



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Evelin Padilha Corrêa

Isolamento e caracterização de bacteriófagos oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas para fins de controle de *Pseudomonas aeruginosa*

Florianópolis

2023

Evelin Padilha Corrêa

Isolamento e caracterização de bacteriófagos oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas para fins de controle de *Pseudomonas aeruginosa*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof.(a) Dra. Gislaine Fongaro
Coorientador(a): MSc Mariana Alves Elois

Florianópolis
2023

Corrêa, Evelin Padilha

Isolamento e caracterização de bacteriófagos oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas para fins de controle de *Pseudomonas aeruginosa* / Evelin Padilha Corrêa ; orientadora, Gislaine Fongaro, coorientador, Mariana Alves Elois, 2023.

91 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Fagoterapia. 3. resistência antimicrobiana. 4. controle de infecção. 5. interações fago-hospedeiro. I. Fongaro, Gislaine. II. Elois, Mariana Alves. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Evelin Padilha Corrêa

Isolamento e caracterização de bacteriófagos oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas para fins de controle de *Pseudomonas aeruginosa*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

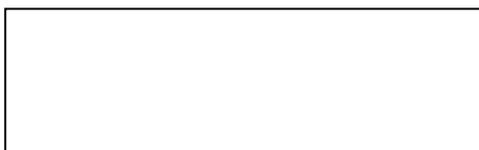
Florianópolis, 18 de setembro de 2023.



Coordenação do Curso



Prof.(a) Gislaine Fongaro Dr.(a)
Orientador(a)



MSc. Mariana Alves Elois
Coorientador(a)

Florianópolis, 2023.

Dedicado àqueles que atualmente sofrem com feridas crônicas e perderam o brilho
no olhar. Eu vejo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por uma formação gratuita e de qualidade. Ao Centro de Ciências Biológicas e aos professores por toda a estrutura e conhecimento fornecido. Agradeço ao apoio do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário por intermédio da Dr.(a) Mara Cristina Scheffer que forneceu o material inicial para a concretização desse trabalho.

Gostaria de agradecer a orientação, experiência e intelecto da Prof.(a) Dr.(a) Gislaine Fongaro, você me ensinou, me deu oportunidade de acessar essa jornada de aprendizados e conhecimentos, tanto científicos quanto vitais e me possibilitou conhecer algumas realidades que eu não conhecia, obrigada.

Agradeço a coorientação da MSc Mariana Alves Elois, toda sua dedicação, companhia, presença e paciência para que esse trabalho fosse concluído, sem você não teria sido possível.

Agradeço também à toda a equipe LVA, em destaque à Helena Caio e Amanda Ferreira que me auxiliaram nos experimentos e me ofereceram o melhor de si. Ao meu parceiro Estevão Brasiliensis, é um prazer ter te conhecido e compartilhado um pouquinho do que sabemos sobre fagos, obrigada pela tua companhia aos sábados, domingos e feriados e por você ser do jeitinho que você é, autêntico, sincero e feliz.

Agradeço ao Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni, você me enxergou, estimulou meu intelecto e meu lado visionário, me incentivou à ciência, temeu por mim, me amparou nos momentos difíceis, foi mestre. Da mesma forma, agradeço ao apoio recebido pelo Prof. Dr. Carlos Pinto em vários momentos finais da graduação e por acreditar tanto em mim, sua alegria e brilho transbordam.

Gostaria de agradecer ao fundador e arquiteto original de todas as coisas, aquele que tudo sabe, tudo vê e em tudo está. Obrigada pela vida, brilho no olhar e vontade de realizar o bem. Eu nunca me senti sozinha em tua presença e pela capacidade que me deu de aprender e admirar a tua obra, hoje sei que todas as minhas lágrimas precipitam ao céu em forma de chuva e retornam a tocar a terra para sanar a minha própria sede e a sede dos seres que me deste a possibilidade de amar, desse meu jeitinho.

Agradeço à minha preciosa mãe Elisa Padilha, herdei de ti o intelecto, a praticidade e a resiliência, a senhora é minha inspiração de força, obrigada por ter cuidado e amado a sua sementinha. Te amarei eternamente. Obrigada ao meu irmão Matheus Padilha Corrêa por me

fazer rir o tempo todo, que sorte ser tua irmã, eu vivo em você e você vive em mim. Tenho orgulho de você e da tua humanidade.

Gostaria de agradecer à minha amada e falecida avó Francisca Borges, infelizmente não deu tempo para que nossas promessas pudessem ser concretizadas, mas carrego toda a sua força, observação, coragem e capacidade de amar e perdoar. Sempre serás a minha lembrança do que é cuidar de algo que nos é precioso. Obrigada ao meu falecido caboclo e pai Iberê Antônio Corrêa que me entregou sua criatividade e amor pela natureza e pela vida, onde estiver, espero que estejas livre e feliz. Vó, pai, Kika, a falta que eu sinto de vocês também está nesse trabalho na forma de resignação. Tudo isso ter acontecido junto, só me fez mais forte, obrigada por terem me ensinado até o fim.

Agradeço à Jennyfer Karen Knorst, parceira de faculdade e de vida, você me deu chão quando minha mente se perdia no céu e caminhamos juntas até aqui, foi lindo, obrigada por existir. À minha querida amiga Fernanda Luiza Ferrari que compartilha sorrisos e dores comigo em toda a nossa ternura de amar, você é importante e merece sim todo esse amor. Gostaria de agradecer à Yasmin Santos, quando a noite negra da alma cobriu meus olhos, você foi a minha luz guia, eu nunca vou esquecer, te amo com aquela vozinha. Fernando Ataíde, obrigada por ser junto de mim tão profundo e sensível, perto de ti, sinto que minha alma não está escrita em mandarim. Agradeço à Maria Eduarda de Souza, você me acompanhou boa parte da graduação e sem teu cuidado e carinho, eu não teria a qualidade de aprendizado que tive.

Agradeço à Rejane Pedro por me amparar em momentos difíceis. À Paula Sousa por sua racionalidade e ter me possibilitado conhecer pessoas incríveis. À Alessandra Bastos que sempre me olhou com os olhos brilhantes e encheu o ambiente de graça. À Silvia Mussi Viegas por expandir minhas perspectivas sobre mim, meus sentimentos, realidades e sobre coisas que realmente fazem sentido na trajetória que eu busco, obrigada lego. À Daysi Sebaje por acreditar na minha capacidade e me mostrar sua visão do futuro. À Beatriz Guimarães por ter sentido junto de mim, me ouvido e me apoiado em momentos complexos. À Elisama Sinn que no breve contato que tivemos ocupou seu lugar naquelas conexões naturais da vida e me lembrou quem eu sou em mais um daqueles momentos que eu mesma tinha esquecido. À Luiza Sena por ser quem é e me fazer acreditar que nada nessa vida é ao acaso. À Ana Pérola por seu abraço único e ao Luis Henrique por compartilhar tanto amor pela natureza comigo. A todos/todas que me apoiaram, me amaram e me entenderam nas minhas falhas, acertos, escolhas e ausências, por terem acreditado em mim e não terem me deixado esquecer meus propósitos. Sutilezas são inesquecíveis.

Agradeço à Nadia Drigo, Elisabete Lúdia e Pedro Nunes por terem me apoiado, compreendido e confiado no meu trabalho na área da saúde, despendido os recursos possíveis para dedicação aos meus estudos.

Gostaria de agradecer aos pacientes da UBS Bela Vista de São José, vocês me inspiraram a unificar meus aprendizados com uma dor real e me ensinam cada dia mais a ser humilde perante a existência, pois nela, todas as possibilidades estão em aberto.

E por último a e não menos importante, agradeço ao momento em que vi os fagos espalhados pela placa de Petri pela primeira vez. Essa visão, tão simples, esse sentimento, indefinível, o choro de emoção e felicidade voltando para casa, a esperança de tornar a vida de quem sofre um pouco melhor, foi minha âncora durante esses dois anos. Nada foi suficiente para nublar esse sentimento e é à essa memória que eu honro a entrega deste trabalho.

“À medida que a natureza encontra formas de se regenerar sozinha, ela nos permite desbravar seu conhecimento milenar, que unido com a ciência e a nossa dedicação, nos conduz à exploração de novos horizontes na busca pelo alívio do sofrimento humano. Que possamos olhar para o simples em busca do que é inovador e encontrar no futuro a chance de redimir as faltas e os excessos que cometemos até aqui.”

(Corrêa, E.P, 2023).

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa têm relevância clínica notável como uma bactéria frequentemente presente na colonização de feridas crônicas. O controle dessa bactéria é desafiador devido aos seus mecanismos de virulência e resistência a múltiplos medicamentos. Bacteriófagos têm demonstrado significativo potencial biotecnológico como alternativas e sinergistas aos tratamentos convencionais, sendo capazes de causar lise das células bacterianas, além de atuarem em biofilmes e tecidos pouco vascularizados, comuns em feridas crônicas. Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar morfologicamente por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) bacteriófagos oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas, bem como avaliar sua tolerância a variações de temperatura e pH e sua capacidade lítica *in vitro*. Infecções *in vitro* foram induzidas por meio da técnica de duplo de ágar. Como resultado, foram obtidos 19 fagos de *P. aeruginosa*. Estes foram titulados e tiveram seu perfil lítico analisado quanto à morfologia das placas de lise. Os fagos (BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2) foram selecionados para testes de tolerância a diferentes pHs (3,0; 7,4 [controle]; 8,9; e 11,0) durante 18 horas, e temperaturas (4 °C [controle], 45 °C e 60 °C) durante 1 hora. Os resultados não indicaram diferenças significativas entre os grupos testados e os controles ($p > 0,05$), evidenciando a alta tolerância desses seis bacteriófagos às variações avaliadas. Estes seis isolados foram caracterizados morfologicamente por MET, revelando a presença de membros da classe *Caudoviricetes* e agregados fágicos. O isolado PBPA1 foi avaliado quanto a capacidade de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* (ATCC N°27853) e clínica *in vitro* em diferentes diluições na base 10 (-1, -3, -4, -5 e -7) tratado com uma quantidade fixa do fago PBPA1 (10^{10} UFP mL⁻¹) usando ensaio por absorvância durante 12 horas. Como resultado, PBPA1 foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* ATCC e clínica em 100% em MOI de 1000 e 88,5% em apenas uma hora de ensaio em um MOI de 100 em *P. aeruginosa* clínica. Fatores de virulência, dinâmica de interação entre fagos e hospedeiros, agregação fágica, morfologia, capacidade lítica, relevância clínica e farmacológica da tolerância e infectividade são alguns tópicos discutidos nesse trabalho. Os resultados deste estudo oferecem contribuições valiosas para o avanço da terapia com bacteriófagos, com o potencial de beneficiar a saúde pública e a qualidade de vida de pacientes com infecções resistentes a antibióticos, especialmente em casos de feridas crônicas.

Palavras-chave: Fagoterapia; resistência antimicrobiana; controle de infecção; interações fago-hospedeiro.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa holds notable clinical relevance as a bacterium frequently found in the colonization of chronic wounds. Controlling this bacterium is challenging due to its virulence mechanisms and resistance to multiple drugs. Bacteriophages have shown significant biotechnological potential as alternatives and synergists to conventional treatments, capable of causing bacterial cell lysis and acting on biofilms and poorly vascularized tissues commonly present in chronic wounds. This study aimed to isolate and morphologically characterize *P. aeruginosa* bacteriophages from human chronic wound bacteriological samples using transmission electron microscopy (TEM). Their tolerance to temperature and pH variations and in vitro lytic capacity were also evaluated. In vitro infections were induced using the double agar technique, resulting in 19 *P. aeruginosa* phages. These phages (BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5, and SPA2) were selected for tolerance tests at different pH levels (3.0, 7.4 [control], 8.9, and 11.0) for 18 hours and temperatures (4°C [control], 45°C, and 60°C) for 1 hour. Results did not indicate significant differences between the tested groups and controls ($p>0.05$), demonstrating the high tolerance of these six bacteriophages to the assessed variations. TEM characterization revealed the presence of *Caudoviricetes* class members and phage aggregates among these six isolates. PBPA1 was assessed for its ability to inhibit the growth of *P. aeruginosa* (ATCC No. 27853) and clinical *P. aeruginosa* in vitro at different 10 - base dilutions (-1, -3, -4, -5, and -7), treated with a fixed quantity of PBPA1 phage (10^{10} PFU mL⁻¹) using absorbance assays over 12 hours. As a result, PBPA1 inhibited the growth of both *P. aeruginosa* ATCC and clinical *P. aeruginosa* by 100% at an MOI of 1000 and 88.5% in just one hour at an MOI of 100. This study discussed topics such as virulence factors, the dynamics of phage-host interactions, phage aggregation, morphology, lytic capacity, clinical and pharmacological relevance, tolerance, and infectivity. The findings of this study provide valuable contributions to the advancement of bacteriophage therapy, with the potential to benefit public health and the quality of life of patients with antibiotic-resistant infections, particularly in cases of chronic wounds.

Keywords: phage therapy; antimicrobial resistance; infection control; phage-host interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo da inflamação cíclica correlacionado ao crescimento excessivo de bactérias.....	20
Figura 2 – Etapas da formação de biofilme.....	22
Figura 3 – Modelo esquemático representativo de uma partícula de fago pertencente à antiga ordem dos <i>Caudovirales</i>	28
Figura 4 - Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia e material genético.	30
Figura 5 - Ciclo lítico e lisogênico dos bacteriófagos.	32
Figura 6 – Tratamento de infecção bacteriana em ferida utilizando a biologia dos bacteriófagos líticos.....	34
Figura 7 – Técnica de camada dupla de ágar (DAL).....	41
Figura 8 - Desenho experimental.	45
Figura 9 – Comparativo dos controles e de placa com aparente infecção fágica.....	48
Figura 10 - Placas claras.	51
Figura 11 - Placas opacas.	52
Figura 12 - Placas claras e incontáveis.....	53
Figura 13 - Parâmetros de morfologia.....	57
Figura 14 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família <i>Podoviridae</i>	58
Figura 15 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família <i>Myoviridae</i>	59
Figura 16 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família <i>Myoviridae</i>	60
Figura 17 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família <i>Myoviridae</i>	61
Figura 18 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família <i>Siphoviridae</i>	62
Figura 19 - Resultado do efeito na tolerância dos fagos nos diferentes níveis de pH testados.	65
Figura 20 - Resultado do efeito na tolerância dos fagos em 45 °C e 60 °C comparado aos seus respectivos controles.....	68
Figura 21 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano realizado pelo fago PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC e <i>P. aeruginosa</i> clínica. ...	71
Figura 22 – Crescimento bacteriano do controle <i>versus</i> tratamento realizado pelo fago PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC N°27853) representado em densidade óptica.	73

Figura 23 - Crescimento bacteriano do controle *versus* tratamento realizado pelo isolado PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de *P. aeruginosa* clínica representado em densidade óptica 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais tipos de bacteriófagos, características morfológicas e genômicas.	28
Tabela 2 - Resultado da bioprospecção de bacteriófagos em <i>P. aeruginosa</i>	46
Tabela 3 - Caracterização morfológica do perfil lítico dos bacteriófagos isolados.....	50
Tabela 4 – Constituição do perfil morfológico presente em cada isolado.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

B: *Bones* (Osso)

B: beta

C: Circular

Ca 2+: Íon de Cálcio

DAL: *Double Agar Layer* (Camada Dupla de Ágar)

DO: Densidade óptica

dsDNA: DNA de fita dupla

dsRNA: RNA de fita dupla

EPS: Exopolissacarídeos

ESBL: *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (Beta-Lactamase de Espectro Estendido)

ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.*

g: Força G

h: Horas

hd: *Head diameter* (diâmetro da cabeça)

HU: Hospital Universitário

HCl: ácido clorídrico

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

kV: Kilovolts

L: Linear

LB: Luria Bertani

LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LVA: Laboratório de Virologia aplicada

M: Multipartido

M: Molar

MET: Microscópio eletrônico de transmissão (Transmission electron microscopy)

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: Mililitro

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MMPs: *Matrix metalloproteinases* (Proteinases metálicas de matriz degradativa, metalproteinases)

MOI: *Multiplicity Of Infection* (Índice de Multiplicidade Viral)

MRSA: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina)

NaCl: Cloreto de sódio

nm: Nanômetros

ns: Não significativo

p: *p-value* (valor-p)

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

PB: *Proximal bones* (Osso proximal)

pH: Potencial Hidrogeniônico

QS: *Quorum sensing* (sem tradução literal, pode ser compreendido como “Percepção de quórum” ou “detecção de densidade populacional”)

rpm: Rotações por minuto

S: *Skin* (Pele)

S: Superenrolado

SH1: *Haloarcula hispanica* 1 virus (Vírus *Haloarcula* hispânica)

SM: Salino de Maleato

ssDNA: DNA de fita simples

ssRNA: RNA de fita simples

STIV: *Sulfolobus Turreted Icosahedral Virus* (Vírus icosaédrico com torreta *Sulfolobus*)

T: *Tendon* (Tendão)

td: *tail diameter* (diâmetro da cauda)

TEM: *Transmission electron microscopy* (Microscópio eletrônico de transmissão)

tl: *tail length* (comprimento da cauda)

TLR: *Toll-like receptor* (Receptor do tipo toll-like)

TM: Tris-Maleato

TMV: *Tobacco mosaic virus* (Vírus do mosaico do tabaco nativo)

Tris-HCl: Cloreto de Tris (hidroximetil) Aminometano

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UFP: Unidade Formadora de Placas

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

ULAC: Unidade de Laboratório de Análises Clínicas

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius

%: Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	FERIDAS CRÔNICAS	18
2.2	BACTÉRIAS E FATORES DE INFLUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	20
2.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.2.2	Resistência antimicrobiana	25
2.3	COEXISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS E BACTERÍÓFAGOS E IMPLICAÇÃO TERAPÊUTICA	26
2.3.1	Definições e características gerais	26
2.3.2	Biologia dos bacteriófagos	27
2.3.3	Uso biotecnológico e terapêutico dos bacteriófagos	32
3	HIPÓTESE	37
4	OBJETIVOS	38
4.1	OBJETIVO GERAL	38
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	39
5.2	CULTURA, ISOLAMENTO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS BACTERÍÓFAGOS	39
5.3	TITULAÇÃO VIRAL	41
5.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LISADOS E DOS BACTERÍÓFAGOS	42
5.4.1	Morfologia das placas de lise	42
5.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão	42
5.5	TESTE DE REDUÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR FAGOS <i>IN VITRO</i>	43
5.6	TESTE DE TOLERÂNCIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PH	44
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	BIOPROSPECÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS	46
6.1.1	Isolamento de bacteriófagos utilizando <i>P. aeruginosa</i>	46

6.2	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LÍTICO DOS BACTERÍOFAGOS E MORFOLOGIA	48
6.2.1	Morfologia das placas de lise e perfil lítico.....	48
6.2.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	56
6.3	TESTES DE TOLERÂNCIA	64
6.3.1	Tolerância pH	64
6.3.2	Tolerância temperatura	67
6.4	TESTE DE REDUÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR FAGOS <i>IN VITRO</i>	70
7	CONCLUSÃO.....	78
8	PERSPECTIVAS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Feridas crônicas são feridas que não cicatrizam no período de até três meses, acarretando dificuldades mecânicas, laborais, psicológicas e sociais aos acometidos e seus familiares, influenciando negativamente na qualidade de vida e levando em último caso, devido as complicações, à morte (NEWBERN, 2018). Nas feridas agudas, a inflamação e presença de neutrófilos, células do sistema imune inato responsáveis pelo reconhecimento de agentes infecciosos e resposta pró-inflamatória aguda, fazem parte do processo natural da cicatrização. Entretanto, nas feridas crônicas, estes mesmos fatores desempenham um papel negativo no sentido de reposição tecidual, promovendo um estado de inflamação cíclica (MENKE et al., 2007; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013; ZHAO et al., 2016)

No decorrer do processo de cicatrização, as bactérias desempenham uma função negativa crucial, especialmente quando encontram um ambiente suscetível à sua colonização e posterior infecção. Isso é comum em pacientes cujas feridas progridem para um estado crônico devido às comorbidades associadas a essa condição (RAZIYEVA et al., 2021; WERDIN et al., 2009). Dentre as bactérias colonizadoras predominantes em feridas crônicas, *Pseudomonas aeruginosa* demonstra notável importância clínica devido a seus diversos mecanismos de virulência e evasão imunológica, como formação de biofilmes, produção de diversos tipos de toxinas e multirresistência aos mais variados antimicrobianos (GJØDSBØL et al., 2006; GARCIA et al., 2021). Os processos de aquisição de resistência e multirresistência antimicrobiana são os mais variados e vão desde a aquisição de genes de resistência, transferências horizontais através de transposons e plasmídeos, até remodelação da parede celular e dos receptores alvo, promovendo mecanismos de efluxo multidrogas (C REYGAERT, 2018).

Oportunamente, os bacteriófagos têm demonstrado notável potencial como tratamento alternativo ou concomitante aos antimicrobianos comumente utilizados, além de possuírem permeabilidade em biofilmes, assim como em tecidos pouco vascularizados, principalmente quando aplicados de forma direcionada. Essas duas características são comuns em feridas crônicas (DAŁBROWSKA; ABEDON, 2019; LIU et al., 2022). O mecanismo pelo qual os bacteriófagos exercem interesse terapêutico é por meio de seu ciclo replicativo por via lítica. Esse processo envolve a lise celular, resultando no controle da população bacteriana, impulsionada pela rápida replicação viral (HARADA et al., 2018; KASMAN; PORTER, 2023).

Os sistemas de entrega de fagos são diversos, mas se tratando de feridas, as soluções tópicas como sprays, pomadas, cremes e loções podem ser eficazes na cicatrização, assim como sua aplicação e remoção são facilitadas (BROWN et al., 2018; EL-SHIBINY; EL-SAHHAR, 2017; HARADA et al., 2018). Assim como ocorre com a aplicação de medicamentos, a tarefa de guiar os fagos até o local da infecção ainda se apresenta como um desafio para alcançar uma terapia eficaz. A estabilidade dos fagos é um desafio, pois eles requerem refrigeração para armazenamento e a longo prazo sua dinâmica de interação é alterada com variações de pH. Essa limitação afeta a aplicação, transporte e vida útil de produtos terapêuticos baseados em fagos (JOŃCZYK et al., 2011; LY-CHATAIN, 2014).

Dessa forma, considerando o surgimento de bactérias patogênicas resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos, a baixa produção de novos medicamentos capazes de controlar a proliferação destas, o uso exacerbado dos antimicrobianos nos últimos anos e a necessidade de tratamento de infecções na saúde humana, animal e ambiental, a terapia fágica ressurge como uma alternativa biotecnológica promissora e complementar aos antimicrobianos sintéticos (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004; SPELLBERG et al., 2004)

Diante do exposto, o presente estudo abordou o isolamento e caracterização morfológica e do perfil lítico de bacteriófagos a partir de cultivo bacteriológico de *Pseudomonas aeruginosa* oriundos de amostras bacteriológicas de feridas crônicas humanas, bem como sua tolerância frente à variação de temperatura e potencial hidrogeniônico, com o objetivo de fundamentar o controle bacteriano mediado por tais fagos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FERIDAS CRÔNICAS

Feridas crônicas são lesões cutâneas que não cicatrizam em um período de até três meses. Elas apresentam desafios significativos para profissionais de saúde, indivíduos afetados e seus familiares, devido aos impactos mecânicos, ocupacionais, psicológicos e sociais que causam. Compreender a natureza e os fatores subjacentes ao desenvolvimento e tratamento dessas feridas é fundamental para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir as complicações associadas (NEWBERN, 2018).

Estudos epidemiológicos têm levantado alertas em relação a essa questão de saúde. O aumento do número de pessoas com obesidade e a crescente população idosa contribuem para o aumento das comorbidades e, por conseguinte, para o aumento das feridas crônicas (KIM et al., 2019). Globalmente, estima-se que cerca de 5% da população nos países ocidentais conviva com feridas crônicas (OLIVEIRA et al., 2019). Apenas nos Estados Unidos, estimativas sugerem que cerca de 2,5% da população total seja afetada por essas feridas, e as projeções indicam gastos de aproximadamente 18,7 bilhões de dólares para o tratamento delas até 2027 (ALJGHAMI; SABOOR; AMINI-NIK, 2019).

Há evidências de que de 1 a 2% da população dos países desenvolvidos venha a desenvolver algum tipo de ferida crônica (KIM et al., 2019). Embora haja escassez de estudos epidemiológicos no Brasil, a situação no país pode ser considerada preocupante. Feridas crônicas estão frequentemente associadas à diabetes e de acordo com os dados disponíveis no IDF Diabetes Atlas (10ª edição, 2021), a população brasileira com diabetes alcançou a marca de 16,8 milhões de indivíduos no ano de 2021.

Feridas crônicas impactam diretamente a saúde pública e seus recursos financeiros, uma vez que exigem materiais de alto custo, tratamentos especializados e contínuos, além de levar à aposentadoria por invalidez precoce. Com base nessas estimativas, torna-se evidente que as feridas crônicas não são apenas uma comorbidade adicional, mas sim uma epidemia silenciosa (SEN et al., 2009).

A falta de cicatrização das feridas é atribuída a fatores intrínsecos e extrínsecos. Pacientes com feridas que não cicatrizam frequentemente apresentam desequilíbrios metabólicos decorrentes de condições como *diabetes mellitus*, doenças arteriais e venosas,

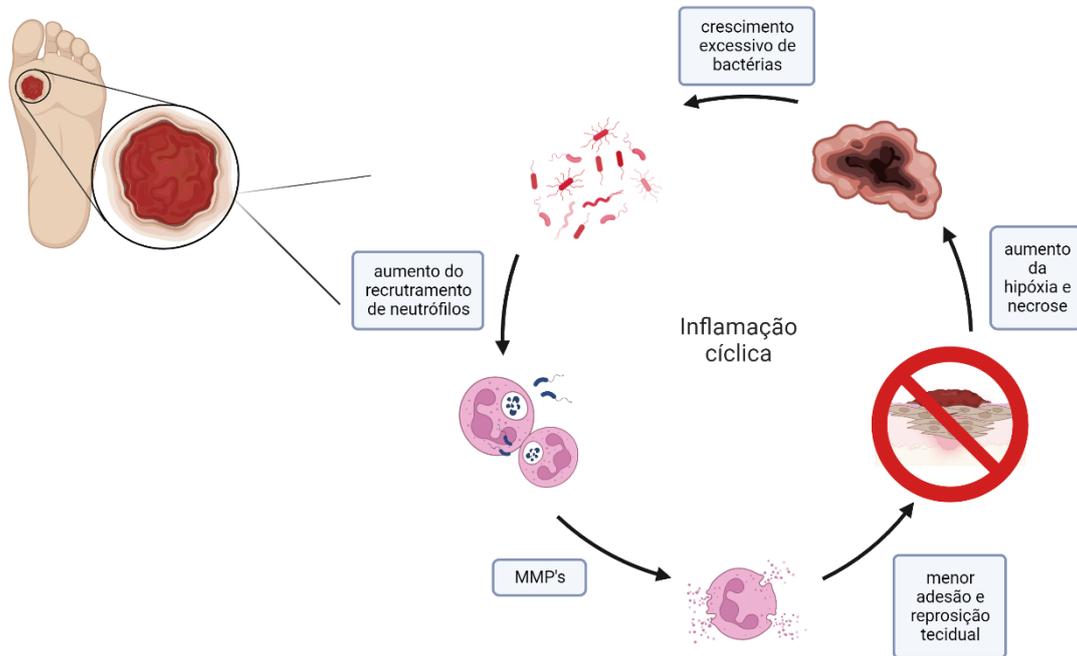
bem como pressão contínua nos vasos e tecidos devido à debilidade ou ausência de movimento, o que pode ocorrer em doenças como esclerose múltipla e paralisias diversas (WERDIN et al., 2009).

Nas feridas agudas, a inflamação e recrutamento de neutrófilos, células do sistema imune inato responsáveis pelo reconhecimento de agentes infecciosos e resposta pró-inflamatória aguda, ocorre como um meio de preparo para a cicatrização. Já nas feridas crônicas, a alta quantidade de neutrófilos leva a produção exacerbada de proteinases metálicas de matriz degradativa, conhecidas como metalproteinases (MMPs). Ademais, um perfil inflamatório desequilibrado de citocinas é observado. Essas mudanças culminam em uma maior degradação da matriz extracelular do que sua reposição realizada pelos fibroblastos. Tais fibroblastos, por sua vez, têm uma resposta reduzida aos estímulos de adesão e crescimento, gerando mais inflamação, recrutando mais neutrófilos e resultando em um processo inflamatório cíclico (MENKE et al., 2007; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013).

Dentre as possíveis razões para o aumento de recrutamento dos neutrófilos encontra-se o crescimento excessivo de bactérias. Com a ruptura da pele, há uma maior susceptibilidade à ocorrência de infecções, uma vez que a entrada de microrganismos é facilitada. Desde que os mecanismos de resistência do indivíduo não estejam comprometidos, o sistema imunológico pode eliminar essas bactérias, possibilitando que a fase inflamatória, proliferativa e de maturação referentes à cicatrização, sejam concluídas sem grandes dificuldades (MENKE et al., 2007; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013; ZHAO et al., 2016).

Contudo, em pacientes com feridas crônicas, a exposição do tecido, a desvitalização devido a isquemia, hipóxia e necrose, além de um sistema imunológico debilitado e a negligência em termos de higiene nos cuidados, criam o ambiente ideal para a colonização bacteriana e crescimento microbiano. Resultando assim em infecções locais, profundas e até sistêmicas, culminando em casos extremos em amputações e, em último caso, morte (ROBSON, 1997; NEWBERN, 2018). Os processos influentes na inflamação cíclica, podem ser observados na Figura 1.

Figura 1 – Processo da inflamação cíclica correlacionado ao crescimento excessivo de bactérias.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

2.2 BACTÉRIAS E FATORES DE INFLUÊNCIA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A pele é um órgão cuja microbiota normal compreende principalmente bactérias que desempenham um papel crucial na modulação da resposta imunológica inata, atuando na inibição e redução da colonização por outros microrganismos potencialmente prejudiciais (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). A microbiota epitelial apresenta um padrão mosaico, estreitamente interligado com fatores ambientais como glândulas sebáceas, níveis de umidade e temperatura (GRICE; SEGRE, 2011). As bactérias residentes na pele podem ser comensais, não patogênicas e pertencem majoritariamente aos filos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (COGEN; NIZET; GALLO, 2008). A bactéria *Staphylococcus epidermidis* é um exemplo de bactéria comensal essencial para a proteção da pele, servindo como barreira contra a entrada de bactérias patogênicas através de receptores do tipo *toll-like*

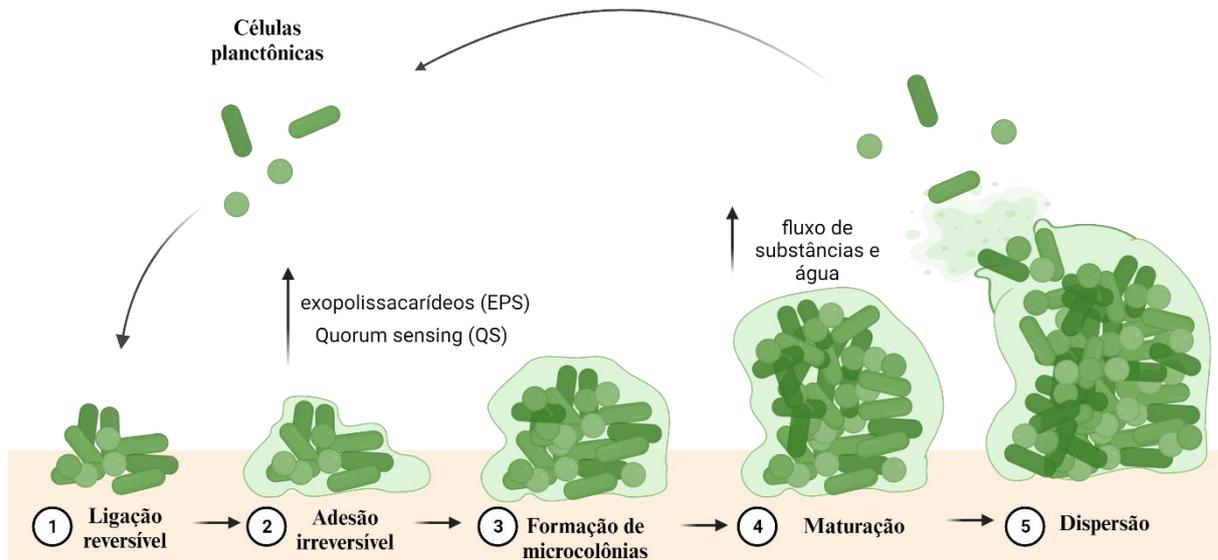
(TLR) (CANCHY et al., 2023; MÉRIC et al., 2018). Entretanto, bactérias comensais podem se tornar oportunistas e em determinadas condições, seu crescimento exacerbado leva à patogenicidade. A patogenicidade bacteriana é inerente à capacidade da pele em resistir às infecções e não somente aos fatores biológicos característicos dos microrganismos (COGEN; NIZET; GALLO, 2008; MÉRIC et al., 2018).

As fontes de infecção podem derivar do ambiente, dos microrganismos comensais presentes na pele adjacente à ferida e de microrganismos endógenos originados de outras membranas mucosas do corpo. Os gêneros de bactérias colonizadoras de feridas potencialmente patogênicas incluem *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* e *Proteus*. Essas bactérias apresentam a habilidade de gerar exotoxinas e endotoxinas, bem como enzimas antifagocíticas, resultando na deterioração superficial de feridas, prejudicando tanto a proliferação como a migração celular, além de afetar adversamente a formação de novos vasos sanguíneos (DAVIES et al., 2001; KINGSLEY, 2003; SCHULTZ et al., 2003).

Dentre suas características de virulência, destacam-se a produção de toxinas esfoliativas, citotoxinas e endotoxinas, bem como exotoxinas, biofilmes e resistência antimicrobiana (DISSEMOND, 2007). A produção dessas toxinas desempenha um papel crucial na evasão do sistema imunológico, enquanto a ação das proteases está diretamente vinculada à necrose tecidual e impactos negativos na cicatrização (FOSTER, 2005; RUDKIN et al., 2017). A morte celular e a necrose dos tecidos podem ser instigadas por condições de hipóxia e anoxia, criando um ambiente anaeróbico propício às necessidades metabólicas de gêneros como *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* e *Porphyromonas*, facilitando sua colonização (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001).

A produção de biofilmes é uma característica frequentemente observada em feridas crônicas, tornando-se um dos principais obstáculos para o processo de cicatrização, visto que os antimicrobianos e antissépticos tópicos comumente utilizados possuem baixa difusão e permeabilidade em biofilmes (CLINTON; CARTER, 2015). De maneira geral, a formação de biofilmes resulta da agregação bacteriana e da secreção de exopolissacarídeos (EPS), que constituem uma matriz que sustenta a fixação dos microrganismos. Por consequência, esse ambiente se torna propício para uma maior eficiência metabólica, oferecendo proteção contra alguns fatores estressantes, como antimicrobianos e fagocitose, e consequentemente perturbando as respostas imunológicas (PERCIVAL et al., 2012). Na Figura 2 está esquematizado o processo e etapas na formação de biofilmes bacterianos.

Figura 2 – Etapas da formação de biofilme.



Na etapa inicial de ligação reversível (1), células livres se conectam à superfície, formando uma camada única de matriz. A regulação em ambientes não bióticos depende de interações físico-químicas, enquanto em superfícies bióticas, envolve interações específicas entre receptores e ligantes (DUNNE, 2002; GUZMÁN-SOTO et al., 2021). O aumento na densidade bacteriana leva à produção de moléculas auto indutoras que regulam a formação da matriz, estimulando a ativação de genes específicos relacionados a EPS, motilidade e outros fatores de virulência. A expressão de genes específicos relacionados ao aumento da densidade bacteriana é conhecida como "Quorum Sensing" (QS), uma característica fundamental em bactérias patogênicas (RUTHERFORD; BASSLER, 2012; VASUDEVAN, 2014). Na etapa de adesão secundária e irreversível (2), a produção de EPS se torna proeminente, permitindo que as células se agreguem firmemente à superfície, e a outras células da mesma espécie ou de outras espécies na formação de micro colônias (3). Essa agregação possibilita a maturação do biofilme (4), formando estruturas tridimensionais com canais intersticiais, facilitando o fluxo de nutrientes e água, bem como a remoção de resíduos metabólicos. O último estágio é a dispersão (5), no qual as células maduras se separam para formar novos biofilmes (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021; SAUER et al., 2022).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para além da presença bacteriana e sua virulência, fatores quantitativos também desempenham um papel na cicatrização. Esse impacto se torna notável quando a concentração bacteriana ultrapassa 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de tecido, ou quando há a detecção de *Streptococcus* β -hemolíticos, indicando a necessidade do emprego de agentes antimicrobianos (RICHARD, 2011).

Quando a utilização de antimicrobianos sistêmicos e tópicos se torna necessária, considera-se importante analisar que estes podem remover microrganismos comensais de suma importância, agentes ativos na promoção de controle da colonização por outros organismos potencialmente patogênicos. Além disso, embora o uso tópico tenha demonstrado eficácia no tratamento de feridas, o uso inadequado e prolongado tanto de antimicrobianos tópicos quanto sistêmicos pode levar ao desenvolvimento predominante de estirpes bacterianas resistentes (COGEN; NIZET; GALLO, 2008).

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A colonização bacteriana de feridas crônicas é composta principalmente por *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Anaerococcus* spp., (VERBANIC; DEACON; CHEN, 2022). Uma análise abrangente de 27 estudos, conduzida por Garcia et al. em 2021, focalizando a predominância de estirpes bacterianas em úlceras de pernas, destaca que o microrganismo gram-negativo mais prevalente, presente em aproximadamente 70% das infecções nesse contexto é *P. aeruginosa* (GARCIA et al., 2021). Essa bactéria se encontra dentro de um grupo conhecido pelo acrônimo ESKAPE, que compreende outros cinco patógenos, incluindo *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, e espécies de *Enterobacter*. São microrganismos altamente virulentos e caracterizados por sua resistência a múltiplos antibióticos comumente utilizados (DE OLIVEIRA et al., 2020). A resistência e multirresistência à antibióticos tem acendido preocupações em escala global, dada a significativa taxa de mortalidade associada, sendo responsável por 5 milhões de mortes em 2019, com projeções indicativas de que cerca de 10 milhões de indivíduos irão à óbito anualmente até o ano de 2050 em decorrência da crescente multirresistência aos antibióticos (BASSETTI et al., 2017; MURRAY et al., 2022).

P. aeruginosa pertence ao reino Monera, filo Proteobacteria, classe subdivisão gama, ordem *Pseudomonadaceae*, gênero *Pseudomonas*. É um microrganismo que pode ser encontrado nos mais variados ambientes naturais, tais como solo e água. Sua presença é comum em locais frequentados por seres humanos e animais, sendo capaz de causar infecções e enfermidades em plantas, nematoides, insetos e mamíferos. Algumas das características biológicas que contribuem para a notável adaptação e ubiquidade de *P. aeruginosa* frente às

diversas condições, incluem sua classificação como um patógeno gram-negativo, sua nutrição ancorada em fontes orgânicas (heterotrofismo) e sua natureza oportunista, capaz de causar infecções em circunstâncias metabólicas favoráveis. Destacam-se também a capacidade de sobreviver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (aerobiose facultativa) e a habilidade de prosperar em uma ampla faixa de temperaturas, variando de 4°C a 42°C (DIGGLE; WHITELEY, 2020). Adicionalmente, essa bactéria apresenta diversos reguladores transcricionais e genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos (FRESCHI et al., 2019).

Esse microrganismo é um patógeno de significativa relevância clínica. Ele é capaz de causar infecções nos mais variados locais do corpo, entre outras, destacam-se pneumonia em pacientes com fibrose cística, infecções no trato urinário devido ao uso de catéteres, bacteremia, infecções pós-operatórias, otites, infecções oculares, cutâneas e sepse (DIGGLE; WHITELEY, 2020). Além disso, a presença de flagelos e pili tipo IV em *P. aeruginosa* confere a capacidade de movimentação em superfícies sólidas ou semissólidas, o que pode resultar na disseminação cruzada de contaminação em superfícies e instrumentos, tornando-se especialmente relevante em ambientes clínicos (CONRAD et al., 2011; FRESCHI et al., 2019; KAZMIERCZAK; SCHNIEDERBEREND; JAIN, 2015).

P. aeruginosa demonstra uma notável capacidade de sintetizar uma diversidade de exoprodutos e metabólitos secundários. Entre esses, enzimas que inativam antimicrobianos, toxinas, proteases, exotoxina A e cianeto de hidrogênio. Adicionalmente, secreta dois sideróforos, pioverdina e piocianina, que desempenham um papel crucial na captação de ferro em ambientes com disponibilidade limitada deste elemento. A relevância desses metabólitos secundários é notável na adaptação de *P. aeruginosa* frente a diversidade ambiental. Ramnolipídios são capazes de suprimir as funções dos neutrófilos polimorfonucleares, fenômeno que está estreitamente atrelado ao aumento da extensão da ferida, exercendo impactos negativos sobre o processo de cicatrização (JENSEN et al., 2007). Muitos destes metabólitos estão intimamente relacionados à formação de biofilmes, um fenômeno chave na evasão do sistema imunológico e resistência antimicrobiana, impactando negativamente o processo de cicatrização em feridas crônicas (DIGGLE; WHITELEY, 2020; JAMES et al., 2008).

2.2.2 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um dos maiores desafios enfrentados pela comunidade médica e científica no século XXI. Trata-se de um fenômeno em que microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, desenvolvem a capacidade de resistir aos efeitos dos medicamentos antimicrobianos, como antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários. A consequência imediata é a redução da eficácia das terapias, com aumento substancial da morbidade, mortalidade relacionada a infecções e encargos financeiros na área de saúde (COQUE et al., 2023).

No contexto específico da resistência antimicrobiana observada em bactérias, sua manifestação pode ser resultante de processos fenotípicos intrínsecos, bem como da incorporação de genes de resistência por meio de elementos móveis, tais como transposons e plasmídeos, ou ainda por eventos mutacionais. Esses mecanismos abrangem uma diversidade de estratégias adaptativas e podem incluir desde modificações lipídicas na composição da parede celular até a degradação e expulsão ativa do composto antimicrobiano por meio de sistemas de efluxo, ou ainda modificações que impactam o receptor alvo do agente antimicrobiano (BASSETTI et al., 2017; C REYGAERT, 2018).

A bactéria *P. aeruginosa* é altamente resistente a diversos tipos de antibióticos, como aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos. Sua resistência pode ser categorizada em resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca envolve a baixa permeabilidade da membrana externa, a ação de bombas de efluxo que eliminam os antibióticos e a produção de enzimas que inativam essas substâncias. A resistência adquirida ocorre quando há transferência de genes de resistência ou mutações. Já a resistência adaptativa se manifesta na formação de biofilme, que atua como barreira para impedir a ação dos antibióticos, resultando na replicação de células persistentes, resistentes a múltiplas drogas, responsáveis por infecções prolongadas e recorrentes (PANG et al., 2019).

Bactérias produtoras de β -lactamases de amplo espectro e de espectro estendido (ESBL) possuem capacidade de degradar penicilinas como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração e suas derivadas. Dentre essas bactérias estão as *Escherichia coli*, espécie de suma importância na transferência horizontal de genes de resistência para outras espécies como *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp., (DESHPANDE, 2000; SHAIKH et al., 2015).

Além da produção de β -lactamases, *P. aeruginosa* possui um sistema de efluxo multidrogas com doze bombas de efluxo, sendo quatro delas (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) contribuintes para a resistência aos antimicrobianos. Também possui uma membrana externa altamente impermeável e produção de enzimas inativadoras de antibióticos (PANG et al., 2019).

De forma geral, *P. aeruginosa* pode ser resistente a classes de cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, clorofenicol, quilonas e fluoroquilonas e inibidores de β -lactâmicos (ZUBAIR; AHMAD, 2019). Esses fatores biológicos anteriormente destacados, atrelados às mutações sequenciais, transferência horizontal de genes por plasmídeos e recombinações gênicas por integrinas, propiciam o surgimento de cepas resistentes a todas as classes de antimicrobianos confiáveis (COQUE et al., 2023; LIVERMORE, 2002; MILLER; MUNITA; ARIAS, 2014).

2.3 COEXISTÊNCIA ENTRE BACTÉRIAS E BACTERÍOFAGOS E IMPLICAÇÃO TERAPÊUTICA

2.3.1 Definições e características gerais

Como característica essencial, os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, já que não possuem aparato ribossômico para produção de proteínas e todas as enzimas necessárias para replicação de seu material genético. Evolutivamente, por não possuírem metabolismo autônomo, adaptaram-se aos mais diversos tipos celulares e formas de vida (BONACHELA; LEVIN, 2014).

Os bacteriófagos, também denominados de fagos, apresentam especificidade às células procarióticas. Eles foram descobertos independentemente por Frederick Twort, na Inglaterra, em 1915, e por Félix d'Hérelle, na França, em 1917. Os vírus, com destaque para os bacteriófagos, representam as entidades mais abundantes em termos quantitativos no cenário terrestre, exercendo uma ampla gama de funções no ecossistema, especialmente em relação aos seus hospedeiros (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020). Estimativas sugerem que a cada dois dias os bacteriófagos sejam responsáveis por dizimar cerca da metade da

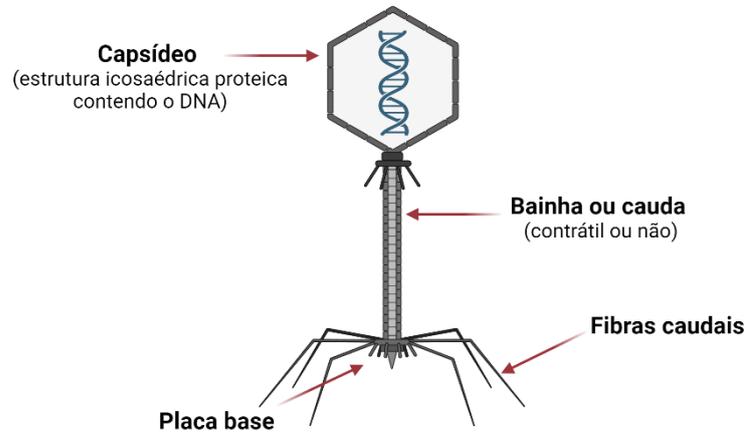
população bacteriana em todo o planeta (PAL et al., 2007). Em seu papel de controlar populações bacterianas, esses agentes podem induzir a lise bacteriana, moldar a evolução dos sistemas imunológicos bacterianos por meio da infecção, facilitar a transferência horizontal de genes e impactar o metabolismo hospedeiro através do transporte de genes metabólicos auxiliares (PUXTY; MILLARD, 2023).

Devido suas características biológicas únicas no que tange à interação e ciclo de vida com procariontes, os fagos emergem como ferramentas terapêuticas e biotecnológicas, especialmente no âmbito da saúde humana, animal e ambiental. A exploração dessas entidades assume um papel fundamental na resposta à crescente crise global de resistência antimicrobiana, que atualmente desafia a eficácia dos antibióticos (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004; HASAN; AHN, 2022; KUTTER et al., 2010; SPELLBERG et al., 2004).

2.3.2 Biologia dos bacteriófagos

Os bacteriófagos possuem uma estrutura tridimensional bem definida com diferentes formas de estrutura de capsídeo, mais simples como icosaédrica, helicoidal ou até mesmo complexa, variando conforme sua classificação específica. A maioria dos fagos analisados até o momento pertence à classe dos *Caudoviricetes*, anteriormente agrupados na ordem *Caudovirales*. Esse grupo com frequência apresenta uma característica distintiva: uma bainha contrátil ou não em espiral, que circunda um tubo central, frequentemente acompanhada por seis fibras caudais que se estendem a partir de uma placa base. Esta última possui proteínas de ligação ao receptor, que desempenham um papel crucial no reconhecimento de moléculas específicas na superfície da membrana bacteriana. No entanto, existe uma diversidade de estruturas adotadas pelos fagos. Além dos mencionados, podem adotar formas cúbicas, filamentosas ou poliédricas de pleomorfismo variado. Adicionalmente, certos bacteriófagos incorporam envelopes lipídicos ou lipoproteicos, ampliando ainda mais a diversidade de suas morfologias (ACKERMANN, 2009; ROSSMANN et al., 2005). Na Figura 3 é possível visualizar o modelo esquemático prototípico de um fago pertencente à antiga ordem dos *Caudovirales*.

Figura 3 – Modelo esquemático representativo de uma partícula de fago pertencente à antiga ordem dos *Caudovirales*.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

De modo geral, os fagos podem ser classificados em quatro categorias principais, tendo por base o tipo de material genético que portam: fagos de DNA de fita simples (ssDNA), fagos de DNA de fita dupla (dsDNA), fagos de RNA de fita simples (ssRNA) e fagos de RNA de fita dupla (dsRNA) (ACKERMANN, 2009a; HANLON, 2007; HARADA et al., 2018). A conexão entre a morfologia e essas quatro categorias primárias, delineada conforme o tipo de ácido nucleico, é apresentada de maneira ilustrativa na Tabela 1 e na Figura 4.

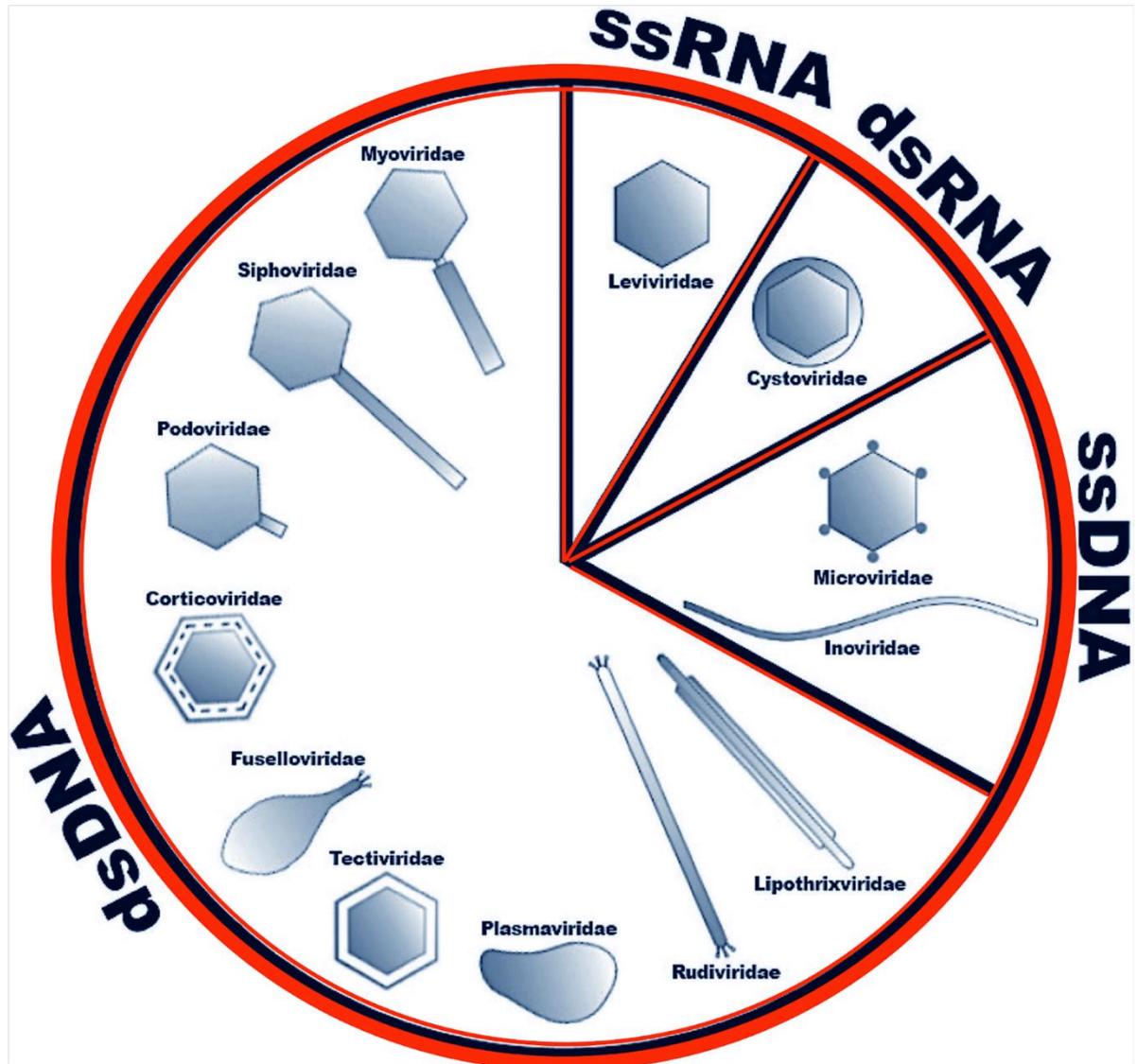
Tabela 1 - Principais tipos de bacteriófagos, características morfológicas e genômicas.

Formato	Ácido Nucleico	Família	Características	Tamanho do capsídeo, nm	Comprimento da cauda, nm
Com cauda	dsDNA (L)	<i>Myoviridae</i>	cauda contrátil	53-160 (85)	80-485 (167)
		<i>Siphoviridae</i>	cauda longa e não contrátil	40-97 (55)	79-539 (191)
		<i>Podoviridae</i>	cauda curta	38-75 (58)	3-40 (19)
Filamentoso	ssDNA (C)	<i>Inoviridae</i>	filamentos longos, hastes curtas	760–1950 × 7 (<i>Inovirus</i>) 85–250 × 7 (<i>Plectrovirus</i>)	
	dsDNA (L)	<i>Lipothrixviridae</i>	envelope, lipídios	410–2200 × 24–38	

	dsDNA (L)	<i>Rudiviridae</i>	hastes rígidas, tipo TMV	610–900 × 23	
Poliédrico	ssDNA (C)	<i>Microviridae</i>	capsômeros conspícuos	27	
	dsDNA (C, S)	<i>Corticoviridae</i>	capsídeo complexo, lipídios	60	
	dsDNA (L)	<i>Tectiviridae</i>	capsídeo duplo, lipídios, pseudo cauda	63	
	dsDNA (L)	SH1*	capsídeo duplo, lipídios	70	
	dsDNA (C)	STIV*	saliências em forma de torre	74	
	ssRNA (L)	<i>Leviviridae</i>	semelhante ao poliovírus	23	
	dsRNA (L, M)	<i>Cystoviridae</i>	envelope, lipídios	75–80	
Pleomórfico	dsDNA (C, S)	<i>Plasmaviridae</i>	envelope, sem capsídeo, lipídios	80	
	dsDNA (C, S)	<i>Fuselloviridae</i>	formato de limão, envelope, lipídios	85 × 55	
	dsDNA (L, S)	—	formato de limão, envelope	74 × 44	
	dsDNA (C, S)	<i>Guttaviridae</i>	formato de gota	110–185 × 70–95	
	dsDNA (L)	<i>Ampullaviridae</i> *	formato de garrafa, nucleocapsídeo helicoidal	230 × 75	
	dsDNA (C)	<i>Bicaudaviridae</i> *	duas caudas, ciclo de desenvolvimento, nucleocapsídeo helicoidal	130–150 × 56–70	260–760 × 24
	dsDNA (L)	<i>Globuloviridae</i> *	envelope, esférico, lipídios, nucleocapsídeo helicoidal	100	

C, circular; L, linear; M, multipartido; S, superenrolado; —, sem nome; *, não classificado; SH1, vírus *Haloarcula hispanica*; STIV, Vírus icosaédrico com torreta *Sulfolobus*; TMV, Vírus do mosaico do tabaco nativo; comprimento x diâmetro; (média do tamanho). Fonte: Adaptado de Ackermann (1998), Ackermann (2009) e Harada et al., (2018).

Figura 4 - Classificação dos bacteriófagos de acordo com sua morfologia e material genético.



Fonte: Adaptado de Ackermann (2007), Hanlon (2007) e modificado de Harada et al., (2018).

Conforme entendimento acerca da variedade de bacteriófagos e da composição em mosaico de seus genomas são aprofundados, a necessidade de atualizar de forma constante sua taxonomia e classificação é amplamente reconhecida. Recentemente, houve uma abolição das famílias *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae* devido a avaliações independentes por análise genômica que constataram que essas famílias são polifiléticas. Ou seja, não representam de forma precisa uma história evolutiva compartilhada. No entanto, reconhece-se a importância de identificadores morfológicos como "miovírus", "podovírus" e "sifovírus". Assim, esses termos podem ser empregados para destacar características morfológicas distintas e preservar sua relevância histórica, ressaltando que eles não possuem uma conotação taxonômica formal. Adicionalmente, houve uma mudança na terminologia

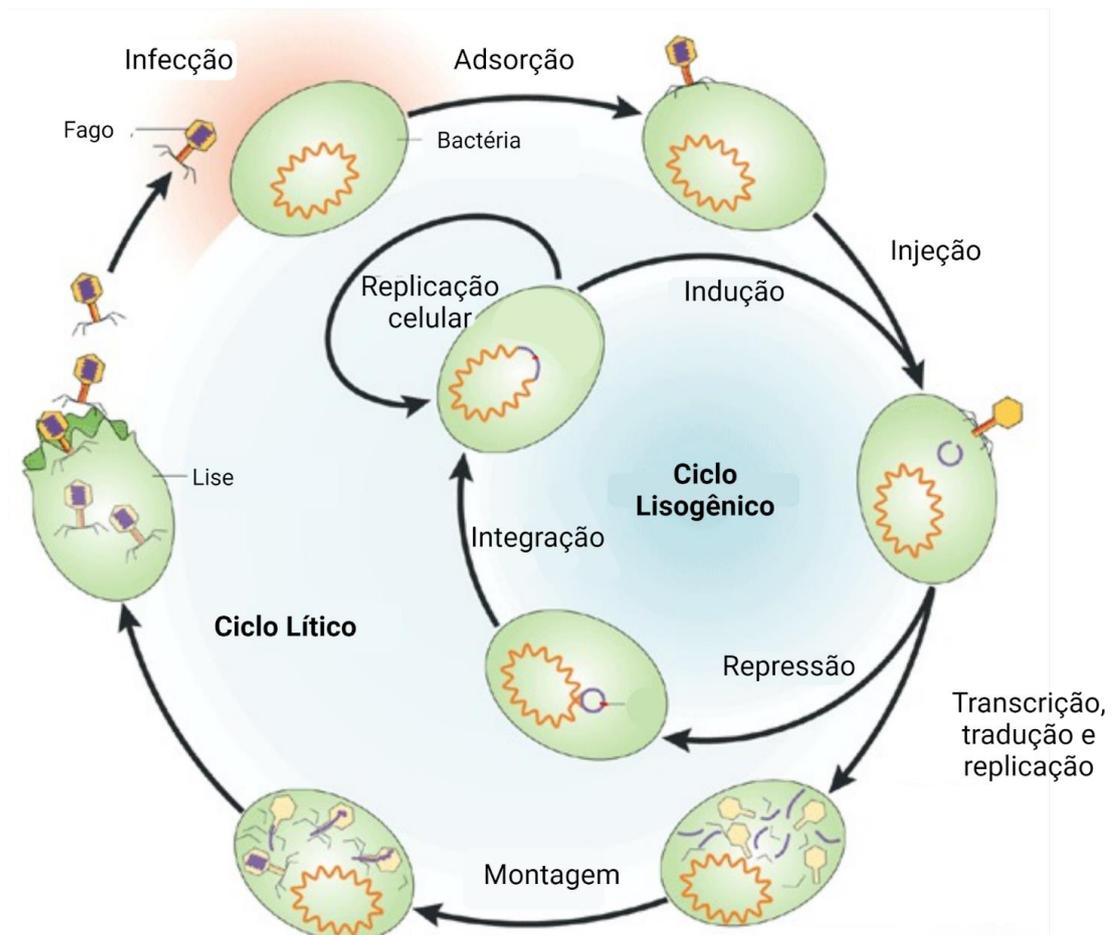
taxonômica. A ordem *Caudovirales* foi substituída pela classe *Caudoviricetes*. Essa reorganização foi realizada com o propósito de agrupar todos os vírus bacterianos e de arqueias que apresentam caudas, possuem capsídeos icosaédrico e possuem material genético de dupla fita de DNA (dsDNA) (TURNER et al., 2023).

No que diz respeito ao ciclo de vida, os bacteriófagos apresentam uma notável especificidade em relação às espécies hospedeiras, frequentemente infectando exclusivamente uma única espécie bacteriana ou mesmo cepas específicas dentro da mesma espécie. Ao encontrar um hospedeiro suscetível por meio do reconhecimento de receptores específicos, os bacteriófagos normalmente adotam uma de duas estratégias de replicação: lítica ou lisogênica (HARADA et al., 2018; HOBBS; ABEDON, 2016; KASMAN; PORTER, 2023).

No ciclo de replicação lítica, um bacteriófago, também conhecido como fago virulento ou lítico, interage com uma bactéria hospedeira suscetível e injeta seu material genético no citoplasma da célula hospedeira. Utilizando os ribossomos da bactéria hospedeira, o fago inicia a síntese de suas próprias proteínas, convertendo os recursos celulares em genomas virais e proteínas capsidiais. Esses elementos se montam para dar origem a múltiplas cópias do bacteriófago original. À medida que a vida da bactéria hospedeira chega ao fim, ocorre a lise celular, um processo facilitado pela ação das proteínas holinas e lisinas produzidas pelos fagos. Esse evento resulta na liberação dos novos fagos, que então partem para infectar outras células bacterianas (DABROWSKA et al., 2005; HARADA et al., 2018; KASMAN; PORTER, 2023).

No ciclo de replicação lisogênico, o bacteriófago também interage com uma bactéria hospedeira suscetível, inserindo seu material genético no citoplasma da célula. Entretanto, nesse cenário, o material genético do fago é integrado ao cromossomo bacteriano ou permanece como um elemento autônomo, denominado epissoma. O material genético é replicado e transmitido para as células descendentes, sem resultar na morte das bactérias hospedeiras. Os genomas dos fagos integrados são identificados como profagos, enquanto as bactérias que os alojam são denominadas lisogênicas. Em resposta às variações nas condições do ambiente, os profagos podem eventualmente retomar o ciclo de replicação lítica, culminando na lise da célula hospedeira (CAMPBELL, 2003; HARADA et al., 2018; HOBBS; ABEDON, 2016). A Figura 5 apresenta de maneira esquemática os principais processos correntes nos ciclos lítico e lisogênico.

Figura 5 - Ciclo lítico e lisogênico dos bacteriófagos.



O processo de infecção de um bacteriófago modelo inicia-se com o reconhecimento específico do hospedeiro, seguido pela adsorção. Nesse ponto, o material genético é injetado na célula hospedeira, enquanto a estrutura proteica externa do fago permanece vazia. A partir desse momento, o DNA assume uma conformação circular que pode seguir dois destinos: i) ser transcrito, replicado e traduzido para a montagem dos virions, resultando na subsequente lise celular, ou ii) sofrer repressão e se integrar ao genoma bacteriano (formando um profago), permitindo a replicação do material genético durante a replicação bacteriana. O profago pode responder a sinais que o levam a ativar os processos prévios à montagem, levando ao ciclo lítico e à liberação ativa da progênie de virions por meio de lise celular ou de forma passiva após a morte da célula hospedeira. Fonte: Modificado e traduzido de Campbell (2003).

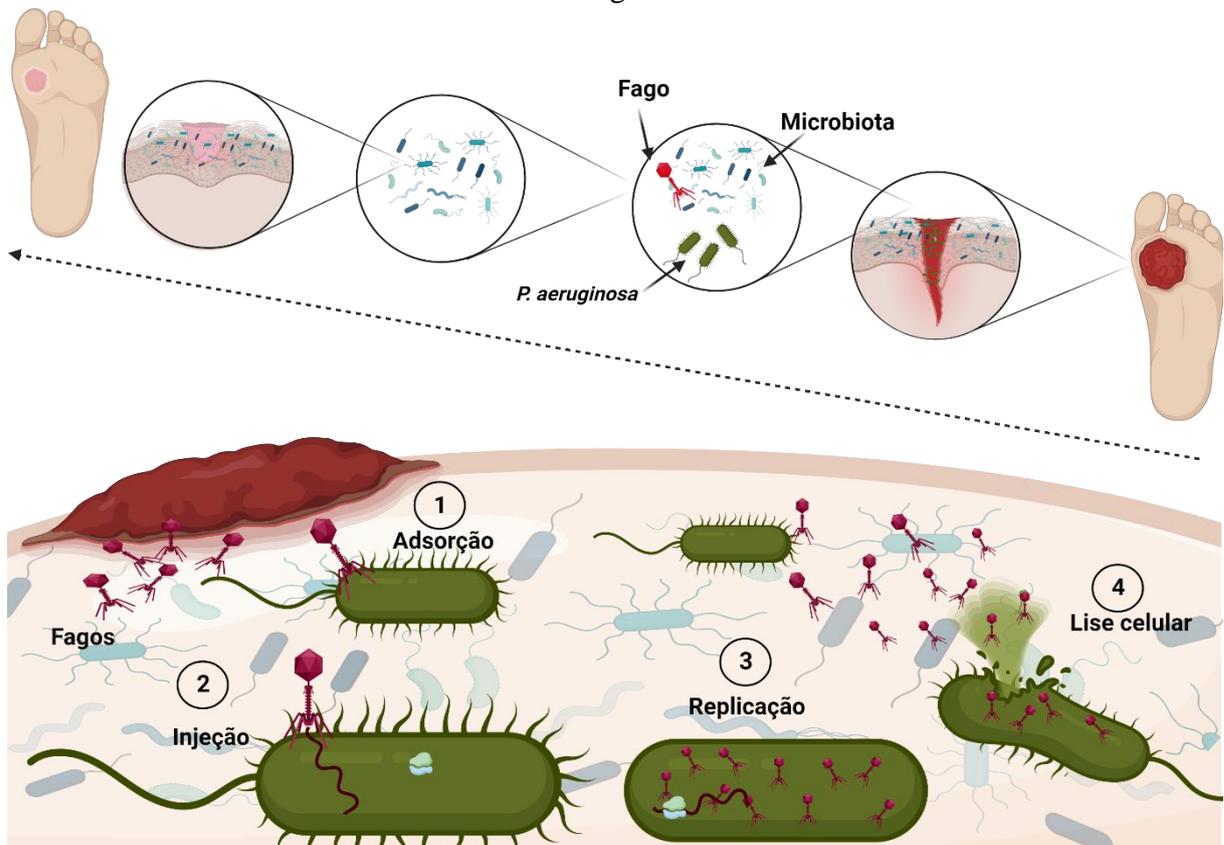
2.3.3 Uso biotecnológico e terapêutico dos bacteriófagos

Além da especificidade de vírus e hospedeiros devido a coevolução entre esses microrganismos, os bacteriófagos também apresentam a notável capacidade de atravessar biofilmes, por meio de despolimerases de polissacarídeos e exopolissacarídeos, que degradam os hidratos de carbono presentes nas macromoléculas localizadas nos polissacarídeos extracelulares e nos lipossacarídeos que envolvem a célula bacteriana, contribuindo para a

adesão, invasão e desintegração das bactérias hospedeiras pelo fago (ROACH; DONOVAN, 2015). Do mesmo modo, atravessam tecidos por meio de diversos mecanismos e interações. A transcitose pode ocorrer tanto por características inerentes aos tecidos, dos fagos e conjunções celulares (NGUYEN et al., 2017; YU et al., 2016), assim como a travessia pode utilizar mecanismos específicos das bactérias e das células, incluindo por exemplo: i) "Cavalo de Tróia", processo pelo qual uma bactéria infectada pelo fago entra nas células epiteliais ou é absorvida por elas, ii) "Exibição de fagos", que envolve a colocação de ligantes de localização nos capsídeos virais para regulamentar o reconhecimento celular mediado por receptor e iii) "Absorção livre" de partículas fágicas por células eucarióticas via endocitose (HUH et al., 2019; NGUYEN et al., 2017; PODLACHA et al., 2021). Assim, tecidos pouco vascularizados podem ser acessados pelos fagos, principalmente quando administrados *in situ* ou de maneira direcionada por diferentes veículos de aplicação (HUH et al., 2019; PODLACHA et al., 2021). Tecidos com baixa vascularização e biofilmes são frequentemente encontrados em pacientes com feridas crônicas. Concomitantemente, a capacidade de atravessar tecidos e barreiras dos fagos se mostra uma habilidade especialmente significativa, uma vez que a penetração eficaz é crucial para o sucesso de qualquer terapia, inclusive da terapia baseada em fagos (DAJBROWSKA; ABEDON, 2019; LIU et al., 2022).

Não obstante, a cinética dos fagos líticos estimula o aumento exponencial da carga viral por meio de sua própria replicação, tornando desnecessárias altas dosagens para alcançar resultados clínicos satisfatórios (DERESINSKI, 2009). Essas condições podem ser exploradas juntamente com o ciclo estritamente lítico dos bacteriófagos, sendo este o principal mecanismo de interesse terapêutico de biocontrole de bactérias patogênicas pelo qual os bacteriófagos operam (CHEN et al., 2022). O uso de proteínas bacteriolíticas, como lisinas e despolimerases também pode ser empregado, principalmente no que se refere ao controle de biofilmes (LIU et al., 2022). A Figura 6 ilustra o uso terapêutico de fagos líticos por meio de seu ciclo replicativo.

Figura 6 – Tratamento de infecção bacteriana em ferida utilizando a biologia dos bacteriófagos líticos.



Parte superior: Destaque da especificidade do fago em relação ao hospedeiro no tratamento de infecção em ferida sem afetar indiscriminadamente a microbiota cutânea. Parte inferior: Tratamento utilizando o ciclo lítico e suas quatro principais etapas; 1: Reconhecimento da bactéria patogênica alvo e adsorção; 2: Injeção do material genético; 3: Replicação dos fagos utilizando a maquinaria bacteriana, resultando em aumento exponencial da carga viral; 4: Lise celular e dispersão dos fagos. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O interesse no uso de fagos cujo ciclo de replicação é estritamente lítico também se deve ao fato de que fagos que adotam ciclos lisogênicos possuem a habilidade de servir como portadores naturais de genes de resistência a antibióticos (CHEN et al., 2022). Este processo é controlado por enzimas chamadas integrases, que têm a capacidade de incorporar o material genético viral do bacteriófago no genoma da bactéria hospedeira. Durante o ciclo de replicação do fago, ocorre também a duplicação do DNA bacteriano adjacente, o que permite que o material genético replicado em conjunto seja posteriormente transferido para uma célula receptora, por meio de transdução ou transferência horizontal de genes. Conseqüentemente, há possibilidade da disseminação de genes de resistência a antibióticos ou outros genes que promovem a virulência entre as bactérias, podendo comprometer a segurança e a eficácia das estratégias de biocontrole bacteriano (QI et al., 2023).

No entanto, o ciclo lisogênico também pode ser explorado para fins biotecnológicos, considerando a integração do material genético no cromossomo bacteriano. Os genomas dos fagos contêm sequências codificadoras de proteínas que se mostraram altamente valiosas em aplicações biotecnológicas (HARADA et al., 2018). Uma abordagem notável é o uso de partículas de bacteriófagos em estratégias preventivas de vacinação (GONZÁLEZ-MORA et al., 2020). Adicionalmente, os fagos estão sendo empregados como biossensores para detecção de bactérias (HUSSAIN et al., 2021), como vetores para a entrega de medicamentos (JU; SUN, 2017), na regulação de biofilmes (LIU et al., 2022), na desinfecção de superfícies (JARONI et al., 2023), em biocontrole de patógenos humanos (NALE; CLOKIE, 2021) e animais (BREYNE et al., 2017).

Vários estudos recentes e ensaios experimentais realizados tanto em condições *ex vivo* como *in vivo* e *in vitro* têm proporcionado evidências sólidas do sucesso da terapia fágica na penetração de biofilmes bacterianos e no controle de infecções em feridas, tanto em modelos animais como em seres humanos, principalmente quando em isolados bacterianos resistentes a tratamentos convencionais como *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Proteus* spp. e *Streptococcus* spp., (BROWN et al., 2017; HAMED; AWNI; ABDULAMIR, 2023; KUTTER et al., 2010; MENDES et al., 2013; MILHO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

Assim como ocorre com a aplicação de medicamentos, a tarefa de guiar os fagos até o local da infecção ainda se apresenta como um desafio para alcançar uma terapia eficaz. A estabilidade dos fagos é um desafio, pois eles requerem refrigeração para armazenamento e a longo prazo, sua dinâmica de interação pode ser alterada com variações de potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura. Essas limitações afetam a aplicação, transporte e vida útil de produtos terapêuticos baseados em fagos (JOŃCZYK et al., 2011; LY-CHATAIN, 2014).

No contexto de sistemas de entrega de fagos, existem várias abordagens disponíveis. Concernente às feridas, as formulações tópicas, como sprays, pomadas, cremes, loções, e em destaque, hidrogéis, têm se mostrado eficazes para promover a cicatrização. Essas soluções tópicas apresentam vantagens significativas, tanto na aplicação quanto na remoção. Destacando-se por baixa toxicidade e minimização de efeitos adversos (BROWN et al., 2018; EL-SHIBINY; EL-SAHHAR, 2017; HARADA et al., 2018). A aplicação de fagos por meio dessas formulações oferece uma série de benefícios. A aplicabilidade direta nas áreas afetadas proporciona uma distribuição mais direcionada e concentrada do tratamento. Além disso, a fácil administração e a praticidade na remoção contribuem para uma abordagem terapêutica mais gerenciável e conveniente para pacientes e profissionais de saúde. A utilização de fagos

e suas formulações tópicas como parte do arsenal terapêutico para feridas crônicas representa uma abordagem promissora, aproveitando as características específicas desses agentes virais para combater infecções resistentes e melhorar o processo de cicatrização (CHANG et al., 2020; QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018).

Nesse sentido, o interesse em usar fagos líticos como ferramentas terapêuticas no biocontrole de bactérias resistentes e multirresistentes no tratamento de feridas, está em evidenciando, sendo impulsionado por (i) especificidade do fago em relação ao hospedeiro bacteriano, (ii) a habilidade de penetrar e atravessar tecidos e barreiras, (iii) os desafios enfrentados acerca da resistência antimicrobiana, (iv) a possibilidade de utilização dos bacteriófagos e seus compostos como ferramentas biotecnológicas aplicadas no tratamento de feridas crônicas e de biofilmes (SPELLBERG et al., 2004; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

3 HIPÓTESE

Cultivos bacteriológicos oriundos de feridas crônicas humanas contém bacteriófagos capazes de infectar e controlar *in vitro* *P. aeruginosa*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Bioprospectar bacteriófagos de cultivos bacteriológicos oriundos de feridas crônicas, capazes de infectar e controlar *in vitro* *P. aeruginosa*, avaliando também sua tolerância a variações de pH e temperatura.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bacteriófagos a partir de cultivos bacteriológicos de feridas crônicas superficiais e profundas.
- Identificar morfológicamente os bacteriófagos isolados.
- Determinar a capacidade lítica dos bacteriófagos isolados frente a *P. aeruginosa*.
- Avaliar a tolerância dos bacteriófagos isolados frente às variações de pH e de temperatura.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Para realizar a bioprospecção dos bacteriófagos, foram utilizadas cinco (5) amostras do caldo de cultivo bacteriológico originários de feridas crônicas de pacientes humanos, vindos de tecido ósseo, tendões e pele. Os caldos do cultivo bacteriológico foram adquiridos de maneira descaracterizada, gentilmente disponibilizados pelo grupo de trabalho liderado pela Dra. Mara Cristina Scheffer, da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Conforme caracterizado pela Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC), essas amostras bacteriológicas foram positivadas para *P. aeruginosa*, *Streptococcus* spp, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* e *S.aureus* resistente à metilina (MRSA).

5.2 CULTURA, ISOLAMENTO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS BACTERIÓFAGOS

Para isolamento dos bacteriófagos foi utilizada a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°27853) como cepa de referência, adquirida pelo Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) proveniente do banco *American Type Culture Collection* (ATCC) e também *Pseudomonas aeruginosa* clínica, isolada e cedida pelo Laboratório de Apoio Técnico do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia da UFSC.

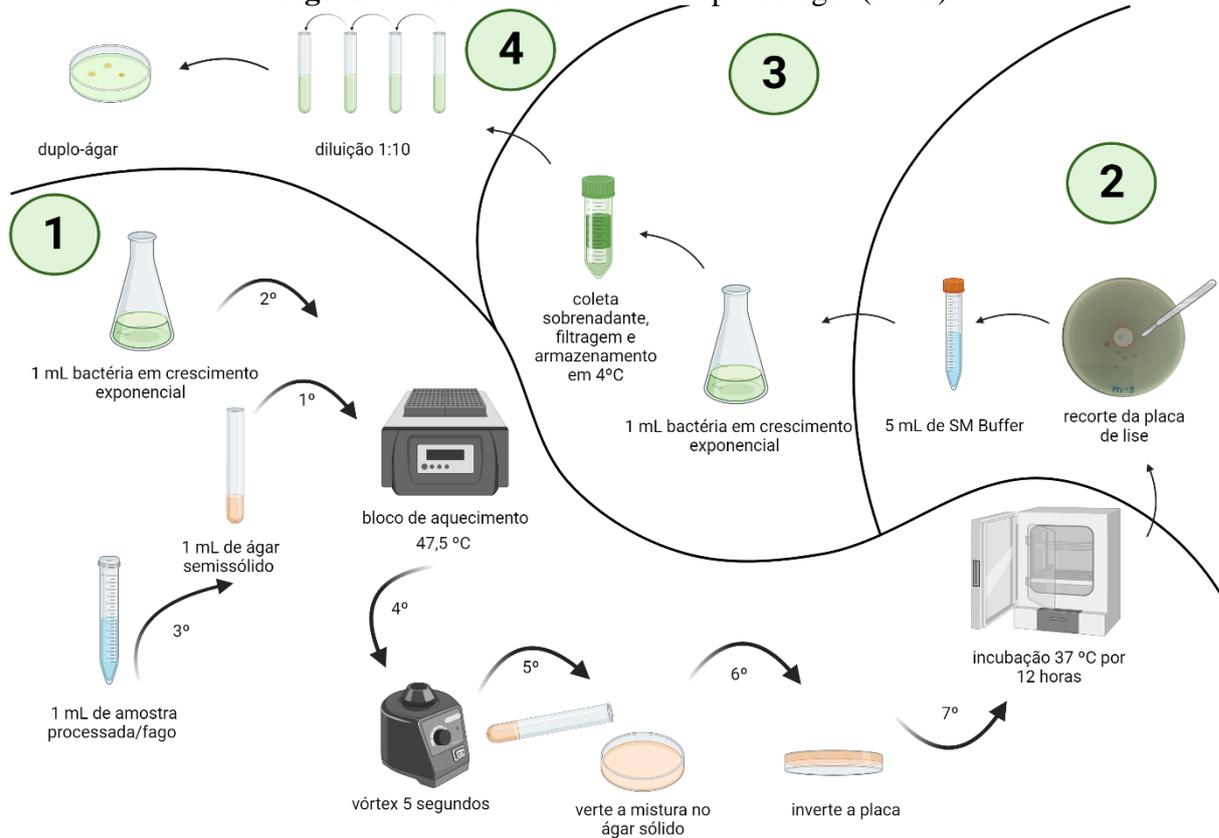
As bactérias foram cultivadas e propagadas em 25 mL de caldo Luria Bertani (LB) incubadas em estufa a 37 °C, por 12 horas (h), até atingir densidade ótica (DO) 0,4~0,9 a 600 nm.

As técnicas de isolamento e caracterização de bacteriófagos foram executadas de acordo com Adams (1959), Kropinski et al., (2009) e Pelzek et al., (2013). Resumidamente, as amostras dos cultivos bacteriológicos foram utilizadas para o isolamento de fagos pela técnica de camada dupla de ágar (DAL). Para induzir a infecção bacteriana através de bacteriófagos presentes nas amostras bacteriológicas, o seguinte procedimento foi executado: uma placa de

Petri foi utilizada, na qual foram adicionados 10 mL de meio LB sólido (ágar de base), 1 mL de meio LB semissólido (0,7%) aquecido em 44,6 °C, 1 mL da cultura bacteriana (DO 600 nm = 0,4~0,9) e 1 mL da amostra bacteriológica. As placas foram incubadas em uma estufa à 37 °C por um período de 12 a 16 horas, permitindo a formação das áreas de lise no tapete bacteriano, chamadas de Unidade Formadora de Placas (UFP). Após o período estabelecido, as placas com áreas de replicação viral foram recortadas de forma asséptica e eluidas em 5 mL de tampão SM Buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5) por, no mínimo, 12 h em agitação constante à 4 °C (KROPINSKI et al., 2009; PELZEK et al., 2013).

A partir disso, 1 mL do eluato obtido foi incubado em 25 mL de meio de cultivo LB com a bactéria hospedeira (DO 600 nm = 0,4~0,9) por até 16 horas à 37 °C para a propagação dos fagos (aumento do título viral). Após o período de incubação, a mistura com fagos foi centrifugada a 10.000 rpm × g por 20 minutos à 4 °C para decantação das células bacterianas. O sobrenadante foi filtrado em filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm para obtenção de partículas virais livres de bactérias, sendo armazenados a 4 °C, bem como estocados no banco de bacteriófagos do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA – UFSC).

O procedimento de propagação dos fagos foi realizado, no mínimo, três vezes, a fim de garantir isolamento e aumento do título viral. Os fagos isolados passaram por diluição em série e foram propagados novamente em DAL para contagem viral, sendo expressa em UFP/mL (KROPINSKI et al., 2009; PELZEK et al., 2013). A Figura 7 foi produzida com o intuito de correlacionar o passo a passo da técnica de duplo ágar e seus respectivos objetivos.

Figura 7 – Técnica de camada dupla de ágar (DAL).

1: Técnica DAL para indução da infecção *in vitro* utilizando a amostra processada do cultivo bacteriológico e hospedeira *P. aeruginosa*; 2: Recorte de Unidade Formadora de Placa (UFP) visando o isolamento; 3: Propagação para aumento do título viral; 4: Diluição seriada para contagem do título viral utilizando a técnica DAL. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3 TITULAÇÃO VIRAL

A determinação do título viral foi realizada pela contagem de Unidade Formadora de Placas (UFP), usando equação (1):

$$\text{Unidade Formadora de Placas} = \frac{\text{Número de Placas Contabilizadas} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Volume}} \quad (1)$$

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LISADOS E DOS BACTERIÓFAGOS

5.4.1 Morfologia das placas de lise

Através de parâmetros anteriormente já destacados por Abedon e Yin (2009) e recentemente fomentados por Shende et al., (2017) e Glonti e Pirnay (2022), as morfologias das placas de lise foram avaliadas considerando o diâmetro da UFP, sendo pequena (< 2 mm), média (2 mm) e grande (> 2 mm), assim como o grau de transparência/turbidez (clara ou turva/opaca), a forma da placa de lise, a presença ou não de halo e motilidade da lise na monocamada bacteriana (ABEDON; YIN, 2009a; GLONTI; PIRNAY, 2022; SHENDE et al., 2017).

A elevada titulação viral e avaliação das morfologias das placas de lise fundamentaram a escolha dos bacteriófagos para testes de tolerância frente à temperaturas (45°C e 60°C) e pH (3.0 - 8.9 - 11.0) e caracterização morfológica por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A obtenção de imagens dos fagos foi realizada por meio de MET, utilizando microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011 TEM [TEM 100 kV]) em parceria com o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME - UFSC).

Através de protocolo adaptado de Adnan et al., (2020), para preparação das amostras, foi adicionado 10µL dos fagos isolados e filtrados em *grids* de ouro de 200 *mesh* revestidos com carbono. Após 24 horas, uma gota de acetato de uranila a 2% foi adicionada na superfície dos *grids* por 15 segundos. Posterior ao período estabelecido, o excesso de acetato de uranila foi retirado com papel absorvente comum e os *grids* foram submetidos à secagem em temperatura ambiente por, no mínimo, 20 minutos (ADNAN et al., 2020).

5.5 TESTE DE REDUÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR FAGOS *IN VITRO*

O teste *in vitro* para avaliação do controle bacteriano de *P. aeruginosa* ATCC e *P. aeruginosa* clínica em meio líquido, foi conduzido com o fago PBPA1, considerado promissor (baseando-se nas características de aparente virulência pela análise das morfologias das placas de lise na etapa de isolamento, correlacionado ao tamanho grande das placas de lise, assim como ao aspecto claro e aparente halo, relacionado a presença de proteínas fagolíticas, bem como a titulação elevada de 10^{11} UFP mL⁻¹).

O objetivo do ensaio foi avaliar a capacidade do controle bacteriano pelo tratamento com fago em contato com as bactérias em (DO 600 nm = 0,4~0,9), considerando diferentes diluições na base 10 das bactérias (-1, -3, -4, -5 e -7). O ensaio explorou a avaliação da dinâmica do fago em concentração fixa, variando a concentração bacteriana.

Desse modo, foi avaliada a redução da proliferação bacteriana por meio de ensaio de absorvância de densidade óptica. Utilizando placas de micro titulação de 96 cavidades, foram adicionados 100 µL de fagos de PBPA1 (10^{11} UFP mL⁻¹) em 100 µL de *P. aeruginosa* ATCC (10^9 UFC mL⁻¹) e *P. aeruginosa* clínica (10^{10} UFC mL⁻¹) em fase exponencial de crescimento nas respectivas diluições. Como controle negativo para o crescimento bacteriano, foi utilizado 900 µL de caldo LB e *P. aeruginosa* sem fago foi utilizado para controle positivo.

A placa de micro titulação foi incubada a 37 °C em espectrofotômetro e os valores de absorvância (DO 600 nm) foram coletados a cada 1 hora de experimento, durante 12 horas. Todos os tratamentos e controles foram replicados 4 vezes e foi utilizado a média desses valores para o cálculo da inibição percentual, descontando a média do controle negativo tanto do controle positivo quanto do tratamento, obtendo como equação final, a equação (2) (PORTER et al., 2016):

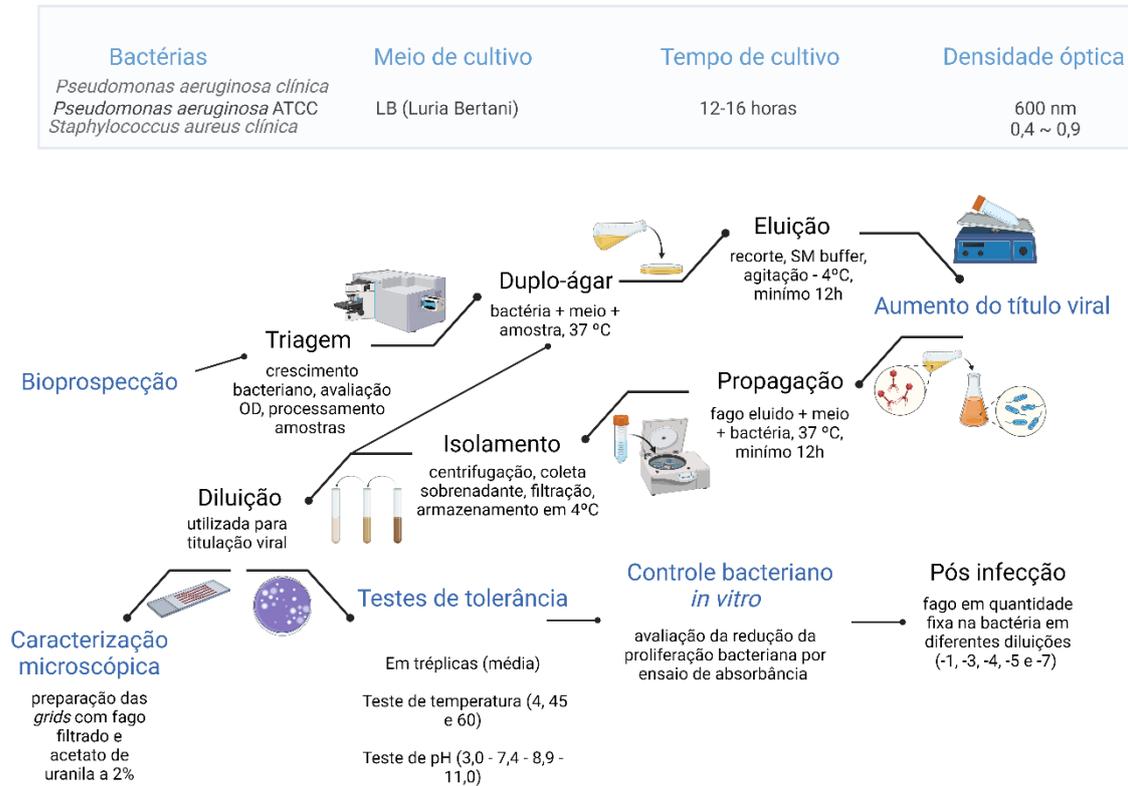
$$Inibição(\%) = \left(\frac{\text{controle positivo DO} - \text{tratamento DO}}{\text{tratamento DO}} \right) \times 100 \quad (2)$$

5.6 TESTE DE TOLERÂNCIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PH

Utilizando o protocolo adaptado realizado por Sharma et al., (2021), os testes de tolerância em diferentes temperaturas e pH foram realizados todos em tréplica para cada fago testado. Em ambos, a técnica DAL foi realizada após a incubação nas determinadas condições abaixo descritas e a porcentagem de fagos infecciosos em comparação com fagos armazenados em tampão TM (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4) a 4 °C foi calculada pela contagem final de UFP sobre a contagem inicial de UFP (SHARMA et al., 2021).

Para o ensaio de tolerância de pH, o pH da solução foi previamente ajustada utilizando HCl 1 M e NaOH 1 M para (3,0), (7,4), (8,9) e (11,0) a fim de analisar a capacidade de tolerância dos fagos em diferentes condições de acidez e alcalinidade em uma exposição de 18 horas a 20 °C (temperatura ambiente). Posteriormente, adicionou-se 100 µL do fago [BPA1 (10⁷ UFP mL⁻¹), PBPA1 (10¹¹ UFP mL⁻¹), PBPA2 (10⁷ UFP mL⁻¹), SPA2 (10⁷ UFP mL⁻¹), TPA2 (10⁵ UFP mL⁻¹), TPA5 (10⁹ UFP mL⁻¹)] em micro tubos contendo 900 µL da solução tampão TM com o pH ajustado. O controle de pH foi realizado utilizando o pH (7,4) incubado à 4 °C (SHARMA et al., 2021).

Para o ensaio de tolerância térmica, adicionou-se 900 µL da solução tampão TM em micro tubos e estes foram mantidos em diferentes temperaturas, 4 °C, 45 °C e 60 °C, por 30 minutos. Após o período estabelecido, 100 µL dos fagos [BPA1 (10⁷ UFP mL⁻¹), PBPA1 (10¹¹ UFP mL⁻¹), PBPA2 (10⁷ UFP mL⁻¹), SPA2 (10⁷ UFP mL⁻¹), TPA2 (10⁵ UFP mL⁻¹), TPA5 (10⁹ UFP mL⁻¹)] foram adicionados a cada tubo, misturados suavemente e incubados nas diferentes temperaturas previamente estabelecidas por 60 minutos. O controle foi realizado utilizando os fagos armazenados em tampão TM incubado à 4 °C (SHARMA et al., 2021). O desenho experimental resumindo todos os métodos descritos em Material e Métodos se encontra na Figura 8.

Figura 8 - Desenho experimental.

Resumo e correlação entre as etapas descritas em Material e Métodos. Fonte: Elaborada pela autora (2022).

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise dos resultados do teste de tolerância em diferentes níveis de pH e ensaio piloto *in vitro* utilizou-se teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e para as análises subsequentes utilizou-se o teste *t student*, seguido da Análise de Variância (ANOVA) de uma via, paramétrico. Para análise dos resultados do teste de tolerância em diferentes temperaturas, utilizou-se também o Teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0. Considerou-se diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 BIOPROSPECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

6.1.1 Isolamento de bacteriófagos utilizando *P. aeruginosa*

Após uma série de ciclos de replicação, foram isolados dezenove (19) fagos com a capacidade de infectar *P. aeruginosa*, destes, oito fagos (8) originaram-se de duas diferentes amostras bacteriológicas de tecido tendinoso, três fagos (3) foram provenientes de amostras bacteriológicas de pele, um fago (1) teve origem de uma amostra bacteriológica de tecido ósseo, e sete fagos (7) foram isolados de amostras bacteriológicas de tecido ósseo proximal. A nomenclatura dos isolados foi definida seguindo o padrão internacional, conforme o guia informal proposto por Adriaenssens e Brister (2017). Nesse sentido, a nomenclatura dos fagos foi estruturada com base na origem das amostras dos isolados, respeitando a terminologia científica em inglês (ADRIAENSSENS; BRISTER, 2017). Assim, o acrônimo PB corresponde a "*proximal bones*" (osso proximal), B representa "*bones*" (osso), S indica "*skin*" (pele) e T denota "*tendon*" (tendão). A adição da sigla PA nos identificadores sinaliza que a bactéria hospedeira dos isolados é *P. aeruginosa*. Todos os isolados foram catalogados e preservados no banco de vírus do LVA-UFSC. Os resultados completos podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da bioprospecção de bacteriófagos em *P. aeruginosa*.

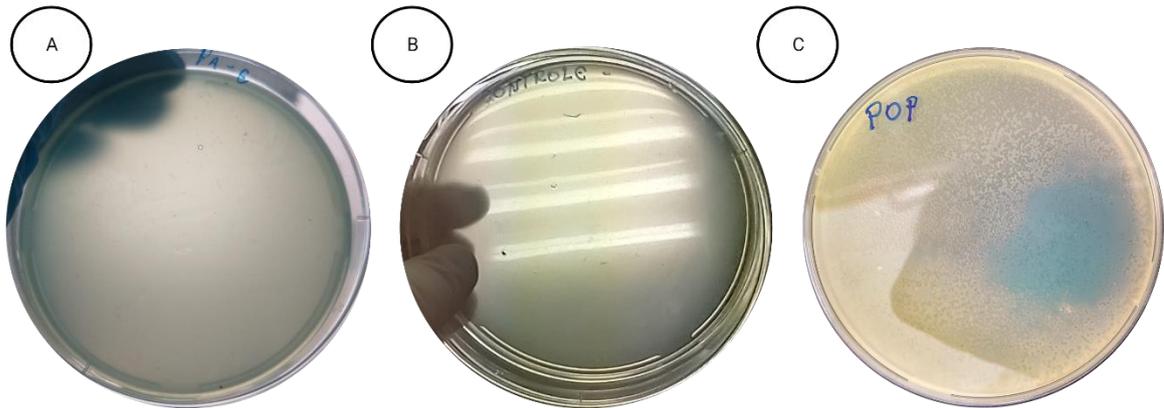
Identificação	Fonte de isolamento	Bactérias hospedeiras	Titulação da última passagem
TPA1	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	3×10^5 UFP mL ⁻¹
TPA2	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	2×10^5 UFP mL ⁻¹
TPA3	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	5×10^9 UFP mL ⁻¹
TPA4	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	1×8.10^5 UFP mL ⁻¹
TPA5	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	5×10^9 UFP mL ⁻¹
TPA6	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	1×10^9 UFP mL ⁻¹
TPA7	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	incontável

TPA8	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	1×10^{10} UFP mL ⁻¹
SPA1	Amostra bacteriológica de tendão	<i>P. aeruginosa</i> clínica	8×10^4 UFP mL ⁻¹
SPA2	Amostra bacteriológica de pele	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	2×10^7 UFP mL ⁻¹
SPA3	Amostra bacteriológica de pele	<i>P. aeruginosa</i> clínica	incontável
BPA1	Amostra bacteriológica de osso	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	6×10^{15} UFP mL ⁻¹
PBPA1	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	3×10^{13} UFP mL ⁻¹
PBPA2	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> ATCC N°27853 e clínica	2×10^{13} UFP mL ⁻¹
PBPA3	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> clínica	$4,2 \times 10^{10}$ UFP mL ⁻¹
PBPA4	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> clínica	1×10^9 UFP mL ⁻¹
PBPA5	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> clínica	5×10^5 UFP mL ⁻¹
PBPA6	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> clínica	$3,1 \times 10^8$ UFP mL ⁻¹
PBPA7	Amostra bacteriológica de osso proximal	<i>P. aeruginosa</i> clínica	incontável

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os fagos isolados foram propagados utilizando uma linhagem clínica de *P. aeruginosa* como hospedeira, posteriormente foi utilizada a linhagem de referência nos demais experimentos. Essa abordagem teve como objetivo explorar o potencial terapêutico *in vitro* dos fagos isolados. Os resultados dos experimentos de controle em comparação com uma placa infectada com fagos estão ilustrados na Figura 9. A aparência turva das placas sugere o crescimento bacteriano, enquanto a coloração verde é indicativa da liberação de pigmentos hidrossolúveis liberados pelas bactérias, como pioverdina e piocianina, já a monocamada bacteriana infectada por fagos apresenta transparências chamadas de Unidade Formadora de Placa (UFP) (HOWARTH; DEDMAN, 1964).

Figura 9 – Comparativo dos controles e de placa com aparente infecção fágica.



A: controle positivo para *P. aeruginosa* clínica e negativo para fagos; B: controle positivo para *P. aeruginosa* ATCC e negativo para fagos; C: placa com monocamada bacteriana infectada por fagos, apresentando aparentes Unidades Formadoras de Placa (UFP). Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os isolados BPA1, PBPA1, PBPA2, SPA2, TPA2 e TPA5 demonstraram a capacidade de infectar tanto a cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC N°27853 quanto uma cepa clínica da mesma espécie. Essa observação ressalta o potencial desses fagos para aplicações clínicas. Investigações prévias e recentes reforçam a importância das cepas bacterianas clínicas de *P. aeruginosa* na caracterização de bacteriófagos. Essas cepas clínicas proporcionam bases para avaliação da eficácia, especificidade, segurança e potencial terapêutico dos fagos em cenários clínicos mais autênticos. Tal abordagem é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias mais focadas e eficazes contra infecções bacterianas, particularmente aquelas de relevância clínica (AKREMI et al., 2022; JEON; YONG, 2019; KNEZEVIC et al., 2011).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LÍTICO DOS BACTERIÓFAGOS E MORFOLOGIA

6.2.1 Morfologia das placas de lise e perfil lítico

A condução de estudos fundamentais que examinem as interações entre fagos e bactérias, e que prevejam a dinâmica entre as populações desses organismos, é de extrema importância para o desenvolvimento de abordagens práticas na terapia fágica (CAIRNS et al.,

2009). O processo de formação de placas de lise é intrincado e resulta da repetição de múltiplos ciclos de infecção, lise e liberação de progenitores virais. A dinâmica desse processo é influenciada por diversos fatores, incluindo o período de latência do fago, a magnitude e rapidez do crescimento bacteriano e a taxa de difusão do fago. Como resultado, as placas de lise exibem morfologias distintas em termos de tamanho e visibilidade, refletindo as complexas interações subjacentes (ABEDON, 2018; ABEDON; YIN, 2009b; MIRZAEI; NILSSON, 2015).

A avaliação da aparência morfológica das placas de lise é o primeiro critério a ser considerado, uma vez que desempenha um papel de destaque na diferenciação e seleção de fagos, além de contribuir para a purificação da placa e a avaliação da virulência e lisogenia dos fagos (GLONTI; PIRNAY, 2022). Essa abordagem é essencial para estabelecer bases sólidas para resultados terapêuticos bem-sucedidos (KUTTER et al., 2010; SHENDE et al., 2017). O uso de ágar semissólido na técnica DAL induz a formação de um ambiente espacial estruturado. Esse ambiente guarda semelhanças com biofilmes, solos e tecidos, proporcionando uma representação mais fiel das condições ambientais nas quais as bactérias e fagos são geralmente encontrados. Adicionalmente, as pressões seletivas que afetam os fagos durante o crescimento em placas, diferem daquelas observadas durante o crescimento em meio líquido (ABEDON, 2018; ABEDON; YIN, 2009b).

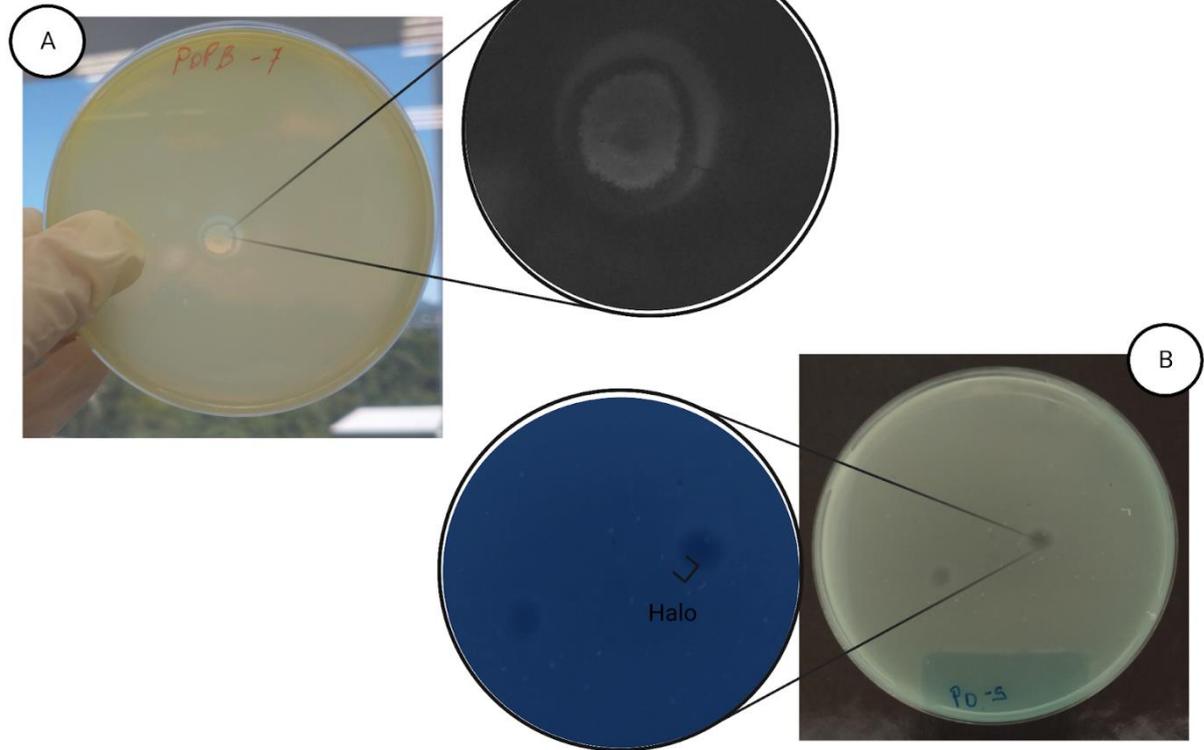
A presença de placas claras é normalmente associada a fagos líticos, enquanto a opacidade, referente ao aumento da turbidez, decorre da retenção de bactérias não lisadas (YIN, 2008). Fagos líticos frequentemente geram placas com um centro claro seguido por uma zona de turbidez, conhecida como halo, dando origem ao que é conhecido como uma placa de "olho de boi". Esse halo é resultado da liberação de enzimas líticas, que podem ser liberadas mesmo após o término da replicação viral, na fase estacionária da bactéria. Devido ao seu baixo peso molecular, essas enzimas têm uma difusão facilitada, permitindo que alterem a morfologia do tapete microbiano ao degradar os componentes encapsulantes estruturais das bactérias, sem necessariamente causar a morte destas (ABEDON; YIN, 2009; YIN, 2008).

Nesse sentido, considerando os parâmetros de morfologia de placas discutidos por Abedon e Yin (2009) e recentemente fomentados por Shende et al., (2017) e Glonti e Pirnay (2022), a Tabela 3 e as Figuras 10, 11 e 12 foram elaboradas com o objetivo de fornecer dados sobre as morfologias observadas.

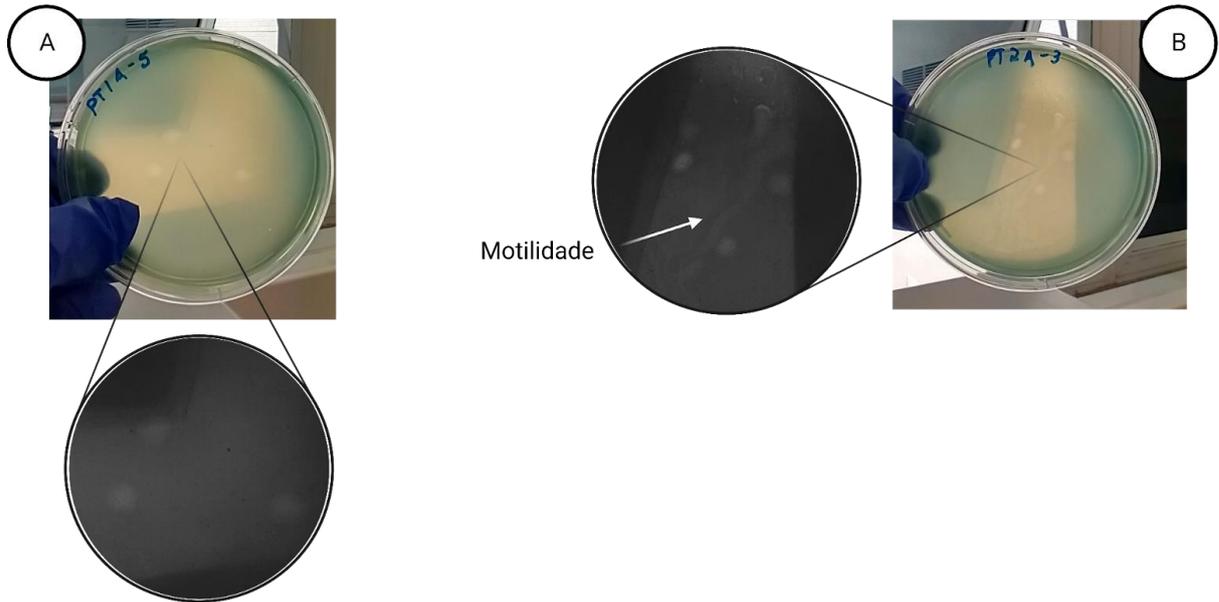
Tabela 3 - Caracterização morfológica do perfil lítico dos bacteriófagos isolados.

Nome	Turbidez	Forma	Halo	Motilidade	Tamanho da lise	Diâmetro da UFP
TPA2	Clara	Circular	Sim	Sim	Grande	7 mm
TPA5	Clara	Circular	Sim	Não	Média	2 mm
TPA6	Clara	Circular	Sim	Não	Grande	9 mm
TPA8	Clara	Circular	Sim	Sim	Grande	5 mm
BPA1	Clara	Circular	Sim	Não	Grande	7 mm
SPA2	Clara	Circular	Não	Não	Pequena	< 2mm
PBPA1	Clara	Circular	Não	Não	Grande	7 mm
PBPA2	Clara	Circular	Não	Não	Grande	12 mm
PBPA3	Clara	Cabeça de alfinete	Não	Não	Pequena	< 2 mm
PBPA4	Clara	Circular	Não	Sim	Grande	5 mm
PBPA5	Clara	Circular	Não	Não	Grande	5 mm
TPA1	Opaca	Dismorfa	Sim	Sim	Grande	10 mm
TPA3	Opaca	Dismorfa	Sim	Sim	Grande	7 mm
TPA4	Opaca com liberação de pigmentos elevados no centro	Cabeça de alfinete	-	Sim	Pequena	< 2mm
SPA1	Opaca	Circular	Não	Não	Grande	15 mm
PBPA6	Opaca	Circular	Não	Não	Pequena	< 2 mm
PBPA7	Clara	Transparência incontável (10^{13} UFP mL ⁻¹)	-	Sim	-	32x75 mm
TPA7	Clara	Transparência incontável (10^{13} UFP mL ⁻¹)	-	Sim	-	60x75 mm
SPA3	Clara	Pequenos com alastramento, incontável (10^7 UFP mL ⁻¹)	-	Sim	-	-

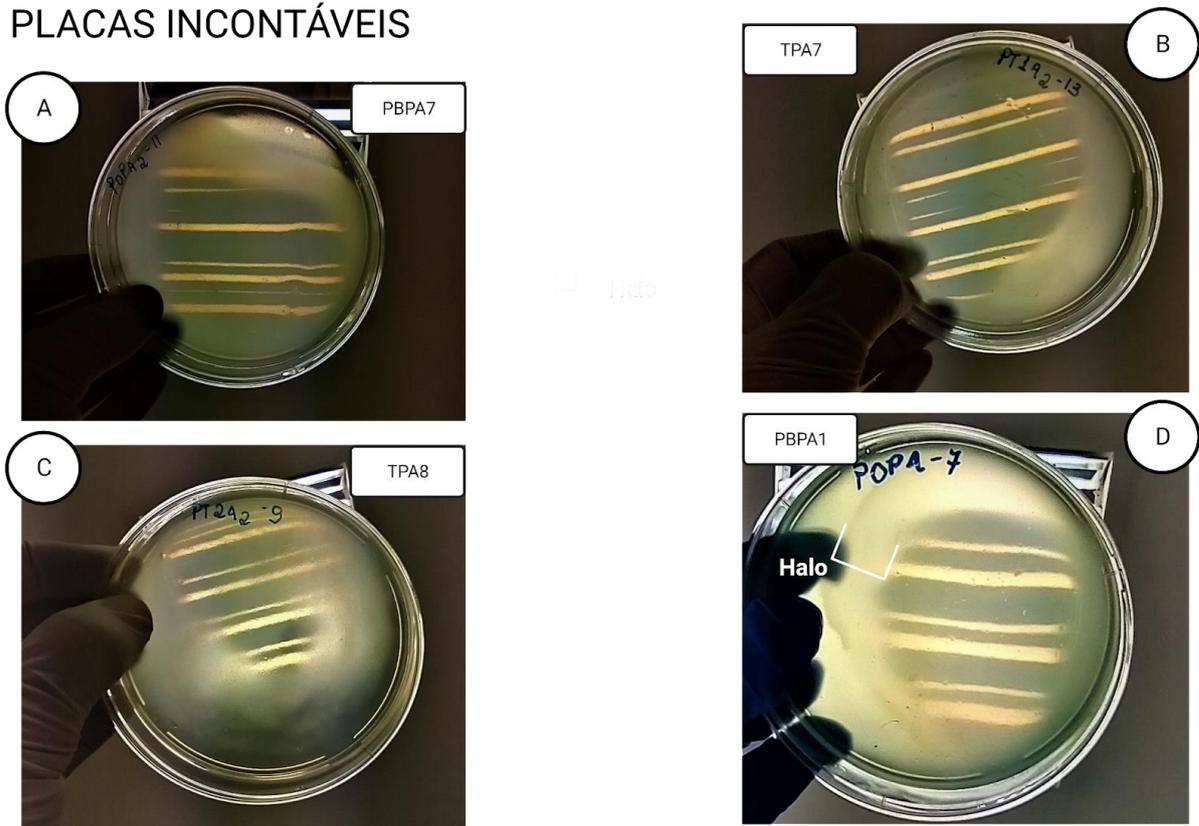
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 10 - Placas claras.**PLACAS CLARAS**

Fotos de duas placas de Petri com dois padrões de lise distintos e claro. Na imagem A é possível observar a presença de zona de crescimento bacteriano entre a continuidade da lise. Na imagem B é possível observar a presença de halo. As imagens de aproximação foram coloridas graficamente para melhor visualização. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 11 - Placas opacas.**PLACAS OPACAS**

Fotos de duas placas de Petri com padrão de lise opaco. Na imagem A é possível observar a presença de opacidade referente a crescimento bacteriano resquicial. Na imagem B é possível observar a presença de motilidade. As imagens de aproximação foram coloridas graficamente para melhor visualização. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 12 - Placas claras e incontáveis.**PLACAS INCONTÁVEIS**

Fotos de quatro placas de Petri com transparências claras e sem titulação. Nas imagens A, B e C é possível observar a presença de transparências referentes ao controle do crescimento bacteriano realizado pelos fagos PBPA7, TPA7 e TPA8. Na imagem D é possível observar a presença transparência e halo. As fotos de TPA8 e PBPA1 são de diluições anteriores a titulação. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Dos 19 isolados fágicos, onze (11) isolados (TPA2, TPA5, TPA6, TPA8, BPA1, SPA2, PBPA1, PBPA2, PBPA3, PBPA4, PBPA5) apresentaram placas claras, três (3) isolados (TPA7, SPA3, PBPA7) apresentaram transparência clara pelo controle do tapete microbiano, impossibilitando a titulação. Por fim, 5 isolados (TPA1, TPA3, TPA4, SPA1, PBPA6) geraram placas opacas.

Fagos líticos normalmente apresentam placas claras pois possuem a capacidade de controlar o crescimento bacteriano na zona de lise, enquanto as principais razões por trás da opacidade ou turbidez das placas incluem i) uma adsorção lenta do fago, permitindo que bactérias resistentes retomem o crescimento após a formação da placa de lise, e ii) a possibilidade de fagos temperados perderem sua capacidade lítica, sendo induzidos ao estado lisogênico (ABEDON, 2019; JURCZAK-KUREK et al., 2016).

A presença de halo nas placas de lise (Figuras 10 - B e 12 - D) é um fenômeno que reflete a capacidade desses fagos de liberar enzimas líticas que não apenas destroem as

bactérias alvo na placa atual, mas também conseguem se difundir pelo biofilme, atingindo células que se encontram mais distantes da área original de infecção. Um atributo especialmente relevante no contexto do controle de biofilmes, uma vez que os biofilmes são comunidades microbianas densas e estruturadas que podem ser resistentes a abordagens de controle tradicionais (JURCZAK-KUREK et al., 2016; LIU et al., 2022). Os fagos que são capazes de gerar halos em suas placas de lise demonstram ser agentes eficazes no controle de *P. aeruginosa* formadora de biofilmes (JURCZAK-KUREK et al., 2016).

O perfil de “motilidade” de placa observado na Figura 11 - B pode estar diretamente correlacionado à rápida adsorção inicial dos fagos. Não possuindo mecanismos de movimento ativo próprio, os fagos dependem do movimento browniano para se deslocarem em direção aos seus alvos. Nas placas, pode-se observar a formação de "trilhas" de lise, que se deve a condição que, no ágar semissólido, as células bacterianas permanecem praticamente imóveis. Dado que as partículas dos fagos são menores, elas têm maior liberdade de movimento, o que resulta na lise de células localizadas a jusante por meio de difusão (YIN, 2008). Alguns isolados apresentaram esse perfil de placa no decorrer do processo de isolamento, porém, após maior diluição e indução da infecção *in vitro*, a formação de Unidades Formadoras de Placa (UFP) distintas e bem definidas permitiu a titulação sem a presença aparente do processo de motilidade. Sugere-se que a quantidade de fagos está intrinsecamente ligada à dinâmica da interação entre bactérias e fagos apresentada na manifestação morfológica das placas que se formam no tapete microbiano.

Uma rápida adsorção inicial e conseqüente aparente processo de motilidade pode ser compreendida por meio das características biológicas que governam a interação entre *P. aeruginosa* e os fagos. A bactéria *P. aeruginosa* exibe pelo menos três formas distintas de motilidade: nado direcionado por flagelo, deslocamento impulsionado por pilus tipo IV ao longo de superfícies e crescimento em enxame sobre substratos semissólidos (KAZMIERCZAK; SCHNIEDERBEREND; JAIN, 2015; O'TOOLE; KOLTER, 1998). Coincidentemente, há fagos que possuem a capacidade de se ligar ao flagelo bacteriano através de fibras específicas. Essa interação proporciona uma adsorção ágil ao fago, uma vez que ele é direcionado para a base do flagelo bacteriano, local onde ocorre a adsorção inicial. Esse fator destaca a adaptação intrínseca entre os fagos e suas bactérias hospedeiras, otimizando o processo de infecção e replicação (ESTEVEZ; SCHARF, 2022; SCHADE; ADLER; RIS, 1967).

O tamanho das placas de lise é influenciado por diversos fatores, incluindo i) as propriedades intrínsecas de difusão do fago no meio, ii) a duração do contato do fago com as

bactérias no tapete microbiano e iii) a limitação das barreiras porosas impostas pelas moléculas de ágar reticulado (ABEDON; YIN, 2009; AMEH et al., 2020; GALLET; KANNOLY; WANG, 2011). Entre os 19 isolados observados, 11 isolados fágicos (TPA1, TPA2, TPA3, TPA6, TPA8, BPA1, SPA1, PBPA1, PBPA2, PBPA4, PBPA5) apresentaram tamanho de placa de lise grande, 1 isolado fágico (TPA5) apresentou tamanho médio, 4 isolados fágicos (TPA4, SPA2, PBPA3, PBPA6) apresentaram tamanhos menores e os 3 isolados fágicos restantes (TPA7, SPA3, PBPA7) exibiram tamanhos indeterminados, visto que as placas mostraram transparências correspondentes ao controle do tapete microbiano, mas não permitiram a titulação. Para esses casos de placas transparentes, é necessário realizar novas passagens com maiores diluições para a obtenção de uma titulação precisa, mesmo que, em dois casos (TPA7 e PBPA7), estes tenham sido diluídos até a ordem de 10^{13} UFP mL⁻¹.

A formação de placas de tamanho reduzido pode ser atribuída a atrasos na etapa inicial de adsorção, o que por sua vez retarda o crescimento das placas de lise (ABEDON, 2018; SCHUSTER, 1962). Um período de infecção mais rápido resulta em uma maior quantidade de virions dispersos no meio, o que, por consequência, resulta em placas de lise de maior tamanho (ABEDON, 2018; ABEDON; HYMAN; THOMAS, 2003).

O crescimento das placas cessa quando a população bacteriana atinge a fase estacionária, onde a quantidade de novos indivíduos é equivalente ao número de indivíduos que morrem. A velocidade com que as populações de fagos se expandem serve como uma medida da aptidão evolutiva do fago. Além disso, o impacto adverso que uma população de fagos exerce sobre uma população bacteriana, ou seja, a virulência do fago, também pode ser influenciado pela rapidez de crescimento da população de fagos (ABEDON, 2018; HERELLE; SMITH, 1922).

Uma maior virulência dos fagos frequentemente é uma característica desejável para aplicações como biocontrole, bioprocessamento ou terapia antibacteriana baseada em fagos (MULUGETA; TESFAYE; TESFAYE, 2018). Portanto, é possível considerar que todos os isolados fágicos que exibiram placas de lise clara, tamanhos amplos, halo e motilidade podem ser classificados como mais virulentos em relação àqueles que apresentaram placas de lise opacas, tamanhos pequenos, ausência de halo e ausência de motilidade. As primeiras características sugerem que esses fagos possuem maior potencial para influenciar de forma eficaz ou significativa o controle das populações bacterianas-alvo em diversos contextos. No contexto de biofilmes, entretanto, uma taxa de adsorção mais baixa pode ter vantagens, ou seja, fagos que apresentam tamanho de lise pequeno, já que isso permite que os fagos se difundam para fora da área da placa original, aumentando assim a concentração de virions ao

longo do tempo (GALLET; KANNOLY; WANG, 2011; GALLET; SHAO; WANG, 2009). De igual modo, é importante destacar que a motilidade bacteriana desempenha um papel crucial na formação de biofilmes (O'TOOLE; KOLTER, 1998). Portanto, sugere-se que os fagos que se prendem aos flagelos têm uma maior probabilidade de entrar em contato com um maior número de células, seguindo o movimento bacteriano natural e possam atravessar mais facilmente biofilmes (LI et al., 2020).

Desse modo, além da avaliação do título viral e da inclusão de pelo menos um isolado fágico de cada origem amostral bacteriológica, a análise das placas de lise proporcionou uma etapa adicional de pré-seleção dos 6 isolados (BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2) utilizados nos experimentos subsequentes.

6.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A seguir são apresentadas as micrografias obtidas por meio de MET de 6 isolados fágicos (BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2). A tentativa de classificar fagos filamentosos foi excluída dessas análises, devido à falta de caracterização genômica, o que poderia levar a confusões com outros filamentos, como pili e flagelos. Portanto, para uma caracterização mais detalhada, foram determinados os seguintes parâmetros, com base nos membros da antiga classe *Caudoviricetes*: diâmetro da cabeça (hd), comprimento da cauda (tl) e diâmetro da cauda (td), conforme exemplificado na Figura 13.

Seguindo critérios estabelecidos previamente, (ACKERMANN, 1998, 2009a; JURCZAK-KUREK et al., 2016) para permitir, uma análise mais precisa e discriminativa das características morfológicas dos fagos, contribuindo para a compreensão da sua classificação e estrutura, as partículas com tl e hd < 40 nm e foram classificadas como pertencentes à família *Podoviridae*. Além disso, o valor de td foi empregado para classificar os vírus com caudas mais longas, distinguido entre as famílias *Myoviridae* (td \geq 16 nm) (hd > 97 nm) ou *Siphoviridae* (td < 16 nm) e (hd > 75 e < 97).

Reconhecendo a importância crucial da caracterização morfológica e considerando que o sequenciamento genômico não faz parte do âmbito deste trabalho, a caracterização foi conduzida de acordo com as orientações estabelecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV).

Figura 13 - Parâmetros de morfologia.

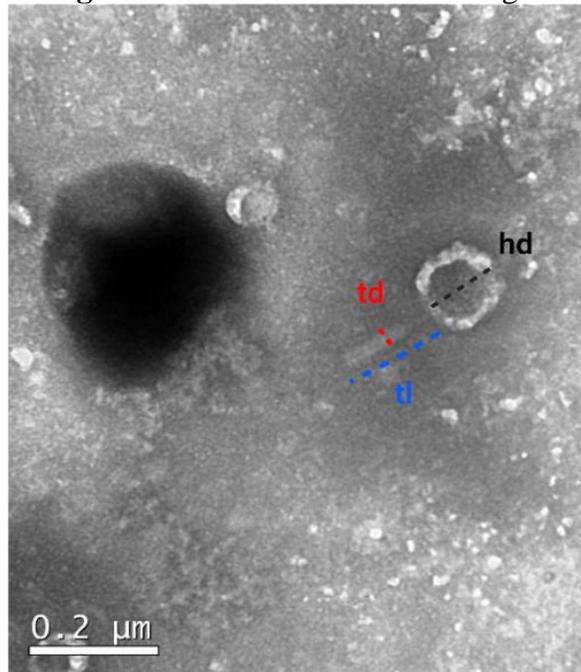
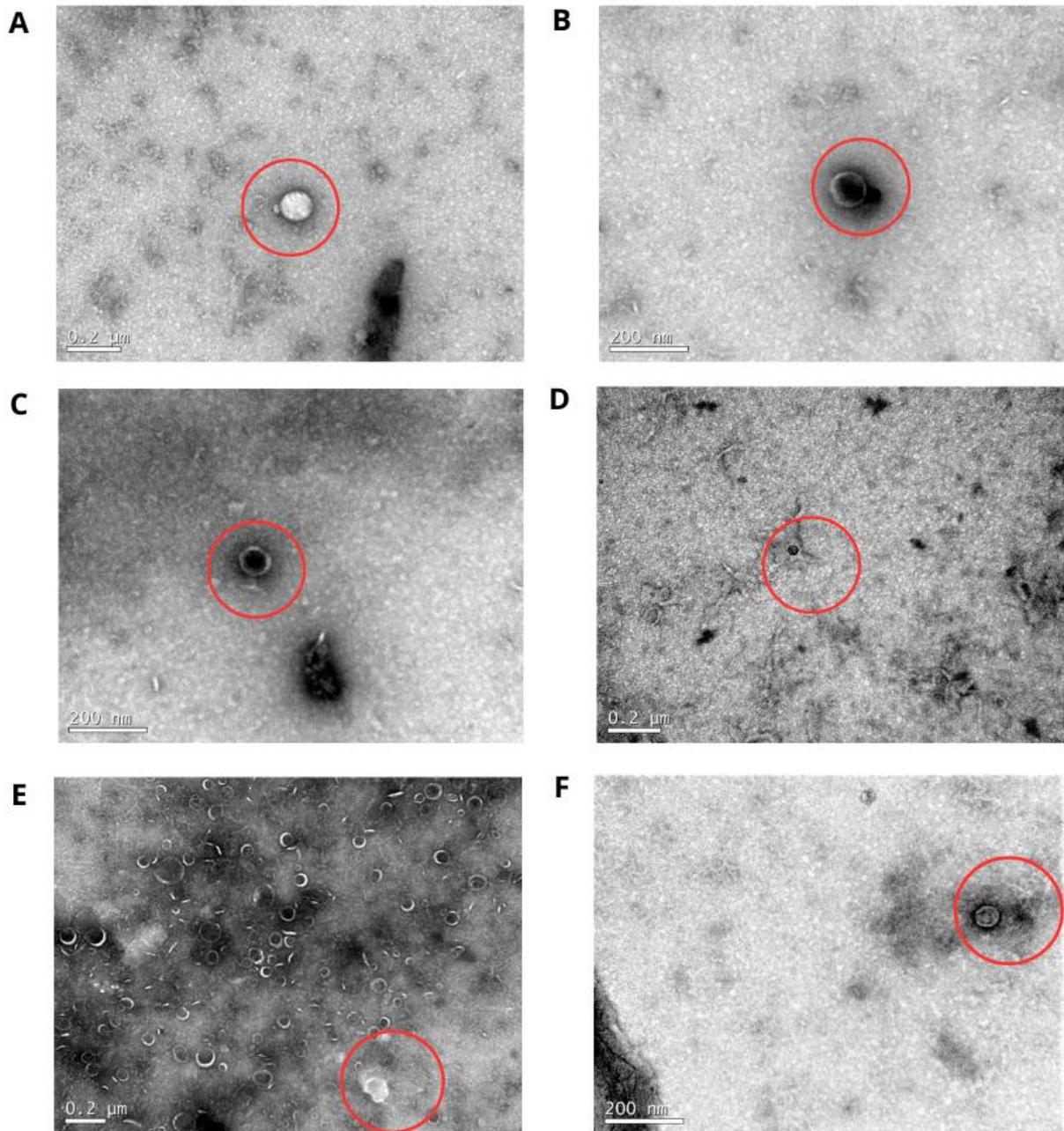


Imagem de MET de um membro da antiga família *Myoviridae* utilizado como modelo para exemplificar os parâmetros utilizados na caracterização. tl e $hd < 40$ nm: *Podoviridae*; $td \geq 16$ nm e $hd > 97$ nm: *Myoviridae*; $td < 16$ nm e $hd > 75$ e < 97 : *Siphoviridae*. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Abaixo são apresentadas as micrografias e concomitante caracterização, essas imagens contribuem para uma visualização mais clara das características morfológicas distintas das antigas famílias *Podoviridae*, *Myoviridae* e *Siphoviridae*, permitindo uma classificação mais precisa dos fagos isolados. É relevante observar que as três famílias mencionadas fazem parte da classe dos *Caudoviricetes*, antiga ordem dos *Caudovirales* e compartilham a característica de possuir fita dupla de DNA linear.

A Figura 14 ilustra fagos que anteriormente pertenciam à família *Podoviridae*, estes apresentam um capsídeo icosaédrico associado a uma cauda curta e não contrátil.

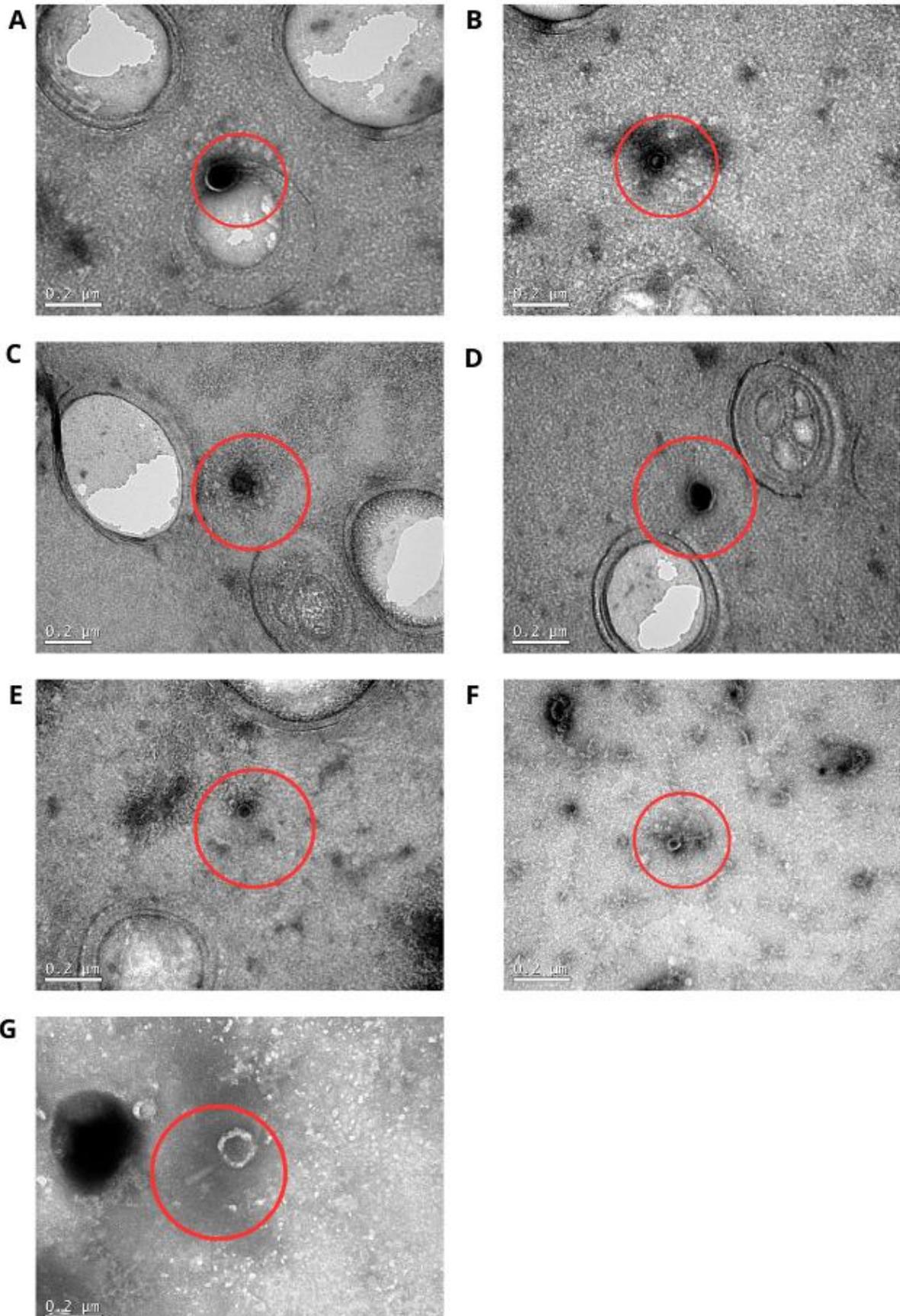
Figura 14 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família *Podoviridae*.



Micrografia eletrônica de transmissão de fagos de *P. aeruginosa* pertencentes à antiga família *Podoviridae* corados com 2% de acetato de uranila. (A - C) Isolado PBPA2; (D, E) Isolado SPA2; (F) TPA2. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

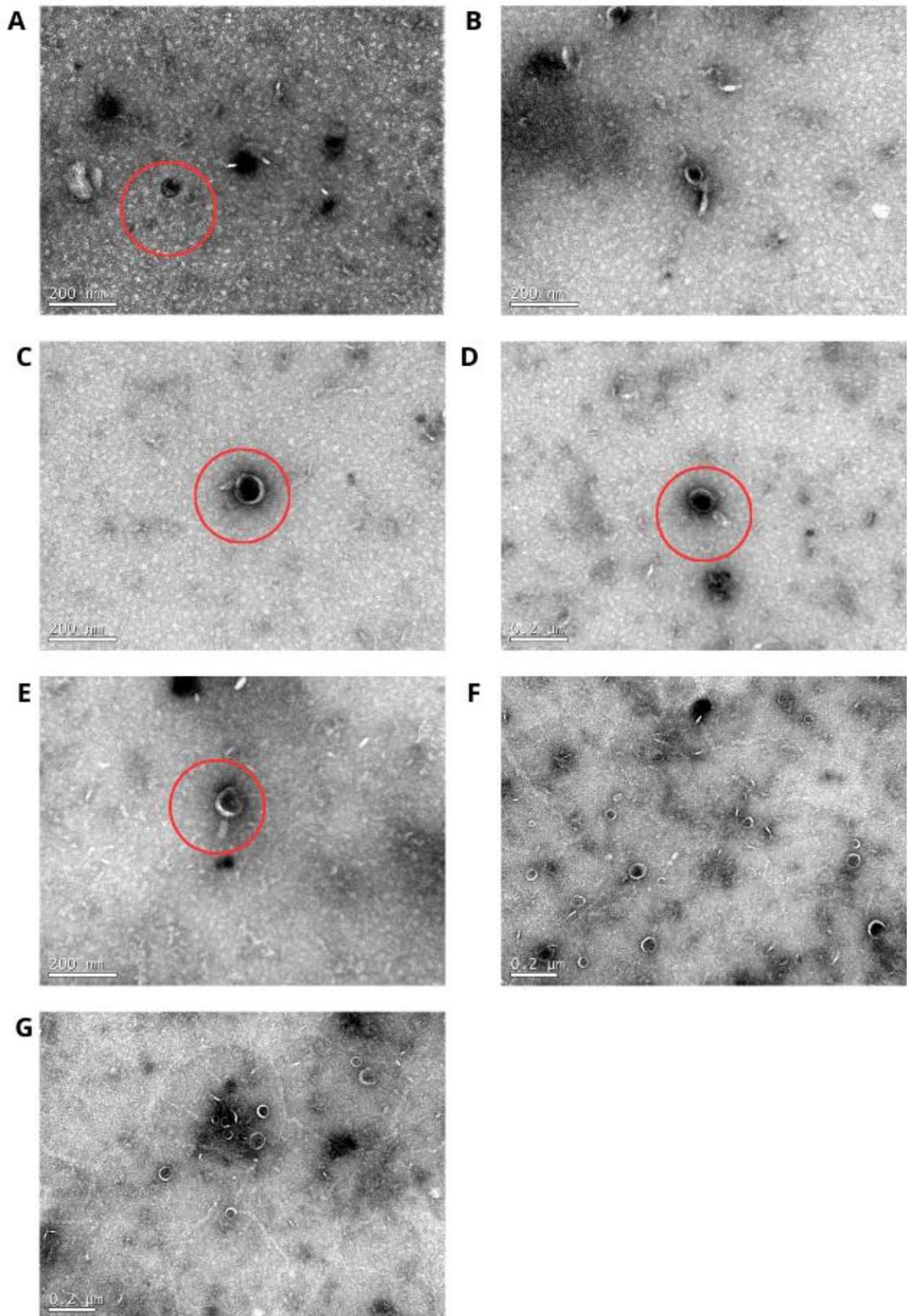
Nas Figuras 15, 16 e 17 são apresentados fagos que pertenciam à antiga família *Myoviridae*, os quais são caracterizados por suas caudas espessas, rígidas e com capacidade de contração.

Figura 15 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família *Myoviridae*.



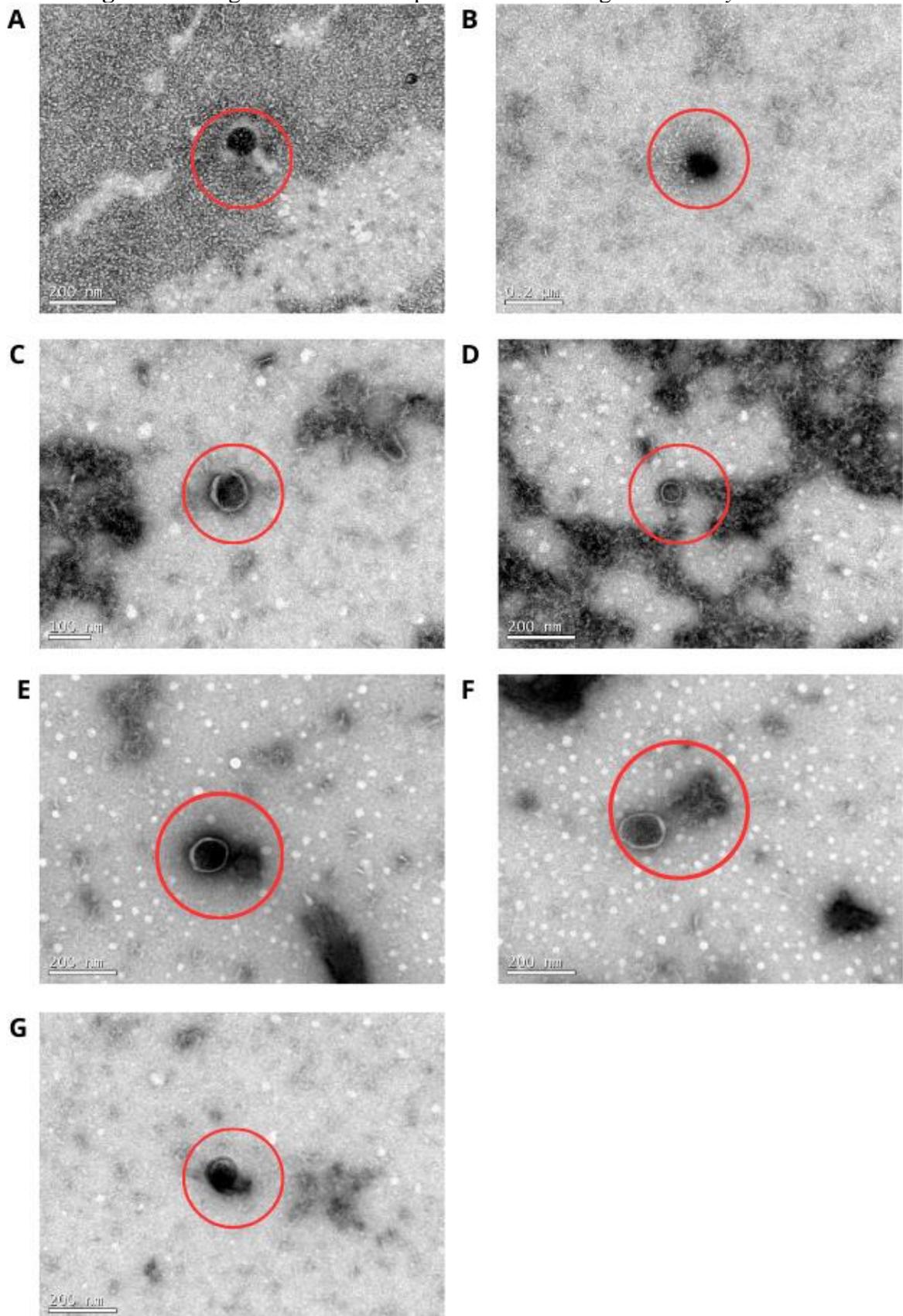
Micrografia eletrônica de transmissão de fagos de *P. aeruginosa* pertencentes à antiga família *Myoviridae* coradas com 2% de acetato de uranila. (A - E) Isolado BPA1; (F, G) Isolado PBPA1. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 16 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família *Myoviridae*.



Micrografia eletrônica de transmissão de fagos de *P. aeruginosa* pertencentes à antiga família *Myoviridae* coradas com 2% de acetato de uranila. (A - E) Isolado PBPA2; (F, G) Isolado SPA2. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

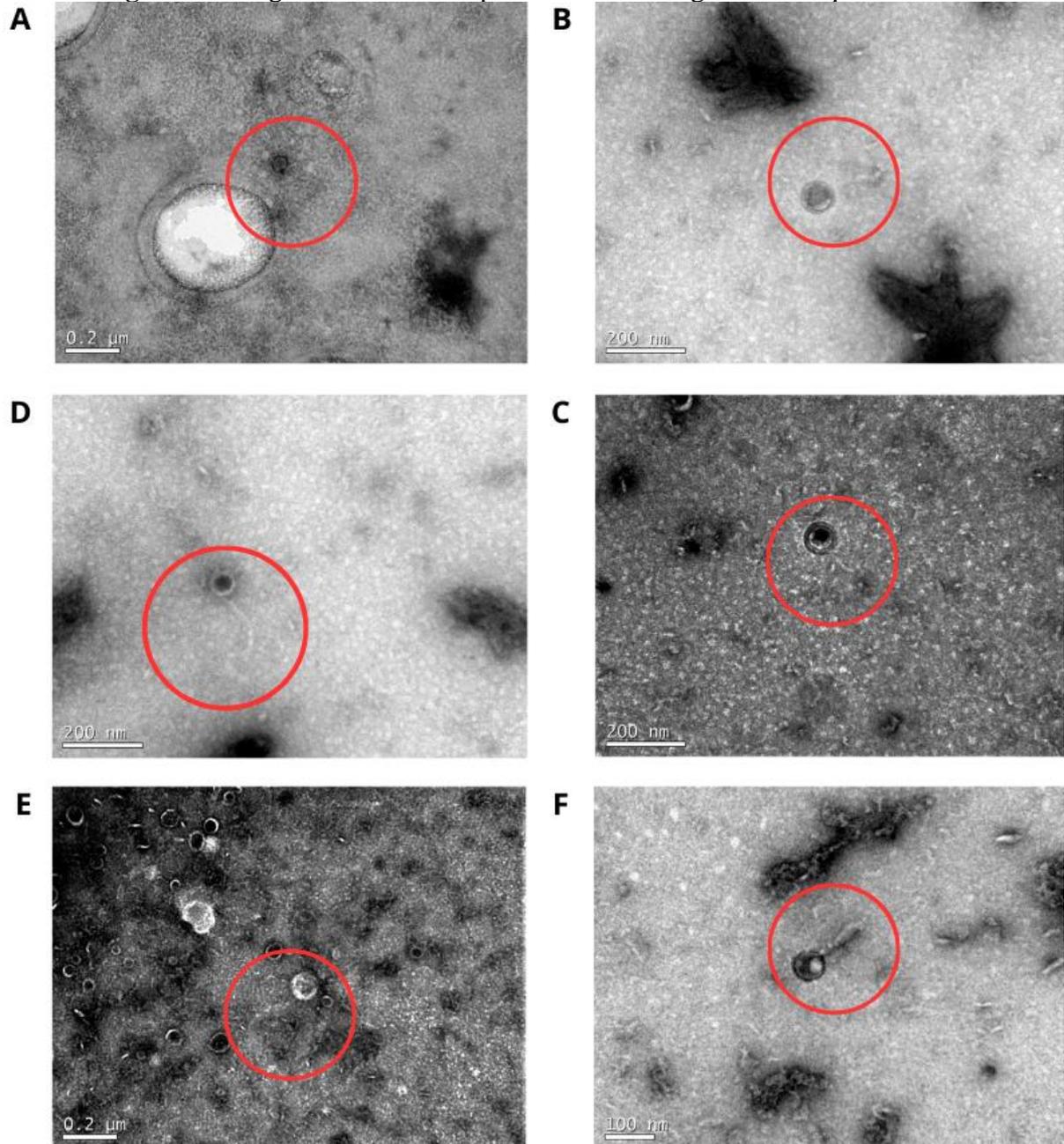
Figura 17 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família *Myoviridae*.



Micrografia eletrônica de transmissão de fagos de *P. aeruginosa* pertencentes à antiga família *Myoviridae* coradas com 2% de acetato de uranila. (A, B) Isolado TPA2; (C - G) Isolado TPA5. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A Figura 18 retrata fagos pertencentes à antiga família *Siphoviridae*, reconhecidos por suas caudas longas, finas e não contráteis.

Figura 18 - Fagos anteriormente pertencentes à antiga família *Siphoviridae*



Micrografia eletrônica de transmissão de fagos de *P. aeruginosa* anteriormente pertencentes à antiga família *Siphoviridae* coradas com 2% de acetato de uranila. (A) Isolado BPA1; (B - D) Isolado PBPA2; (E) Isolado SPA2; (F) Isolado TPA5. Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados PBPA2 e SPA2 apresentaram fagos constituintes nas três antigas famílias. O isolado TPA2 apresentou apenas fagos da família *Podoviridae* e *Myoviridae*, enquanto BPA1 e TPA5 possuem membros de *Myoviridae* e *Siphoviridae*. Com intuito de sintetizar essas informações, a Tabela 4 foi produzida.

Tabela 4 – Constituição do perfil morfológico presente em cada isolado.

Isolado	<i>Podoviridae</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>
BPA1		X	X
PBPA1		X	
PBPA2	X	X	X
TPA2	X	X	
TPA5		X	X
SPA2	X	X	X

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os isolados BPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2 revelaram a possível presença de uma coleção multifágica ou agregados fágicos (presença de fagos pertencentes ao menos a duas famílias distintas). Sugere-se que o considerável tamanho das placas de lise observado em BPA1, PBPA2, TPA2 e TPA5 (>ou=2 mm) pode ser atribuído existência de fagos com diâmetros menores de cabeça (pertencentes às antigas famílias *Siphoviridae* e *Podoviridae*). Fagos menores tendem a difundir-se de maneira mais ampla no meio, visto que encontram menos obstáculos e se difundem mais rápido na camada superior do ágar, o que pode influenciar na formação de uma placa de lise de tamanho maior (GALLET; KANNOLY; WANG, 2011; JURCZAK-KUREK et al., 2016).

Os seis isolados foram submetidos a consecutivas passagens para garantir o devido isolamento e apresentaram UFP bem definidas. Apesar de o uso de Ca²⁺ ter como um dos principais objetivos prevenir a agregação dos fagos, visando a promoção de um ambiente mais estável para infecção e posterior replicação. Em alguns fagos, a utilização de Ca²⁺ pode fazer com que as superfícies fágicas que antes eram carregadas eletro negativamente, se tornem neutras e produzam agregados fágicos (MYLON et al., 2010). O emprego de acetato de uranila a 2% desencadeia a dispersão dos virions, tornando-os visíveis em microscopia MET (ACKERMANN, 2009). Deste modo, sugere-se que algumas UFP podem ter sido geradas devido à associação sinérgica de diversos fagos, cujas especificidades e distinções somente poderiam ser mais bem esclarecidas por meio de análises aprofundadas, como a análise genômica.

No geral, foi possível observar diversidade morfológica de membros constituintes dos isolados fágicos. Nas imagens F e G da Figura 16 e na imagem E da Figura 18, todas

representando fagos do isolado SPA2, é possível observar fatores de riqueza e abundância nas amostras isoladas.

6.3 TESTES DE TOLERÂNCIA

6.3.1 Tolerância pH

O pH é uma escala logarítmica que varia de 1 a 14 e reflete a concentração de íons de hidrogênio, indicando níveis de acidez (<7), neutralidade (7) ou alcalinidade/basicidade (>7). Nesse sentido, os efeitos de tolerância em diferentes pH na tolerância e infectividade dos fagos foram avaliados em tréplica nos isolados BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2, submetendo-os a três diferentes valores de pH (3, 8.9 e 11) em temperatura ambiente durante 18 horas. Estes foram comparados com um controle a pH 7.4 em 4 °C. No contexto deste estudo, valores de $p < 0.05$ podem ser interpretados como uma menor capacidade de tolerância a um determinado valor de pH, quando comparado ao controle. Por outro lado, valores de $p > 0.05$ indicam uma capacidade de tolerância similar ao controle.

Todos os isolados foram submetidos ao teste de normalidade e não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$) em relação ao controle, ou seja, são tolerantes aos diferentes valores de pH aos quais foram submetidos. A Figura 19 abaixo apresenta gráficos para melhor visualizar e discutir os resultados.

Figura 19 - Resultado do efeito na tolerância dos fagos nos diferentes níveis de pH testados.

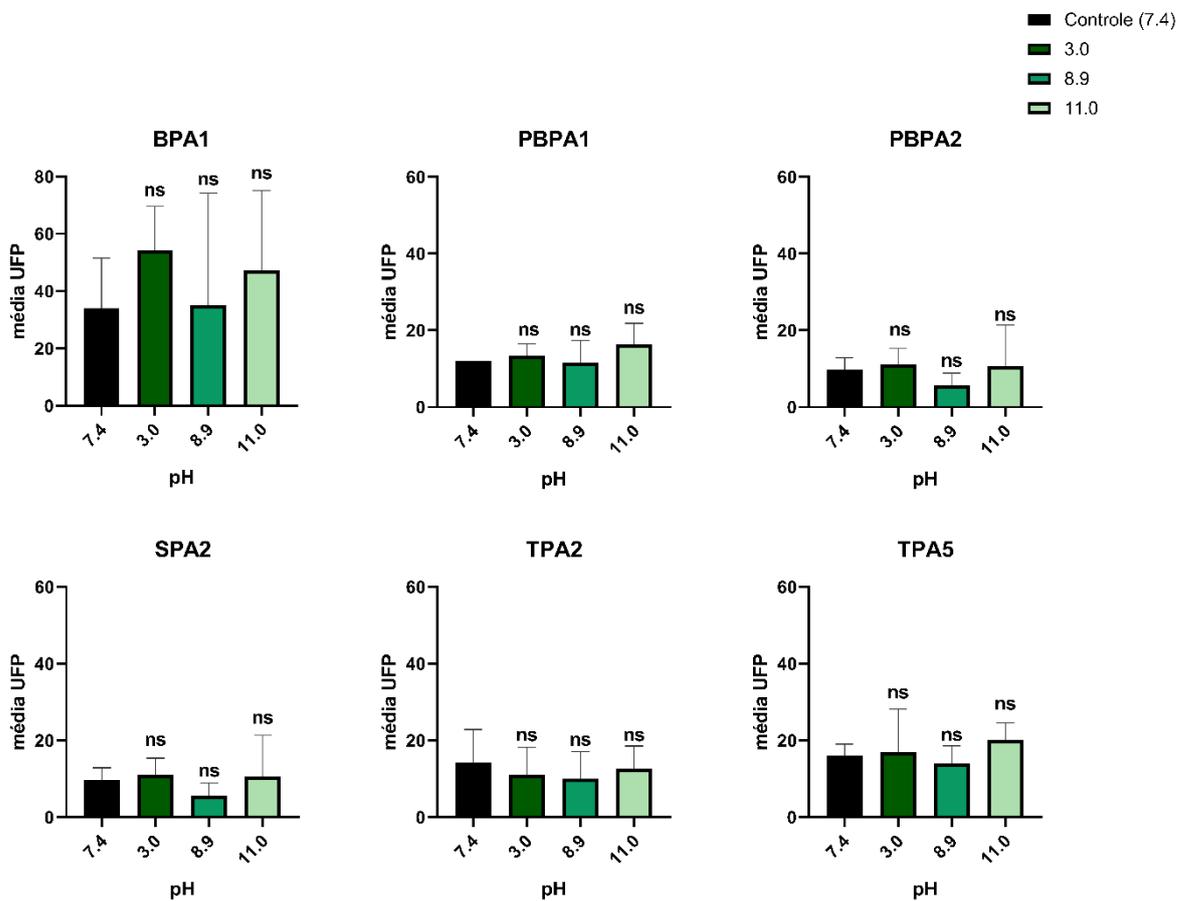


Figura superior à esquerda: Isolado BPA1; Figura superior central: Isolado PBPA1; Figura superior à direita: Isolado PBPA2; Figura inferior à esquerda: Isolado SPA2; Figura inferior central: Isolado TPA2; Figura inferior à direita: Isolado TPA5; NS: não significativa ($p > 0,5$); Barra de erro: Desvio padrão; Média UFP: Média de Unidades Formadoras de Placa de N amostral: 3 (tréplica). Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A superfície da pele saudável e íntegra normalmente apresenta um pH entre 4.2 e 5.6, uma acidez que desempenha um papel protetor contra patógenos invasores. Já as feridas crônicas podem ter níveis de pH variando entre 7.2 e 8.9, enquanto os ossos mantêm um pH na faixa de 7.0 a 7.4 (BENNISON et al., 2017; FRASSETTO et al., 2018; PERCIVAL et al., 2014). *P. aeruginosa* é produtora proteases como urease e metabólitos como alginato, o que propicia aumento do pH, estando intimamente associado com a formação e manutenção de biofilmes. Em pH mais ácido, há aumento na produção de sideróforos (pioverdina e piocianina), metabólitos secundários necessários para a captação de ferro, sinalização celular e crescimento bacteriano (HASSAN AL-FHDAWI; RABEE, 2023; HENTZER et al., 2001; MAHAJAN et al., 2021). Com base nesse conhecimento, era esperado que os isolados

apresentassem tolerância aos testes de pH 8.9. Ao examinar a Figura 19, é possível notar que, em comparação com o pH 8.9 e a condição de controle, embora sem diferenças estatisticamente significativas, a maioria dos isolados, com a exceção de TPA2, aparenta uma maior capacidade infecciosa, ou seja, uma maior média de UFP, quando expostos a ambientes de pH ácido (3.0) e alcalino (11.0).

Durante os experimentos, a variação do pH permitiu a identificação de morfologias de placas de lise diferentes daquelas previamente observadas no momento do isolamento, principalmente em relação ao tamanho, forma e presença de halo. Ou seja, em um contexto de experimento de isolamento, elas seriam consideradas diferentes isolados. Essa mudança observada, sugere que a alteração no pH pode ter conduzido à dissociação dos virions previamente agregados em aglomerados virais, que provavelmente cooperavam na formação de placas de lise únicas/UFP. Posteriormente, os resultados obtidos por meio de MET demonstraram a possível presença de coleções multifágicas em todas as amostras, com exceção de PBPA1, ou seja, fagos pertencentes a diferentes grupos ou famílias.

A agregação de fagos é um fenômeno comum em ambientes naturais e está ganhando destaque como uma abordagem promissora na terapia com bacteriófagos, uma vez que os fagos não atuam de forma isolada e dissociada na natureza (CHAN; ABEDON, 2012). O fenômeno de agregação é influenciado pela concentração de íons de hidrogênio, devido ao ponto isoelétrico dos fagos, podendo também ser influenciado pela temperatura e presença de sais que modificam a força iônica e conseqüentemente, a interação entre as partículas virais (JOŃCZYK et al., 2011). Em estado agregado, os bacteriófagos apresentam uma capacidade de infecção reduzida, porém aumentam sua resistência aos fatores ambientais. Em pH mais ácido, o fenômeno de agregação tende a aumentar, porém, de acordo com o aumento do pH, os fagos se dispersam, retomando uma maior capacidade infecciosa (LANGLET; GABORIAUD; GANTZER, 2007; SZERMER-OLEARNIK et al., 2017). Essa dinâmica de agregação e dispersão é um meio de sinalização entre fagos e bactérias e pode ser considerado um aspecto importante no desenvolvimento de terapias que utilizem fagos para o controle de infecções (LY-CHATAIN, 2014).

Nesse contexto, embora não tenha sido observada uma diferença significativa entre os resultados do grupo controle e dos tratamentos na análise estatística, destaca-se que o crescimento dos fagos é uma medida fundamental da aptidão darwiniana, que é diretamente influenciada pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições de crescimento (ABEDON; YIN, 2009c; JOŃCZYK et al., 2011). Essas variáveis podem alterar significativamente a dinâmica e a seleção de fagos dentro de um hospedeiro.

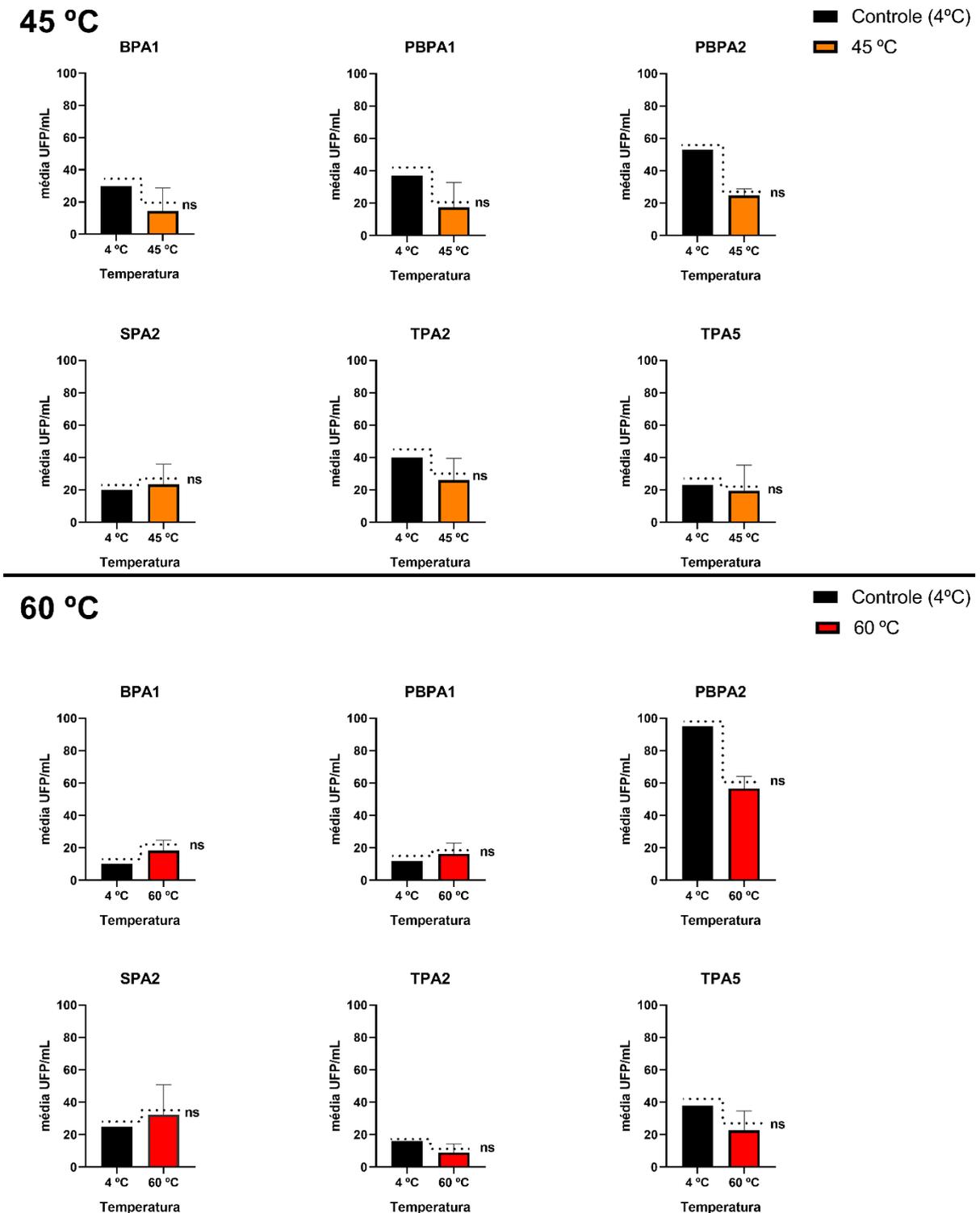
Dessa forma, sugere-se que as aparentes adaptações a diferentes níveis de pH podem estar associadas a condições intrínsecas e semelhantes às do tecido matricial de origem de cada isolado, assim como ao microambiente circundante e às interações com *P. aeruginosa*. Em outras palavras, a capacidade de replicação dos fagos em determinados níveis de pH pode refletir as adaptações evolutivas pré-existentes das linhagens de fagos em relação às suas condições naturais. Portanto, é crucial considerar a complexidade dos fatores ambientais e biológicos que podem influenciar a capacidade dos fagos de se desenvolver e serem pré-selecionados em diferentes níveis de pH, de acordo com sua matriz de origem e com a bactéria hospedeira.

Encontrar um pH ótimo para a estabilidade da infecciosidade dos fagos é um fator crucial na produção de tratamentos baseados em fagos. Esses resultados são relevantes, uma vez que um dos maiores problemas enfrentados na terapia fágica é a tolerância dos fagos frente a ambientes ácidos como o gastrointestinal quando estes são aplicados em tratamento oral (SABOURI GHANNAD; MOHAMMADI, 2012). Não obstante, a resistência e capacidade infectiva dos isolados frente a pH alcalino pode servir de interesse clínico em relação à formação de biofilmes, principalmente relacionado ao tratamento de feridas crônicas e infecções de cepas de *P.aeruginosa* com fenótipo mucoide encontrado em pacientes com fibrose cística (DIGGLE; WHITELEY, 2020).

6.3.2 Tolerância temperatura

Os efeitos de tolerância a temperatura dos isolados BPA1, PBPA1, PBPA2, SPA2, TPA2 e TPA5 foram testados em trélicas nas temperaturas 45 °C e 60 °C por 60 minutos em comparação com o controle em 4 °C. Todos os isolados passaram no teste de normalidade e não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) nos grupos tratados em relação ao controle. Desta forma, os dados sugerem que os 6 isolados testados são tolerantes a temperaturas de 45 °C e 60 °C por pelo menos 1 hora. A Figura 20 abaixo apresenta gráficos para melhor visualizar e discutir os resultados.

Figura 20 - Resultado do efeito na tolerância dos fagos em 45 °C e 60 °C comparado aos seus respectivos controles.



No quadro superior referente à 45 °C: Figura superior à esquerda: Isolado BPA1; Figura superior central: Isolado PBPA1; Figura superior à direita: Isolado PBPA2; Figura inferior à esquerda: Isolado SPA2. Figura inferior central: Isolado TPA2. Figura inferior à direita: Isolado TPA5. No quadro inferior referente à 60 °C: Figura superior à esquerda: Isolado BPA1; Figura superior central: Isolado PBPA1; Figura superior à direita: Isolado

PBPA2; Figura inferior à esquerda: Isolado SPA2. Figura inferior central: Isolado TPA2. Figura inferior à direita: Isolado TPA5; NS: não significativo ($p>0,05$); Barra de erro: Desvio padrão; Média UFP: Média de Unidade Formadora de Placas de N amostral: 3 (tréplica). Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A ligação do fago ao hospedeiro é mediada por interações altamente específicas entre as proteínas do fago e moléculas ou estruturas presentes na superfície bacteriana. Nesse sentido, a temperatura exerce forte influência na sobrevivência, estabilidade e virulência dos fagos, uma vez que tanto a produção quanto a conformação das proteínas são reativas a temperatura. Essa variável é considerada importante, principalmente no que se refere ao armazenamento, transporte e estabilidade dos fagos (SILLANKORVA et al., 2004; YOUNG; WANG; ROOF, 2000).

O leito de uma ferida crônica possui uma temperatura média dentro da faixa de 30,2-33,0 °C. Em uma ferida crônica, o aumento da temperatura local é uma das principais características na presença de infecção e inflamação (GETHIN et al., 2021). As temperaturas de 45 °C e 60 °C foram escolhidas como extrapolação dos dados para fundamentar a tolerância dos isolados nas condições de feridas crônicas e em processos para estabilização dos fagos a partir da secagem por pulverização e eletrofiação, que utilizam temperaturas elevadas.

A liofilização tem sido amplamente aplicada a vírus não fágicos e, mais recentemente, tem suscitado um interesse crescente para sua utilização na estabilização de bacteriófagos. Nesse processo, o objetivo é a secagem por congelamento e posterior sublimação da água do material com o aumento gradual da temperatura (NAIL et al., 2002; ROSNER; CLARK, 2021). Porém, o processo de secagem por pulverização é consideravelmente mais barato do que a liofilização e possui as mesmas vantagens em relação ao armazenamento, transporte e estabilidade (ROSNER; CLARK, 2021). A secagem por pulverização possibilita a conversão de um líquido em partículas secas por meio do processo de evaporação. O produto obtido por meio do processo de secagem por pulverização é um pó seco que, semelhante ao produto resultante da liofilização, pode ser utilizado em cremes, comprimidos e formulações inaláveis. No processo de secagem por pulverização, as temperaturas utilizadas chegam a 60 °C e podem prejudicar as partículas de fagos (MALIK, 2021).

Por último, a eletrofiação é utilizada no processo de produção de nano fibras e as temperaturas podem chegar a 55 °C (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). A adição de bacteriófagos ao polímero líquido antes do processo de eletrofiação, resulta em bacteriófagos encapsulados dentro das nano fibras, sendo aplicáveis tanto a polímeros solúveis em água

quanto a polímeros insolúveis (ROSNER; CLARK, 2021; SALALHA et al., 2006). As temperaturas mais elevadas inerentes a esses processos podem representar um desafio para prevenir a perda significativa da titulação viral de certos bacteriófagos (JONCZYK et al., 2011; ROSNER; CLARK, 2021).

Além da tolerância a 45 °C e 60 °C por 1 hora, os isolados BPA1, SPA2 e PBPA1 tiveram uma média de UFP maior em 60 °C do que no controle de 4 °C, evidenciando serem bons candidatos para futuras pesquisas visando avaliação para produtos fágicos.

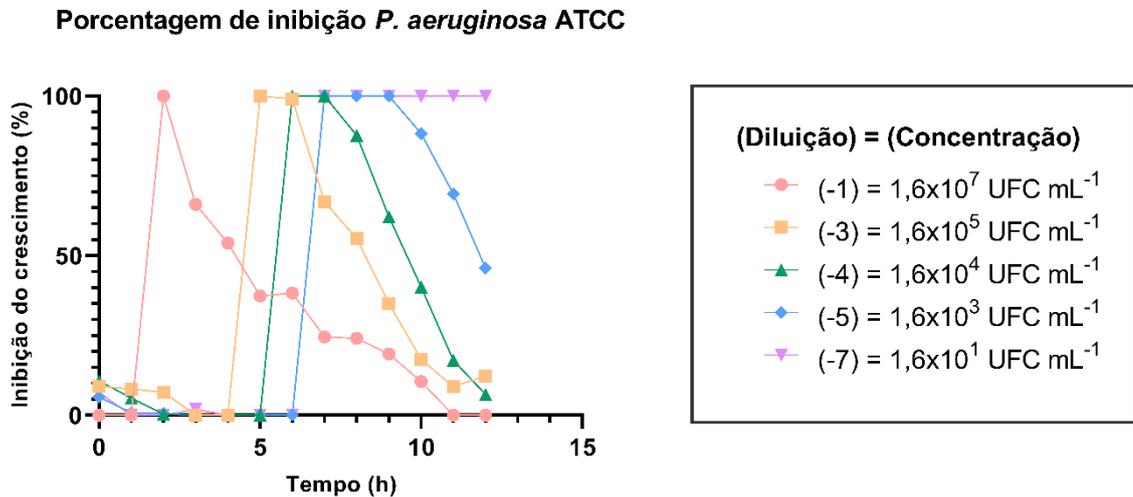
Vale ressaltar que a temperatura média do corpo humano é de 36-37 °C e a incubação para avaliação da atividade lítica dos fagos durante as passagens ocorreu nessa mesma temperatura por pelo menos 12 horas, demonstrando não somente tolerância, mas aumento do título viral durante as passagens para isolamento, ou seja, aumento da capacidade infecciosa. Concomitantemente, a situação destacada também pode estar relacionada com o crescimento ótimo de *P. aeruginosa* em 37 °C. Além disso, as amostras passaram cinco meses armazenadas em 4 °C no decorrer dos experimentos sem perder titulação. O único isolado que perdeu titulação após a última passagem foi TPA5 e a razão dessa ocorrência pode ter sido sua propagação em *P. aeruginosa* ATCC, evidenciando maior especificidade de fago e hospedeiro para a cepa clínica. Nesse sentido e considerando a ecologia dos fagos, fagos isolados de amostras bacteriológicas provindas de feridas crônicas têm aparente vantagem ao serem bioprospectadas em condições semelhantes àquelas de sua origem (ADNAN et al., 2020; CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004).

6.4 TESTE DE REDUÇÃO BACTERIANA MEDIADA POR FAGOS *IN VITRO*

O fago PBPA1 em concentração fixa de 3×10^{10} UFP mL⁻¹ demonstrou atividade lítica e alcançou 100% de inibição do crescimento bacteriano em até 7 horas de tratamento em todas as concentrações bacterianas testadas na cepa *P. aeruginosa* ATCC quando comparado com os respectivos controles (Figura 21 - A). O mesmo tratamento realizado na cepa *P. aeruginosa* clínica foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em 100% no período de até 5 horas em quatro das concentrações bacterianas testadas, com exceção da concentração $1,9 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ que atingiu a inibição de 88,5% na primeira hora e 56,7% entre a terceira e a quarta hora (Figura 21 - B).

Figura 21 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano realizado pelo fago PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de *P. aeruginosa* ATCC e *P. aeruginosa* clínica.

A



B

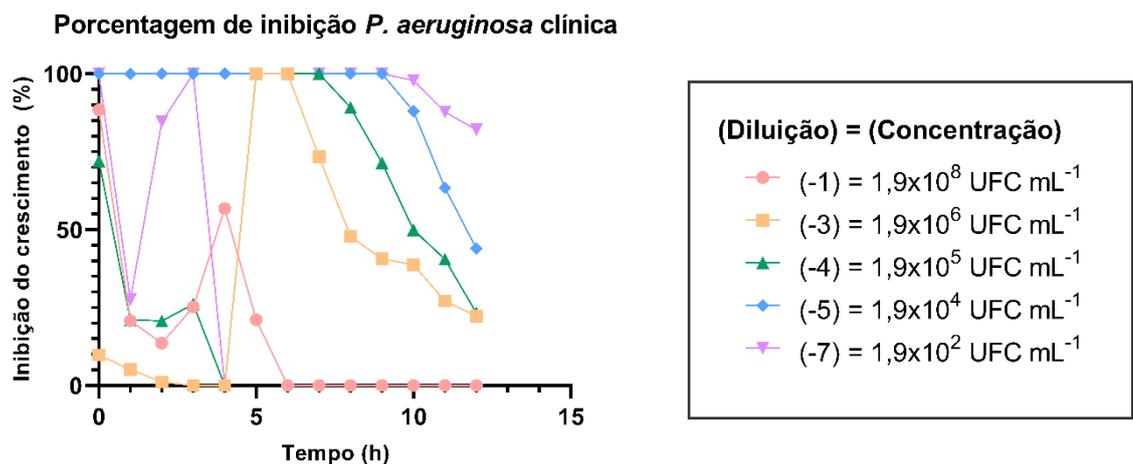


Figura A: Porcentagem de inibição em diferentes concentrações bacterianas (quadro à direita, superior) realizada pelo tratamento com PBPA1 em concentração fixa de 3×10^{10} UFP mL⁻¹; Figura B: Porcentagem de inibição utilizando o mesmo tratamento, porém em diferentes concentrações bacterianas na cepa clínica (quadro à direita, inferior). Nos quadros estão apresentados os fatores de diluição e as respectivas concentrações. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

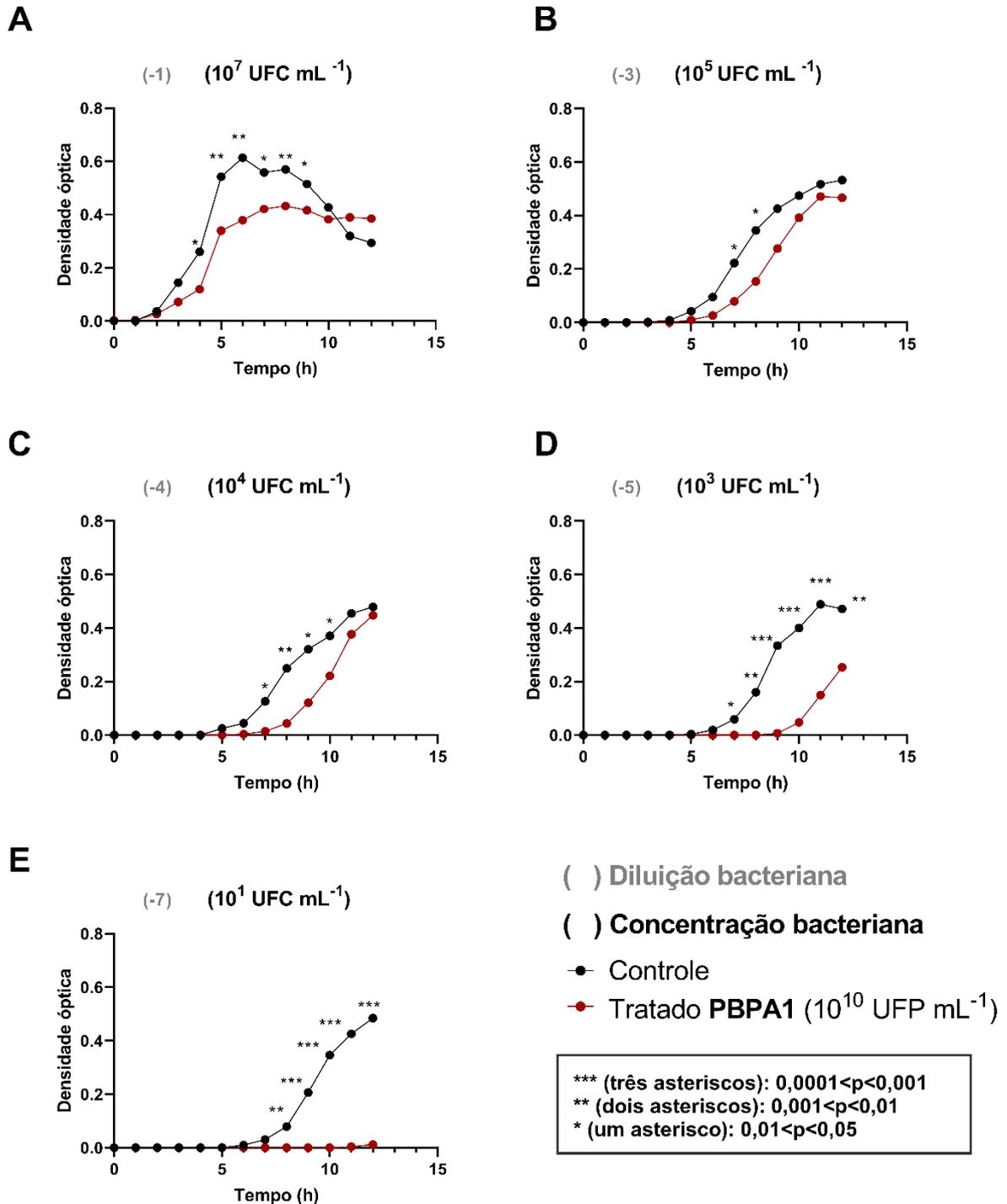
O que diferenciou no processo de inibição entre as concentrações no tratamento de *P. aeruginosa* ATCC, foi que quanto menor a concentração bacteriana inicial, mais tarde o pico da atividade lítica e posterior inibição bacteriana ocorreu. A dinâmica entre fagos e bactérias é intuitiva pelo ciclo de replicação desses organismos, em que uma taxa de adsorção reduzida ocorre para possibilitar que a bactéria tenha tempo para se replicar e novos ciclos líticos ocorram (SIRINGAN et al., 2014). Essa dinâmica de inibição pode ser bem observada na concentração $1,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ (Figura 21 - A), onde 100% da inibição bacteriana é atingida após apenas 2 horas de tratamento, visto que a quantidade de células disponíveis para infecção estava elevada desde a primeira hora do ensaio.

O tratamento com PBPA1 em *P. aeruginosa* ATCC na concentração $1,6 \times 10^1$ UFC mL⁻¹ (Figura 21 - A) inibiu efetivamente o crescimento bacteriano após 7 horas, sendo mantido até o final do ensaio, em 12 horas. Já em baixa concentração bacteriana de *P. aeruginosa* clínica, $1,9 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ (Figura 21 - B), 100% da inibição ocorre após 3 horas de tratamento, caindo e retornando a 100% após 5 horas de tratamento. Sugere-se que o fago foi responsivo aos fatores de resistência das células resquiciais e conseguiu manter a virulência, inibindo efetivamente o crescimento bacteriano por 5 horas após o aumento de atividade lítica e inibição. Além disso, na concentração $1,9 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ de *P. aeruginosa* clínica (Figura 21 - B), pode-se observar a capacidade bacteriostática de PBPA1 ao inibir o crescimento bacteriano por 9 horas desde o início do ensaio.

Durante o ciclo de infecção, os bacteriófagos virulentos tendem a se replicar até o surgimento de hospedeiros mutantes resistentes ao fago (HASAN; AHN, 2022; OECHSLIN, 2018; SERWER et al., 2009). Desse modo, compreende-se que ao aferir a densidade óptica bacteriana, o valor de 100% representado nos gráficos de inibição é baseado na diferença entre o controle e o tratamento e, por essa razão, é passível a existência de células resquiciais resistentes que retomam o crescimento bacteriano.

Para observar e discutir as diferenças significativas entre controle e tratamento de *P. aeruginosa* ATCC e clínica *versus* o tratamento com o fago PBPA1 em concentração fixa de 3×10^{10} UFP mL⁻¹, as Figuras 22 e 23 foram produzidas.

Figura 22 – Crescimento bacteriano do controle *versus* tratamento realizado pelo fago PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de *P. aeruginosa* (ATCC N°27853) representado em densidade óptica.



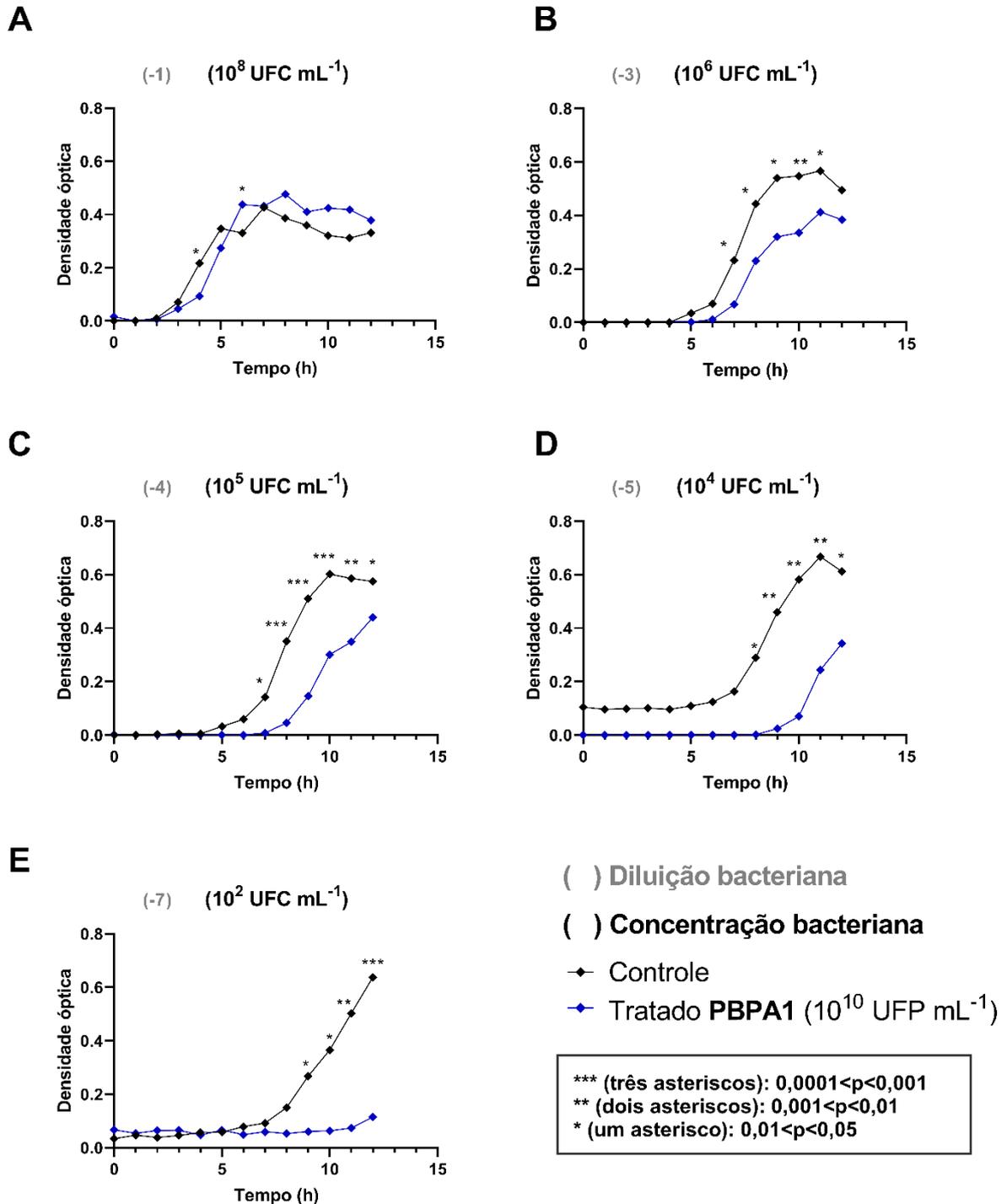
Gráficos (A, B, C, D, E) com o comparativo da curva de crescimento por densidade óptica de diferentes concentrações de *P. aeruginosa* (ATCC N°27853) e do tratamento pelo fago PBPA1 em concentração fixa 10^{10} UFP mL⁻¹ no decorrer de 12 horas; Canto inferior à direita: Legenda relacionando fator de diluição e concentração bacteriana dispostos em cada gráfico e valor de significância (p) à quantidade de asteriscos utilizados. Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Considerando o experimento de redução bacteriana analisado por densidade óptica, o fago PBPA1 em concentração fixa de 10^{10} UFP mL⁻¹ foi utilizado no tratamento de *P.aeruginosa* ATCC com concentração bacteriana inicial de 10^7 UFC mL⁻¹ (DO inicial de 0,04824 a 600 nm) na diluição (-1), representando um índice de multiplicidade viral (MOI) inicial de 1000. Observa-se pela Figura 22, que entre 4 e 8 horas de ensaio, todas as concentrações bacterianas apresentaram diferença significativa (mínimo de $p < 0,05$) entre o controle e o tratamento.

A diferença entre a densidade bacteriana do controle e do tratamento aumenta significativamente após 7 horas de tratamento nas concentrações 10^5 UFC mL⁻¹ ($p < 0,05$) (Figura 22 - B), 10^4 UFC mL⁻¹ ($p < 0,01$) (Figura 22 - C) e 10^3 UFC mL⁻¹ ($p < 0,001$) (Figura 22 - D). Sugerindo assim, que 7 horas aparenta ser um momento determinante na dinâmica de interação entre o fago PBPA1 e *P. aeruginosa* ATCC nessas concentrações bacterianas. O aumento da diferença significativa de $p < 0,05$ até $p < 0,001$ observado na concentração 10^3 UFC mL⁻¹ sugere o potencial bacteriostático de PBPA1 nessa concentração bacteriana (Figura 22- D).

Por último, em baixa concentração bacteriana 10^1 UFC/mL⁻¹ há diferença significativa ($p < 0,01$) entre o controle e o tratamento com PBPA1 a partir da nona hora de tratamento, aumentando essa significância ($p < 0,001$) até o final das 12 horas de ensaio (Figura 22 - E).

Figura 23 - Crescimento bacteriano do controle *versus* tratamento realizado pelo isolado PBPA1 em diferentes concentrações bacterianas de *P. aeruginosa* clínica representado em densidade óptica



Gráficos (A, B, C, D, E) com o comparativo da curva de crescimento por densidade óptica de diferentes concentrações de *P. aeruginosa* clínica e do tratamento pelo fago PBPA1 em concentração fixa 10^{10} UFP mL⁻¹ no decorrer de 12 horas. Canto inferior a direita: Legenda relacionando fator de diluição e concentração bacteriana dispostos em cada gráfico e valor de significância (p) à quantidade de asteriscos utilizados. Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Considerando o experimento de redução bacteriana analisado através da densidade óptica, o fago PBPA1 em concentração fixa de 10^{10} UFP mL⁻¹ foi utilizado no tratamento de *P. aeruginosa* clínica com concentração bacteriana inicial de 10^8 UFC mL⁻¹ (DO inicial de 0,06274 a 600 nm) na diluição (-1) representando um MOI inicial de 100. Observa-se pela Figura 23, que entre 4 e 9 horas de ensaio, todas as concentrações bacterianas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e o tratamento.

Na concentração 10^4 UFC mL⁻¹ a densidade óptica do tratamento permanece estática até 7 horas de tratamento, em que há posterior diferença significativa ($p < 0,05$) até o final do ensaio, sugerindo o potencial bacteriostático de PBPA1 nessa concentração bacteriana (Figura 23 - D).

Por último, em baixa concentração bacteriana 10^2 UFC mL⁻¹ há diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e o tratamento com PBPA1 a partir da nona hora de tratamento, aumentando essa significância ($p < 0,001$) até o final das 12 horas de ensaio (Figura 23 - E).

O comportamento observado no uso do PBPA1 no tratamento de *P. aeruginosa* clínica também se manifesta na cepa *P. aeruginosa* ATCC. Essencialmente, durante um período de quatro a nove horas de tratamento, uma elevação gradual na densidade bacteriana se manifesta. Este aumento sugere uma redução gradual da atividade lítica dos bacteriófagos, permitindo o recrescimento bacteriano para posterior controle realizado pelos fagos, se apresentando assim nas diferenças significativas entre controle e tratamentos. De fato, o fenômeno de recrescimento também é observado nos métodos convencionais de tratamento com antibióticos, muitas vezes requerendo doses subsequentes desses agentes. Da mesma forma, altas dosagens e administração subsequente de bacteriófagos emerge como uma estratégia para sustentar uma atividade lítica elevada (AHMADI et al., 2016; JAULT et al., 2019).

Assim, a dinâmica de interação entre o isolado PBPA1 e *P. aeruginosa*, muda conforme a cepa e a concentração bacteriana, entretanto, padrões alta de atividade lítica de acordo com o tempo de crescimento bacteriano pode ser observados em todos os tratamentos. Além de PBPA1 inibir o crescimento bacteriano em até 100% a partir de um MOI de 1000, ele é capaz de inibir 88,5% em um MOI de 100 em apenas uma hora de tratamento de *P. aeruginosa* clínica.

Não obstante, sugere-se que a especificidade entre fago e hospedeiro, a quantidade de células disponíveis para infecção e os fatores de resistência que a bactéria adquire são importantes mecanismos que interferem na dinâmica de inibição no decorrer do tempo. MOIs altos como os utilizados no tratamento não devem ser uma preocupação, uma vez que o mais

importante a ser relatado em uma aplicação é a titulação dos fagos utilizados e seu respectivo volume. Entre outras razões, apenas quando uma eficiência de infecção bacteriana consistente for estabelecida para um protocolo específico de introdução de fagos, em condições estritamente controladas, uma proporção de MOI, devidamente qualificada, poderá ser validamente utilizada para descrever a dosagem de fagos (ABEDON, 2016, 2022).

Além disso, as investigações sobre as propriedades antibacterianas dos bacteriófagos frequentemente se dividem em dois enfoques: replicação ativa e replicação inativa. Na replicação ativa, o número de bacteriófagos é inferior ao de bactérias, no entanto, eles se aderem às bactérias e se replicam de forma eficaz. Por outro lado, na replicação inativa, a quantidade de bacteriófagos primários excede a de bactérias, resultando na infecção e lise de todas as bactérias pelos bacteriófagos primários (SABOURI GHANNAD; MOHAMMADI, 2012; WAGNER; WALDOR, 2002). Assim, a replicação inativa explica os picos de atividade lítica que ocorrem no decorrer do experimento juntamente com o ciclo de replicação dessas entidades virais e os mecanismos de resistência adquiridos por células resquiciais.

Apenas uma pequena quantidade de bacteriófagos pode proliferar em uma cultura bacteriana e inibir seu crescimento. Contudo, ao eliminar a bactéria hospedeira, o número de bacteriófagos infecciosos diminui (OECHSLIN, 2018; SABOURI GHANNAD; MOHAMMADI, 2012). A reintrodução de bactérias eleva a população de bacteriófagos e assim sucessivamente. Nessa perspectiva, sugere-se que a partir de um MOI de 1000, a quantidade de fagos para cada bactéria não foi necessariamente o principal fator de influência na dinâmica de interação, mas sim a quantidade de bactérias disponíveis para a possibilidade de replicação dos bacteriófagos.

7 CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e analisar a capacidade lítica de fagos infecciosos de *P.aeruginosa* isolados a partir de cultivos bacteriológicos de feridas crônicas humanas. Como resultado, foram obtidos, nomeados e titulados 19 isolados fágicos capazes de infectar *P. aeruginosa* clínica, dos quais 6 (BPA1, PBPA1, PBPA2, TPA2, TPA5 e SPA2) também foram capazes de infectar *P. aeruginosa* ATCC N°27853. Estes 6 isolados foram pré-selecionados para os testes de acordo com a análise do perfil lítico por placas de lise, sua elevada titulação viral e origem matricial.

A análise morfológica mostrou diversidade taxonômica entre os fagos dentro das antigas famílias dos *Caudovirales*. Além disso, os resultados dos testes de tolerância demonstram que estes 6 isolados são tolerantes a temperaturas de 45 °C e 60 °C por pelo menos 1 hora e a níveis de pH (3,0 – 8,9 – 11,0) por até 18 horas. O isolado PBPA1, inibiu o crescimento bacteriano em até 100% das cepas de *P. aeruginosa* testadas entre 4 e 9 horas de ensaio, apresentando também potencial bacteriostático. A hipótese se mostrou correta com base nos resultados obtidos, fundamentando futuros estudos desses isolados visando a aplicação biotecnológica no controle de *P. aeruginosa*.

8 PERSPECTIVAS

Este estudo explorou a importância de buscar novas abordagens terapêuticas para enfrentar o desafio crescente das bactérias resistentes a múltiplos medicamentos, uma ameaça em constante ascensão à saúde global. Até o presente momento, o isolamento de bacteriófagos por parte da comunidade científica tem sido focalizado em matrizes como esgoto, principalmente próximos aos hospitais, porém a partir de culturas bacteriológicas obtidas de feridas crônicas humanas, foi revelada a presença de fagos capazes de infectar e controlar a *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, abrindo perspectivas promissoras.

A identificação de isolados com características específicas, sobretudo no que tange à virulência, aponta para possíveis candidatos que merecem ser explorados em futuras pesquisas e aplicações biotecnológicas. A sugestão de que alguns desses isolados possam possuir agregados fágicos, resultando em diversidade taxonômica, impele a possibilidade de que o sucesso alcançado neste estudo é, em grande parte, devido à sinergia entre diferentes partículas virais, bem como às suas aptidões adaptativas, que podem estar intrinsecamente relacionadas às suas origens matriciais.

Além disso, a tolerância demonstrada por esses isolados em face de variações de pH e temperatura indica sua viabilidade em diferentes condições clínicas e processos utilizados na produção de fármacos. É crucial notar que os testes conduzidos não apenas avaliaram a mera “sobrevivência” dos fagos, mas também a capacidade de infectar após terem sido submetidos a condições adversas. Tolerância representa a capacidade de sobrevivência, enquanto infectividade é o indicador de sua eficácia funcional.

Considerando o papel eficaz da PBPA1 na inibição do crescimento bacteriano, foi possível observar padrões de tempo de maior atividade lítica pela dinâmica de interação entre o fago e as duas diferentes cepas de *P. aeruginosa* testadas. Aprofundar a análise dessa dinâmica pode ser fundamental para embasar estudos voltados à aplicação de fagos em materiais como fibras e hidrogéis. Esses materiais representam uma estratégia promissora para incorporar fagos em uma matriz tridimensional, permitindo uma liberação contínua dos fagos no local de ação. Nanopartículas e fibras de biopolímero eletrofiadas podem fornecer o benefício de liberação controlada. A escolha dos materiais para a produção desempenha um papel fundamental nesse processo, uma vez que permite um controle preciso sobre a liberação das partículas fágicas de modo responsivo. Portanto, sugere-se que a seleção de materiais responsivos ao aumento do pH em feridas ou à liberação de metabólitos específicos,

discutidos no contexto deste estudo, seja uma abordagem viável no campo da biotecnologia para a aplicação dos fagos isolados, com potenciais benefícios clínicos.

Conclusivamente, este estudo empreendeu uma discussão abrangente sobre os fatores que influenciam a dinâmica de interação entre fagos e bactérias. Os resultados alcançados neste estudo não só enriquecem nosso entendimento, mas também proporcionam discussões valiosas para pesquisas contínuas e desenvolvimento no campo da terapia com bacteriófagos. Este progresso detém o potencial de repercutir positivamente na saúde pública e na qualidade de vida dos pacientes que enfrentam infecções por *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos, principalmente no contexto de feridas crônicas.

REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. Look who's talking: T-even phage lysis inhibition, the granddaddy of virus-virus intercellular communication research. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 951, 16 out. 2019.
- ABEDON, S. T. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). **Bacteriophage**, v. 6, n. 3, p. e1220348, 2 jul. 2016.
- ABEDON, S. T. Detection of bacteriophages: Phage plaques. Em: **Bacteriophages**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1–32.
- ABEDON, S. T. Further Considerations on how to improve phage therapy experimentation, practice, and reporting: pharmacodynamics perspectives. **PHAGE**, v. 3, n. 2, p. 98–111, 1 jun. 2022.
- ABEDON, S. T.; HYMAN, P.; THOMAS, C. Experimental examination of bacteriophage-latent-period evolution as a response to bacterial availability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7499–7506, dez. 2003.
- ABEDON, S. T.; YIN, J. Bacteriophage plaques: Theory and analysis. Em: [s.l: s.n.]. p. 161–174, 2009.
- ACKERMANN, H.-W. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. Em: [s.l: s.n.]. p. 135–201, 1998.
- ACKERMANN, H.-W. Phage classification and characterization. Em: [s.l: s.n.]. p. 127–140, 2009.
- ACKERMANN, H.-W. Basic phage electron microscopy. Em: [s.l: s.n.]. p. 113–126, 2009.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. **Bacteriophages**, 1959.
- ADNAN, M. et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. **Biologicals**, v. 63, p. 89–96, jan. 2020.
- ADRIAENSSENS, E.; BRISTER, J. R. How to name and classify your phage: An informal guide. **Viruses**, v. 9, n. 4, p. 70, 3 abr. 2017.
- AHMADI, M. et al. Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing salmonella enterica serovar enteritidis shedding in quail. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 9 ago. 2016.
- AKREMI, I. et al. Isolation and characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages isolated from sewage samples from tunisia. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2339, 25 out. 2022.
- ALJGHAMI, M. E.; SABOOR, S.; AMINI-NIK, S. Emerging innovative wound dressings. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 47, n. 3, p. 659–675, 12 mar. 2019.

- AMEH, E. M. et al. Lysis Performance of bacteriophages with different plaque sizes and comparison of lysis kinetics after simultaneous and sequential phage addition. **PHAGE**, v. 1, n. 3, p. 149–157, 1 set. 2020.
- BASSETTI, M. et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1464–1475, 21 out. 2017.
- BENNISON, L. et al. The pH of wounds during healing and infection: A descriptive literature review. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association**, v. 25, p. 63, 2017.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, maio 2010.
- BONACHELA, J. A.; LEVIN, S. A. Evolutionary comparison between viral lysis rate and latent period. **Journal of Theoretical Biology**, v. 345, p. 32–42, mar. 2014.
- BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244–269, abr. 2001.
- BREYNE, K. et al. Efficacy and Safety of a Bovine-Associated Staphylococcus aureus Phage Cocktail in a Murine Model of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 28 nov. 2017.
- BROWN, T. et al. Semi-Solid and solid dosage forms for the delivery of phage therapy to epithelia. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 26, 26 fev. 2018.
- BROWN, T. L. et al. Bacteriophage formulated into a range of semisolid and solid dosage forms maintain lytic capacity against isolated cutaneous and opportunistic oral bacteria. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 244–253, 20 fev. 2017.
- BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 15 mar. 2018.
- C REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- CAIRNS, B. J. et al. Quantitative models of in vitro bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 1, p. e1000253, 2 jan. 2009.
- CAMPBELL, A. The future of bacteriophage biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 6, p. 471–477, jun. 2003.
- CANCHY, L. et al. Wound healing and microbiome, an unexpected relationship. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 37, n. S3, p. 7–15, 10 mar. 2023.
- CHAN, B. K.; ABEDON, S. T. Phage therapy pharmacology. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–23, 2012.
- CHANG, R. Y. K. et al. Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections. **Translational Research**, v. 220, p. 153–166, jun. 2020.

- CHEN, Q. et al. Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1425, 7 jul. 2022.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S. et al. Phage-host interaction: an ecological perspective. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 12, p. 3677–3686, 15 jun. 2004.
- CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic wound biofilms: Pathogenesis and potential therapies. **Laboratory Medicine**, v. 46, n. 4, p. 277–284, 1 nov. 2015.
- COGEN, A. L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skin microbiota: a source of disease or defence? **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 3, p. 442–455, 11 fev. 2008.
- CONRAD, J. C. et al. Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 7, p. 1608–1616, abr. 2011.
- COQUE, T. M. et al. Antimicrobial resistance in the global health network: Known unknowns and challenges for efficient responses in the 21st century. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1050, 17 abr. 2023.
- DABROWSKA, K. et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 7–13, jan. 2005.
- DĄBROWSKA, K.; ABEDON, S. T. Pharmacologically aware phage therapy: Pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 4, 20 nov. 2019.
- DAVIES, C. E. et al. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: Chronic wounds reevaluated. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 5, p. 332–340, set. 2001.
- DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 17 jun. 2020.
- DERESINSKI, S. Bacteriophage therapy: Exploiting smaller fleas. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 8, p. 1096–1101, 15 abr. 2009.
- DESHPANDE, L. In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum β -lactamase producing strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, n. 4, p. 271–275, ago. 2000.
- DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 30–33, 1 jan. 2020.
- DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics, and phylogeny. **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125–138, mar. 2020.
- DISSEMOND, J. Praktische Konsequenzen durch den nachweis von MRSA in chronischen Wunden. **Der Hautarzt**, v. 58, n. 11, p. 952–958, 11 nov. 2007.
- DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, abr. 2002.

- EL-SHIBINY, A.; EL-SAHHAR, S. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 865–879, nov. 2017.
- ESTEVEZ, N. C.; SCHARF, B. E. Flagellotropic bacteriophages: Opportunities and challenges for antimicrobial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7084, 25 jun. 2022.
- FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948–958, dez. 2005.
- FRASSETTO, L. et al. Acid balance, dietary acid load, and bone effects—A controversial subject. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 517, 21 abr. 2018.
- FRESCHI, L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 109–120, 1 jan. 2019.
- GALLET, R.; KANNOLY, S.; WANG, I.-N. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 181, 2011.
- GALLET, R.; SHAO, Y.; WANG, I.-N. High adsorption rate is detrimental to bacteriophage fitness in a biofilm-like environment. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 241, 2009.
- GARCIA, T. DE F. et al. Microbiological profile of leg ulcer infections: review study. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 74, n. 3, 2021.
- GETHIN, G. et al. What is the “normal” wound bed temperature? A scoping review and new hypothesis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 29, n. 5, p. 843–847, 22 set. 2021.
- GJØDSBØL, K. et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **International Wound Journal**, v. 3, n. 3, p. 225–231, set. 2006.
- GLONTI, T.; PIRNAY, J.-P. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1490, 7 jul. 2022.
- GONZÁLEZ-MORA, A. et al. Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 504, 4 set. 2020.
- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 16 abr. 2011.
- GUZMÁN-SOTO, I. et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. **iScience**, v. 24, n. 5, p. 102443, maio 2021.
- HAMED, Z. O.; AWNI, A. A.; ABDULAMIR, A. S. Novel recombinant endolysin ointment with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds and burns. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 4, p. 104, 4 abr. 2023.
- HANLON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 118–128, ago. 2007.

HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 38–58, jul. 2018.

HASAN, M.; AHN, J. Evolutionary dynamics between phages and bacteria as a possible approach for designing effective phage therapies against antibiotic-resistant bacteria. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 915, 7 jul. 2022.

HASSAN AL-FHDAWI, A. A.; RABEE, A. M. Influence pH on virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* analyzed by RT-PCR method. **Arab Gulf Journal of Scientific Research**, 23 mar. 2023.

HENTZER, M. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm Structure and Function. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5395–5401, 15 set. 2001.

HERELLE, F. D'; SMITH, G. H. **The bacteriophage, its role in immunity**. Baltimore: Williams & Wilkins company, 1922.

HOBBS, Z.; ABEDON, S. T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'lytic or lysogenic'. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 7, p. fnw047, abr. 2016.

HOWARTH, S.; DEDMAN, M. D. Pigmentation variants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 2, p. 273–278, ago. 1964.

HUH, H. et al. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 145, p. 4–17, maio 2019.

HUSSAIN, W. et al. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 177, p. 112973, abr. 2021.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10ª edição. Bruxelas, Bélgica: 2021. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 28 ago. 2023.

JAMES, G. A. et al. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p. 37–44, jan. 2008.

JARONI, D. et al. Effectiveness of bacteriophages against biofilm-forming shiga-toxigenic *Escherichia coli in vitro* and on food-contact surfaces. **Foods**, v. 12, n. 14, p. 2787, 22 jul. 2023.

JAULT, P. et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 35–45, jan. 2019.

JENSEN, P. Ø. et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 1329–1338, 1 maio 2007.

JEON, J.; YONG, D. Two Novel Bacteriophages improve survival in *Galleria mellonella* infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 9, maio 2019.

JONCZYK, E. et al. The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 3, p. 191–200, 31 maio 2011.

JU, Z.; SUN, W. Drug delivery vectors based on filamentous bacteriophages and phage-mimetic nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1898–1908, 1 jan. 2017.

JURCZAK-KUREK, A. et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34338, 4 out. 2016.

KASMAN, L. M.; PORTER, L. D. **Bacteriophages**, 2023.

KAZMIERCZAK, B. I.; SCHNIEDERBEREND, M.; JAIN, R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Current opinion in microbiology**, v. 28, p. 78–82, dez. 2015.

KIM, H. S. et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 146, p. 209–239, jun. 2019.

KINGSLEY, A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. **Ostomy/wound management**, v. 49, n. 7A Suppl, p. 1–7, jul. 2003.

KNEZEVIC, P. et al. Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 245–254, jul. 2011.

KROPINSKI, A. M. et al. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. Em: [s.l: s.n.]. p. 69–76, 2009.

KUTTER, E. et al. Phage therapy in clinical practice: Treatment of human infections. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 69–86, 1 jan. 2010.

LANGLET, J.; GABORIAUD, F.; GANTZER, C. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1632–1638, nov. 2007.

LI, X. et al. Formation of phage lysis patterns and implications on co-propagation of phages and motile host bacteria. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 3, p. e1007236, 13 mar. 2020.

LIU, S. et al. Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 427, 16 fev. 2022.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634–640, 1 mar. 2002.

LY-CHATAIN, M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

- MAHAJAN, S. et al. Biofilm inhibitory effect of alginate lyases on mucoid *P. aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 26, p. 101028, jul. 2021.
- MALIK, D. J. Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy. **Current Issues in Molecular Biology**, p. 303–316, 2021.
- MENDES, J. J. et al. Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 4, p. 595–603, jul. 2013.
- MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 19–25, jan. 2007.
- MÉRIC, G. et al. Disease-associated genotypes of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 5034, 28 nov. 2018.
- MILHO, C. et al. Antimicrobial assessment of phage therapy using a porcine model of biofilm infection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 557, p. 112–123, fev. 2019.
- MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, 9 out. 2014.
- MIRZAEI, M. K.; NILSSON, A. S. Correction: Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127606, 7 maio 2015.
- MULUGETA, B.; TESFAYE, S.; TESFAYE, W. Bacteriophages and phage products: Applications in medicine and biotechnological industries, and general concerns. **Scientific Research and Essays**, v. 13, n. 6, p. 55–70, 30 mar. 2018.
- MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.
- MYLON, S. E. et al. Influence of salts and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 1035–1042, 19 jan. 2010.
- NAIL, S. L. et al. Fundamentals of freeze-drying. Em: [s.l: s.n.]. p. 281–360, 2002.
- NALE, J. Y.; CLOKIE, M. R. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, p. 310–317, abr. 2021.
- NEWBERN, S. Identifying pain and effects on quality of life from chronic wounds secondary to lower-extremity vascular disease: An integrative review. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 31, n. 3, p. 102–108, mar. 2018.
- NGUYEN, S. et al. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. **mBio**, v. 8, n. 6, 29 dez. 2017.
- OECHSLIN, F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. **Viruses**, v. 10, n. 7, p. 351, 30 jun. 2018.

- OLIVEIRA, A. et al. Chestnut honey and bacteriophage application to control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms: Evaluation in an ex vivo wound model. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 31 jul. 2018.
- OLIVEIRA, A. C. DE et al. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, n. 2, p. 194–201, mar. 2019.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295–304, out. 1998.
- PAL, C. et al. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 1079–1081, 2 dez. 2007.
- PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, jan. 2019.
- PELZEK, A. J. et al. Isolation, culture, and characterization of bacteriophages. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 7, n. 1, 15 out. 2013.
- PERCIVAL, S. L. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 647–657, set. 2012.
- PERCIVAL, S. L. et al. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 2, p. 174–186, mar. 2014.
- PODLACHA, M. et al. Interactions of bacteriophages with animal and human organisms—safety issues in the light of phage therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8937, 19 ago. 2021.
- PORTER, J. et al. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2053–2062, mar. 2016.
- PUXTY, R. J.; MILLARD, A. D. Functional ecology of bacteriophages in the environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102245, fev. 2023.
- QADIR, M. I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 14 maio 2018.
- QI, Q. et al. Identification of integrons and gene cassette-associated recombination sites in bacteriophage genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 19 jan. 2023.
- RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1701–1718, 23 dez. 2021.
- RAZIYEVA, K. et al. Immunology of acute and chronic wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 8 maio 2021.
- RICHARD, J.-L. New insights in diabetic foot infection. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 2, p. 24, 2011.

- ROACH, D. R.; DONOVAN, D. M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. **Bacteriophage**, v. 5, n. 3, p. e1062590, 3 jul. 2015.
- ROBSON, M. C. Wound infection. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 637–650, jun. 1997.
- ROSNER, D.; CLARK, J. Formulations for bacteriophage therapy and the potential uses of immobilization. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 4, p. 359, 13 abr. 2021.
- ROSSMANN, M. G. et al. Combining X-Ray crystallography and electron microscopy. **Structure**, v. 13, n. 3, p. 355–362, mar. 2005.
- RUDKIN, J. K. et al. Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006452, 21 set. 2017.
- RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 1 nov. 2012.
- SABOURI GHANNAD, M.; MOHAMMADI, A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 15, n. 2, p. 693–701, mar. 2012.
- SALALHA, W. et al. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. **Nanotechnology**, v. 17, n. 18, p. 4675–4681, 28 set. 2006.
- SAUER, K. et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 3 out. 2022.
- SCHADE, S. Z.; ADLER, J.; RIS, H. How Bacteriophage χ attacks motile bacteria. **Journal of Virology**, v. 1, n. 3, p. 599–609, jun. 1967.
- SCHULTZ, G. S. et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, n. s1, p. S1–S28, mar. 2003.
- SCHUSTER, H. Bacteriophages, von M. H. Adams. Interscience Publishers, Inc., New York-London 1959. 1. Aufl., XVIII, 592 S., 26 Tab., 16 Abb., geb. £ 6.50. **Angewandte Chemie**, v. 74, n. 4, p. 164–164, 21 fev. 1962.
- SEN, C. K. et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 6, p. 763–771, nov. 2009.
- SERWER, P. et al. Isolation of novel large and aggregating bacteriophages. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 55–66, 2009.
- SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology, and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, jan. 2015.
- SHARMA, S. et al. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 19393, 29 set. 2021.

- SHENDE, R. K. et al. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 973–978, ago. 2017.
- SILLANKORVA, S. et al. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage ÎS1: the influence of temperature, host growth phase and media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 1, p. 13–20, dez. 2004.
- SIRINGAN, P. et al. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. **Open Biology**, v. 4, n. 3, p. 130200, mar. 2014.
- SPELLBERG, B. et al. Trends in antimicrobial drug development: Implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279–1286, 1 maio 2004.
- SZERMER-OLEARNIK, B. et al. Aggregation/dispersion transitions of T4 phage triggered by environmental ion availability. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32, 24 dez. 2017.
- TURNER, D. et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. **Archives of Virology**, v. 168, n. 2, p. 74, 23 fev. 2023.
- VASUDEVAN, R. Biofilms: Microbial cities of scientific significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 3, 18 jun. 2014.
- VERBANIC, S.; DEACON, J. M.; CHEN, I. A. The chronic wound phageome: Phage diversity and associations with wounds and healing outcomes. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, 29 jun. 2022.
- WAGNER, P. L.; WALDOR, M. K. Bacteriophage control of bacterial virulence. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 3985–3993, ago. 2002.
- WERDIN, F. et al. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. **Eplasty**, v. 9, p. e19, 4 jun. 2009.
- WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and wound repair: Positive actions and negative reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, set. 2013.
- WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226–235, 13 jan. 2014.
- YIN, J. Impact of spatial structure on phage population growth. Em: **Bacteriophage Ecology**. [s.l.] Cambridge University Press, p. 94–113, 2008.
- YOUNG, R.; WANG, I.-N.; ROOF, W. D. Phages will out: strategies of host cell lysis. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 120–128, mar. 2000.
- YU, M. et al. Advances in the transepithelial transport of nanoparticles. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1155–1161, jul. 2016.
- ZHAO, R. et al. Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2085, 11 dez. 2016.

ZUBAIR, M.; AHMAD, J. Potential risk factors and outcomes of infection with multidrug resistance among diabetic patients having ulcers: 7 years study. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 414–418, jan. 2019.