZ_CP017656.1	3973763	265073	11	7
NZ_CP013924.1	4086879	231883	12	18
NZ_CP018421.1	4011552	348347	12	20
NZ_CP010779.1	4087343	331044	15	20
NZ_CP014541.1	3908399	268139	11	24
NZ_CP014540.1	3908399	283547	14	20
NZ_CP014528.1	4172609	396473	17	8
NZ_CP014539.1	3977071	254326	10	10
NZ_CP014538.1	3846621	260035	9	8
NZ_CP014215.1	4075545	285950	13	21
NC_018706.1	3957368	325926	8	14
NC_023028.1	3763012	59998	2	0
NZ_CP024911.1	3759495	89320	3	0
NZ_CP024613.1	4000452	214924	8	4
NZ_CP024612.1	3913931	231392	9	8
NZ_CP024611.1	3966912	226290	8	5
NZ_CP015121.1	3980886	236903	11	2
NZ_CP024576.1	4052889	273615	11	0
NZ_CP024124.1	3991735	259402	10	12
NZ_CP021347.1	3824908	378402	19	1
NZ_CP021342.1	3947826	295602	14	0
NZ_CP020586.1	3996455	254299	11	3
NZ_CP020597.1	4077713	155509	8	0
NZ_CP020584.1	3974901	227777	9	5
NZ_CP018677.1	3974606	366221	15	7
NZ_CP020579.1	3972565	228993	10	5
NZ_CP020578.1	3982722	235009	10	5
NZ_CP020591.1	3884414	205536	9	16
NZ_CP020581.1	3932204	264565	11	5
NZ_CP020595.1	3930178	161286	6	1
NZ_CP020592.1	3913358	220014	8	12
NZ_CP020598.1	3870945	152944	8	0
NZ_CP024418.1	3999012	307819	13	9
NZ_CP018332.1	3686342	190475	10	0
NZ_CP025266.1	3983848	194570	10	10
NZ_CP020574.1	3966348	219981	11	9
NZ_CP021782.1	4039997	167773	6	8
NZ_CP020590.1	3866657	232051	10	11

APÊNDICE 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ISS E TNS DE ACORDO COM A FAMÍLIA

IS família	Sequências de Inserção e Transposons
IS1	ISPa14, ISAba3, ISPssp2, IS1R, IS1B IS1D, IS1G, IS1A, IS1SD, IS1S, IS1X2, IS1X4, IS1X3, IS1X1, IS1F, ISKpn14, ISKne1, ISCpr1.
IS21	IS1326, ISLisp1, ISPsy20, ISVasp1, ISPpu27, ISThsp5, ISAisp7, ISAlde1 ISRme4, ISPa64, ISVapa3, ISPman1 ISCsp4, ISThsp19, IS1600, ISAlde2, ISCte8, ISAisp6, ISPst3, ISPpn1, ISPa63, ISMex39, ISMex27, ISAav1 ISBdi7, ISJsp3, ISVapa4, ISPa36, ISPa65, ISMdi27, ISGdi17, ISRsp3, ISCsp3, ISAisp1, ISPKr1, ISThsp2, ISSsp4, ISDev1, ISAlisp1, ISAba8, ISEc57.
IS256	ISAba26, ISAbe10, ISAba42, ISEc39 ISCp1, ISAba50, IS285.
IS3	ISAba22, ISAba21, ISAcsp3, IS1236 ISAbe12, ISSfl10, ISSd1, IS600, ISAba14, ISAba19, ISAba2, ISAba34 ISAba29, ISAba18, ISAc1, ISAcsp5 ISShfr8, ISRtr2, ISPpu33, ISStma17 ISMca3, IS1416, ISAli4, ISRme15, ISPmi1, ISSod2, ISAba45, ISBce15, ISEnfa3, IS1296, ISBth167, ISFnu6 ISStrsp1, ISLhe61, ISEch2, ISFnu8 IS51, ISCce4, ISPar1, ISKpn11, ISBj3 ISMex7, IS1221I, IS1221E, ISBt3, ISAFE7, ISJsp1.
IS30	ISAba125, ISC1041, ISAbe8, IS18.
IS4	ISAba1, ISAba33, ISEc29, ISEc77 IS10A, ISPpr1, ISShes6, ISSod3, ISPa13.
IS481	ISWpi2, ISEc18.
IS5	ISAba10, ISVa2, ISAba13, ISAba31, IS17, ISAba12, ISAha1, ISAba40, ISAlw1, ISAjo1, ISAbe13, ISAha3, ISAha2, ISAba7, ISAba5, ISSf1, ISAba27, IS1301, ISAc2, ISAt1, ISEc28, ISEc35, IS5D, IS5B, IS5, ISPrre2, ISVal1, ISSpu16, ISSgl1, ISAs14, ISPa35, ISEcl3, IS903, IS102 ISSba21, ISVvu5, ISBvi6, ISCte6, ISCpi1, ISAba15, ISNieu4, ISStma16 ISAzo36, ISXo3, ISBam3, ISDsh5, ISDsh4, ISVpa3.
IS6	IS26, IS15DIV, IS15DII, IS15, IS15DI IS1006, IS1007, ISOur1, IS1008, ISStag1, ISAc2, IS6100, ISMtsp2.
IS630	ISAba44
IS66	ISAba16, ISAba17, ISAba25, ISAba46, ISAba49, ISPa75, ISPsy43 ISPpu14.
IS701	ISAba11
IS91	ISVsa3
IS982	ISAba825, ISAcsp2, ISAba47, ISAba9

	ISAb4.
ISI3	ISStma11, ISPPu12, IS1396, ISPst2 ISPst9, IS1489v1, ISAb43, ISPa61 IS1001, ISGme5, ISRso15, ISThsp14 ISAeme19, ISAbe14, ISKpn25, ISSm4, ISBma1.
ISNCY	ISAjo2, ISAb32, ISLad2, ISCARN112.
Tn3	TnAs3, Tn5393, TnAs2, Tn2, Tn3, ISPa38, ISShes11, ISAzs17, TnShfr1 ISSod9, TnAs1, ISPa40, ISArsp6, ISPa42, ISEc63, ISAcsp1, ISXc4, ISPsy42, ISThsp9, ISMex22.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pois tudo que estou vivendo hoje não seria possível se a Sua mão não estivesse no controle.

À minha mãe, pela compreensão, incentivo e pela ajuda nos momentos que mais precisei.

A meu pai, pelo incentivo, apoio e por ter me ajudado nos momentos que meu computador quis parar.

À minha irmã, pela compreensão e pelo apoio.

À Dra. Daniela Santos Pontes, minha orientadora, pela paciência, pela dedicação, pelos conselhos, pela ajuda, pois se não fosse por ela eu não teria chegado até aqui.

À Ms. Nyedja Fialho Morais Barbosa, minha coorientadora, por ter me auxiliado na parte estatística com paciência.

Às minhas colegas de laboratório, Valeska e Damara, por terem me auxiliado mesmo que indiretamente, nos momentos de nervosismo estavam lá me acalmando e me fazendo rir.