



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Helena Yurevna Caio

**Prospecção de modelo *in vitro* de migração celular
na presença de bactérias e bacteriófagos**

Florianópolis, Santa Catarina

2023

Helena Yurevna Caio

**Prospecção de modelo *in vitro* de migração celular
na presença de bactérias e bacteriófagos**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Bacharela em Ciências
Biológicas

Orientadora: Prof.^a Gislaine Fongaro, Dr.^a

Coorientadora: Prof.^a Izabella Thaís da Silva, Dr.^a

Florianópolis, Santa Catarina

2023

Caio, Helena Yurevna

Prospecção de modelo in vitro de migração celular na presença de bactérias e bacteriófagos / Helena Yurevna Caio ; orientadora, Gislaine Fongaro, coorientadora, Izabella Thaís da Silva, 2023.

42 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. fibroblastos L929. 3. scratch. 4. fagoterapia. 5. Pseudomonas aeruginosa. I. Fongaro, Gislaine. II. Silva, Izabella Thaís da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Helena Yurevna Caio

**Prospecção de modelo *in vitro* de migração celular
na presença de bactérias e bacteriófagos**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e **APROVADO** em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 21 de novembro de 2023

Coordenação do Curso

Banca Examinadora:

Gislaine Fongaro, Prof.^a Dr.^a
UFSC/CCB/MIP

Aline Viancelli, Prof.^a Dr.^a
Universidade do Contestado - UnC

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Prof.^a Dr.^a
UFSC/CCS/Odontologia

Rubens Tadeu Delgado Duarte, Prof. Dr.
UFSC/CCB/MIP

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho a caoticidade e a beleza da vida,
e aos meus amados pais que me deram tanto dela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a UFSC e a CNPq pela toda a estrutura e financiamento que estimulam e possibilitam o crescimento profissional e de qualidade a todos que se dispõem a aprender. O campus de Florianópolis da UFSC se tornou um lugar familiar, e sempre vai trazer boas memórias e momentos muito especiais. E, em especial, aos excelentes professores que tornavam a vida acadêmica muito mais interessante e viva.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Gislaine Fongaro pela oportunidade profissional que me deu, além do acolhimento pessoal. Talvez a minha natureza não me permitiu demonstrar tanto, mas tenho muito carinho e respeito por ti.

Quero agradecer a Mari, a pessoa que introduziu o laboratório, a sua rotina e me ensinou e ajudou muitas vezes. Aprendi muito contigo, e sempre saía das nossas conversas com espírito mais leve.

Queria agradecer a toda comunidade da UFSC, especialmente aos técnicos e aos guardinhas que são pessoas gentis e dispostas a ajudar e dar um “bom dia” e “boa noite”, mesmo nos dias mais difíceis e chuvosos.

Agradeço aos meus queridos amigos, Jamis, Mari, Júlia, Emma, César, Gui, Henrique, João e Nati, por enriquecerem a minha vida e lembrarem que ela existe além do trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratórios, Joana, Alanna, Isa, Giulia, Bea, Amanda, Vivi, Rafa, Yasmin, Lucas, Miguel, Gabriel e Yasmim, por troca de ideias, experiências, ensinamentos e especialmente por manter o alto astral.

Estêvão, meu amigo dos experimentos incessantes, meu parceiro da dupla fágica, de passar horas no laboratório, de “vamos testar mais este protocolo, desta vez deve dar certo”, de tantas conversas, choros e risos. Sei que não insistiria tanto esforço e por tanto tempo nos nossos experimentos sem ti, e agradeço muito pela nossa amizade.

Também quero agradecer a Sheila por todo o suporte que me deu ao longo destes anos. Sei que ambas temos personalidades fortes, mas sem dúvida você esteve presente em vários momentos e me ajudou como se eu fosse a tua filha. Muito obrigada por todo o carinho e apoio, espero muito que pude te oferecer também!

Meu querido, amado, единственный em todos os sentidos Gateau. Não consigo conter o sorriso ao escrever o quão sou grata por estes 5 anos de sentimentos, emoções, aventuras,

passeios, tantas risadas, choros, conversas sinceras, simplesmente tudo. Sei que crescemos e amadurecemos juntos, aprendi tanto contigo, e tenho sorte por ter passado este trajeto ao teu lado. É pouco falar o quanto te amo, respeito, valorizo e admiro. Mesmo com todas as diferenças, podemos olhar para o mundo um do outro e abrir mais os horizontes. Obrigada por não desistir de mim, mesmo nos piores momentos. Sei que posso contar contigo, e você saiba que pode contar comigo, independentemente do tempo-espço. Te amo $\lim_{x \rightarrow +\infty}$.

Por fim, mas nem um pouco menos importante, agradeço com todo o meu coração à minha família, meus avós, tios e primos, e em especial aos meus pais, Yuri e Natasha. Independentemente de onde estivéssemos neste mundo, vocês sempre me acompanharam nas minhas conquistas, acreditaram em mim e, acho que o mais importante, me deram asas para voar e explorar os horizontes. Obrigada por me darem esta liberdade, com ela pude valorizar muito mais quem somos e o que construímos e conquistamos. Também não há limites para o quanto amo vocês.

RESUMO

A perda da integridade de tecidos vivos exige atenção e cuidados imediatos pois, quando não tratada adequadamente, pode apresentar complicações locais ou até sistêmicas. Geralmente, estas complicações começam por infecções, quando os agentes patológicos penetram nos tecidos mais profundos, como a derme, e causam morte celular, inflamação e formação de biofilmes, entre outros. Neste sentido, a *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa que apresenta alto risco à saúde humana, tanto pela sua vasta distribuição como pela sua toxicidade. Tendo em vista que os antibióticos perdem a sua eficácia ao longo do tempo e oferecem base para o surgimento de bactérias multirresistentes, a fagoterapia apresenta-se como uma alternativa para o controle do crescimento bacteriano. Entretanto, antes da sua aplicação *in vivo* é necessário realizar testes *in vitro* a fim de selecionar bacteriófagos específicos e simular um possível tratamento eficaz e mais preciso. Neste cenário, a técnica de *scratch* usando cultura celular epitelial visa mimetizar uma lesão tecidual com maior acuidade e avaliar a migração celular sob diferentes condições. O objetivo do presente trabalho foi prospectar um modelo *in vitro* de migração celular em fibroblastos murinos L929 ATCC CCL-1™ na presença de *P. aeruginosa* e suas toxinas, com ou sem o tratamento com bacteriófagos do banco de vírus do Laboratório de Virologia Aplicada, isolados no ano de 2023 de feridas crônicas de pacientes. Como resultado, verificou-se que 10^4 células viáveis de fibroblastos L929 toleram um inóculo inicial $\sim 1-10$ células (3,56 UFC/mL) de *P. aeruginosa* por pelo menos 24h. Nenhum dos 5 bacteriófagos apresentou ação cicatrizante em *scratch*, entretanto dois isolados chamados PAPB2 e PAS2 se mostraram como candidatos promissores para estudos futuros, já que estimularam a migração de L929, mesmo na presença de toxinas bacterianas e *P. aeruginosa*. Espera-se que o presente trabalho sirva de base para o desenvolvimento de futuros modelos experimentais de sistemas vivos *in vitro* com bactérias, bacteriófagos e células.

Palavras-chave: fibroblastos L929, *Pseudomonas aeruginosa*, *scratch*, lesão tecidual, fagoterapia.

ABSTRACT

The loss of the integrity of healthy tissues requires immediate attention and care because, when not treated properly, it can lead to local or even systemic complications. These complications usually begin with infections, when pathological agents penetrate deeper tissues, such as the dermis, and cause cell death, inflammation and biofilm formation, among other things. In this context, *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacteria that presents a high risk to human health, both due to its wide distribution and its toxicity. Since antibiotics lose their efficacy over time and provide a basis for the emergence of multidrug-resistant bacteria, phage therapy is an alternative for controlling bacterial growth. However, before it can be applied *in vivo*, it is necessary to perform *in vitro* tests in order to select specific bacteriophages and simulate a possible effective and more precise treatment. In this scenario, the *scratch* technique using epithelial cell culture aims to mimic a tissue lesion with greater accuracy and assess cell migration under different conditions. The purpose of this study was to explore an *in vitro* model of cell migration in murine fibroblasts L929 ATCC CCL-1™ in the presence of *P. aeruginosa* and its toxins, with or without treatment with bacteriophages obtained from the virus bank of the Applied Virology Laboratory, isolated in 2023 from chronic wounds of patients. As a result, 10⁴ viable L929 fibroblast cells were found to tolerate an initial inoculum of ~1-10 cells (3.56 CFU/mL) of *P. aeruginosa* for at least 24 hours. None of the 5 bacteriophages showed healing effects in *scratch*, but two isolates called PAPB2 and PAS2 proved to be promising candidates for future studies, since they stimulated the migration of L929, even in the presence of bacterial toxins and *P. aeruginosa*. It is expected that this work will serve as a basis for the development of future experimental models of *in vitro* living systems with bacteria, bacteriophages and cells.

Keywords: L929 fibroblasts, *Pseudomonas aeruginosa*, *scratch*, tissue wound, phage therapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Origem e Manutenção da Linhagem Celular L929.....	16
3.2	Técnica de <i>Scratch</i> em Placa de 96 cavidades.....	16
3.3	Origem e Manutenção de <i>P. aeruginosa</i> e Bacteriófagos.....	18
3.4	Cultivo e Preparação do Estoque de Uso de <i>P. aeruginosa</i>	18
3.5	Curvas de Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> em Meios Bacteriológico e Celular.....	19
3.6	Propagação e Purificação dos Bacteriófagos.....	19
3.7	Titulação dos Bacteriófagos.....	20
3.8	Determinação da Tolerância Celular a <i>P. Aeruginosa</i>	21
3.9	<i>Scratch</i> em Cultura Celular com Bacteriófagos.....	22
3.10	<i>Scratch</i> em Cultura Celular com Bacteriófagos e <i>P. aeruginosa</i>	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	Contagem de Unidades Formadoras de Colônia de <i>P. aeruginosa</i>	24
4.2	Comparação das Curvas de Crescimento de <i>P. aeruginosa</i>	24
4.3	Determinação da Tolerância Celular a <i>P. aeruginosa</i>	25
4.4	Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e de Toxinas Bacterianas.....	25
4.5	Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e <i>P. aeruginosa</i>	27
4.6	Migração Celular Mediada por Bacteriófago em 24h.....	30
5	DISCUSSÃO.....	32
5.1	Curva de Crescimento.....	32
5.2	Tolerância Celular a <i>P. aeruginosa</i>	33

5.3	Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e de Toxinas Bacterianas.....	34
5.4	Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e <i>P. aeruginosa</i>	34
5.5	Migração Celular por Bacteriófago em 24h.....	35
6	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores preocupações atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) é a crescente Resistência a Antimicrobianos (RAM). Após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, o mundo desfrutou do uso destes antimicrobianos sem grandes cuidados até o surgimento e a descoberta das bactérias multirresistentes. A maioria destas são bactérias oportunistas ou patogênicas do ser humano, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* e várias Enterobacteriaceae, incluindo *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp. (1). Estima-se que mais de 6 milhões de pessoas morreram devido a RAM em 2019 (2), e alguns prognósticos indicam que, em 2050, os números alcançarão 10 milhões de mortes anuais, e comprometerão mais de 100 trilhões de dólares na produção global (3).

Geralmente, os focos de infecções por bactérias multirresistentes são associados aos centros de saúde, especialmente àqueles com centros operatórios, devido a sua alta rotatividade de pessoas (tanto de profissionais de saúde, quanto de pacientes) e à impossível desinfecção completa dos ambientes hospitalares. Mundialmente, um quarto das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACSs) são causadas por bactérias multirresistentes (3, 4) e isso engloba infecções do trato urinário, de sítio cirúrgico, de corrente sanguínea e pneumonia, entre outras (5). Estima-se que nos países desenvolvidos cerca de 5–10% dos pacientes internados em hospitais adquirem uma ou mais IACSs (3, 4), o que aumenta tempo de internação, mortalidade, trabalho dos profissionais de saúde e gera custos adicionais de manutenção hospitalar. Junto com o relativo esgotamento de opções de princípios ativos antimicrobianos e desenvolvimento de antibióticos novos (6), torna-se imprescindível a busca por tratamentos alternativos de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

Uma destas bactérias é a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), bacilo Gram-negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo que é comumente encontrado em solo, água e outras fontes ambientais, assim como na microbiota de plantas e animais (7). É uma bactéria oportunista pois causa infecções majoritariamente em populações imunocomprometidas, como em gestantes, crianças, idosos, transplantados, diabéticos, portadores de HIV e de fibrose cística, podendo causar infecções de sangue (bacteremia), pele, ossos, ouvidos, olhos, vias urinárias, válvulas cardíacas, pulmões (pneumonia), bem como em feridas cirúrgicas ou traumáticas (8, 9). Desde 2017, a OMS incluiu a *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos como um dos patógenos de prioridade crítica para pesquisa e desenvolvimento de novos

tratamentos (1), e, em 2019, estimou-se que mundialmente 84,6 mil pessoas morreram por causa de *P. aeruginosa* resistente a pelo menos um antibiótico (2).

A sua alta patogenicidade pode ser explicada pela presença de um conjunto de fatores de virulência, como flagelos, fimbrias e pili do tipo IV; produção de polissacarídeos (alginato), endotoxinas (lipopolissacarídeos) e exotoxinas (hemolisinas, exotoxina A e proteases); sistemas de secreção III e VI; matriz de biofilme e quorum sensing (7). Somando a isto, este patógeno ainda apresenta multirresistência a agentes antimicrobianos através de mecanismos como: inativação enzimática dos antibióticos, em especial pelas carbapenemases; modificação do alvo do antibiótico através da presença de proteínas de ligação à penicilina; superexpressão de bombas de efluxo; diminuição da permeabilidade da membrana externa; e perda de porinas (9). Juntando todas estas características a altas taxas de mutabilidade bacteriana, reforça-se a necessidade de um tratamento eficaz e rápido na sua confecção para não perder esta corrida biológica.

Neste sentido, a busca por novas classes de antibióticos é lenta e, quando atingida, se torna questão de anos até perderem a sua eficácia (6, 10). Ademais, deve-se levar em consideração os impactos ecológicos causados por seus compostos químicos, diretos ou derivados da sua degradação, que alteram o meio microbiológico e causam pressões antropogênicas no desenvolvimento das populações microbianas, criando uma seletividade artificial às bactérias resistentes tanto na microbiota quanto no meio ambiente (11). Desta forma, surgiram algumas alternativas que têm este cuidado com a integridade biológica e sistêmica, estão entre elas: as vacinas, os anticorpos, os probióticos, as lisinas, a estimulação imune, os peptídeos com ação antibiofilme e a fagoterapia (12).

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são parasitas intracelulares obrigatórios de bactérias e são seres mais abundantes da biosfera, com a estimativa de existirem mais de 10^{30} partículas virais só em oceanos (13). Esta abundância é diretamente proporcional ao número de bactérias no ambiente; estima-se que há até 100 vezes mais bacteriófagos do que suas respectivas bactérias-hospedeiras (14). Por serem tão numerosos, a sua classificação se baseia principalmente em morfologia e material genético (15, 16). A morfologia do capsídeo proteico pode variar bastante, sendo de um dos três grupos principais: os icosaédricos (com cauda ou sem), os filamentosos e os complexos, podendo ou não apresentar um envelope lipídico. Quanto à natureza do ácido nucleico, este pode variar entre ser de DNA e/ou RNA, de fita simples ou dupla, e de cadeia contínua ou segmentada. Não menos importante, existem duas estratégias básicas de ciclo de vida dos fagos: os temperados têm a capacidade de integrar o seu genoma no material genético da bactéria hospedeira, realizando, assim, a lisogenia, enquanto que os

líticos não o fazem e geralmente são mais virulentos, causando lise celular após a replicação (17).

Especialmente estes últimos despertam maior interesse para o uso biotecnológico com diversas aplicações e vantagens (18), tais como o controle do número bacteriano (19), a maior especificidade com o alvo se comparados com os antibióticos (20, 21), a capacidade de penetração no biofilme (20, 21), a capacidade de restaurar a sensibilidade aos antibióticos (22), a possibilidade de transportar outros fármacos e até genes no interior do seu capsídeo (23, 24), além de servir como fonte de diversas enzimas degradadoras como endolisinas e holinas (25). Eles já estão sendo usados em diversas áreas: na indústria de alimentos para aplicação em superfícies e alimentos (26); na agropecuária para aplicação em animais e plantas; em águas efluentes; e em centros de saúde como desinfetantes superfícies de instrumentos hospitalares (21) e no tratamento de pacientes com infecções bacterianas, chamado também de fagoterapia.

A fagoterapia nasceu junto com o descobrimento dos bacteriófagos por dois pesquisadores independentemente, Frederick Twort na Inglaterra, em 1915, e Félix d'Hérelle na França, em 1917 (17). Entretanto, foi Félix quem deu o início à aplicação clínica dos fagos, imaginando que existia somente um, o "*bacteriophagum intestinale*", com diversos subtipos (27). Infelizmente, o interesse científico da sua aplicação clínica foi ofuscado pelo descobrimento dos antibióticos nas décadas subsequentes, além de toda a dificuldade técnica e teórica na sua execução. Poucos países, como Geórgia e Rússia, mantiveram os estudos teóricos e clínicos em desenvolvimento. Somente no final da década de 1960, a fagoterapia foi revitalizada, e hoje há um número maior de países que estão investindo dinheiro e esforços na padronização desta técnica, como é o caso dos Estados Unidos, Austrália, Espanha, Portugal, França, Bélgica, dentre vários outros (28). Já no Brasil, a fagoterapia era vastamente usada até os anos 1940, especialmente pelo Instituto Oswaldo Cruz (29), mas caiu em desuso e atualmente só há estudos de bioprospecção e *in vitro*, sem algum registro de ensaio clínico em andamento.

Um ponto importante a ser ressaltado é que a fagoterapia por si só não teria 100% de eficácia no tratamento, mas seria um potente adjuvante para o sistema imune e/ou outros fármacos, mesmo os antibióticos. Já que a relação dos fagos com as bactérias é uma relação de parasitismo, o princípio básico da fagoterapia seria a contenção e a diminuição da quantidade máxima de bactérias vivas e circulantes, diminuindo a carga de trabalho para o nosso organismo. Sabidamente, a fagoterapia possui várias limitações no seu uso, principalmente devido ao fato do genoma fágico poder carregar integrases, toxinas, genes de resistência aos antibióticos e vários outros fatores de virulência bacteriana (30). Assim, é necessário ter uma visão ecológica sobre o nosso corpo e as interações que acontecem no nível microbiológico: os

fagos e as bactérias não vão interagir somente entre si, mas também com todo o meio e células ao seu redor. Por exemplo, já se sabe que várias bactérias como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* conseguem invadir algumas células eucarióticas e se manter de forma latente (31, 32, 33). Quanto aos fagos, muitos esforços estão sendo feitos para investigar as suas interações com células eucarióticas, especialmente para validar a fagoterapia como um tratamento seguro para humanos. Por um lado, há literatura que indica que a resposta imune referente a administração dos fagos é clinicamente insignificante (30); por outro, há demonstração de uma vasta rede de interações e que ainda há muito o que se pesquisar nesta área antes de poder afirmar algo (34).

Uma situação na qual esta complexidade de interações entre bactérias, fagos e células humanas pode ser observada é a lesão cutânea, comumente chamada de ferimento. A pele é o maior órgão do ser humano e também é a primeira barreira de proteção dos agentes externos (35). Quando há perda da sua integridade, ocorrem 3 fases bem definidas de sua cicatrização: a inflamatória, com a liberação de mediadores químicos, aumento da permeabilidade capilar e migração de células imunes como leucócitos; a proliferativa ou fibroblástica, com neovascularização, epitelização e diminuição da inflamação; e a reparativa, quando ocorre a reorganização do tecido cicatricial previamente formado (36). Geralmente, ela ocorre de uma maneira fácil, rápida e ordenada, porém há vários fatores que podem complicar a cicatrização, como idade, doenças, edemas e, mais comumente, infecções. Caso o ferimento não seja tratado adequadamente, uma contaminação inicial por bactérias pode se desenvolver rapidamente em infecções locais ou até generalizadas (sepse), podendo levar até a morte.

Visto toda a complexidade da condição de uma lesão tecidual contaminada, e que há cada vez menos opções de tratamentos devido ao aumento de RAM, a ideia do presente trabalho visou simular tal cenário *in vitro*. A escolha da condição de ferida cutânea se deu pelo fato de ser mais facilmente reproduzível em condições laboratoriais de microbiologia e cultura celular, apresentar um baixo custo de manutenção e permitir a adição do tratamento no meio celular, simulando uma aplicação tópica dos fagos. Para tal, utilizou-se a técnica de *scratch* para mimetizar *in vitro* uma ferida e acompanhar mais de perto o desenvolvimento da sua cicatrização.

Assim sendo, o presente trabalho busca avaliar a migração celular *in vitro* para na presença de *Pseudomonas aeruginosa* e de bacteriófagos utilizando a técnica de *scratch* em linhagem de fibroblastos murinos L929. Espera-se que os percentuais de migração celular das cavidades com tratamento com bacteriófagos sejam maiores do que os das cavidades sem tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Prospectar um modelo *in vitro* de migração celular na presença de bactérias e/ou bacteriófagos utilizando a técnica de *scratch*.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a tolerância de fibroblastos murinos L929 frente a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Avaliar o percentual de migração celular em modelo de *scratch* frente ao tratamento com bacteriófagos.
3. Avaliar o percentual de migração celular em modelo de *scratch* na presença de *Pseudomonas aeruginosa* com e sem o tratamento usando bacteriófagos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e Manutenção da Linhagem Celular L929

Para os ensaios de cultura celular, foi utilizada a linhagem de células imortalizadas L929 ATCC CCL-1™ (fibroblasto murino da espécie *Mus musculus*) adquirida pelo Laboratório de Virologia Aplicada (LVA/MIP/UFSC) do banco *American Type Culture Collection* (ATCC). A escolha desta linhagem se deu devido a praticidade de manutenção, seu rápido crescimento e a sua utilização como modelo celular em estudos de citotoxicidade recomendada pela ISO 10993-5.

As alíquotas do estoque original foram mantidas no criobanco de nitrogênio líquido a -196°C nas dependências do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/CCB/UFSC). A partir destas, uma subcultura celular de L929 foi feita em garrafas de cultura de 25 cm^2 e mantida com 10 mL de Meio MEM (Minimal Essential Medium, Eagle) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 .

Quando a monocamada celular atingiu confluência de $\sim 80\%$, o tapete celular foi lavado com 7 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) duas vezes e foi adicionado 1 mL de tripsina 0,05% (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução EDTA 1:250, Sigma) como um agente dissociante com ação proteolítica. Após ser mantida na estufa a 37°C por tempo suficiente ($\sim 2\text{ min}$) para que o tapete celular se dissocie por completo, adicionou-se o Meio de Cultivo (MEM+10% de SFB) para a inativação da tripsina e a suspensão celular foi subcultivada.

3.2 Técnica de *Scratch* em Placa de 96 cavidades

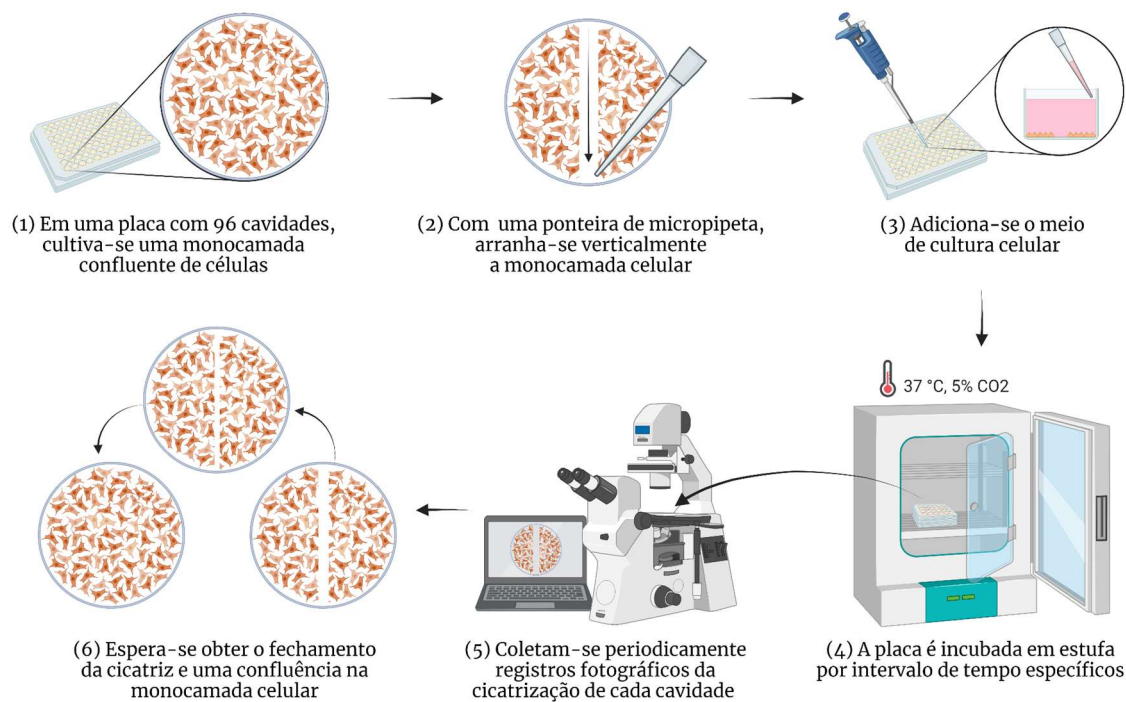
Para a montagem de uma placa de 96 cavidades, cada cavidade foi semeada com 100 μL de suspensão celular em meio de cultivo com aproximadamente 10^5 células viáveis/mL, contagem feita em contador automático de células Invitrogen™ Countess™. Em seguida, a placa foi incubada na estufa a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 , por 24h até o tapete celular atingir uma confluência total.

Para a técnica de *scratch*, foi empregado o protocolo adaptado de Grada *et al.* (37). Portanto, em uma placa de 96 cavidades, com tapete celular confluyente, foi feito um arranhão vertical no meio de cada cavidade com uma ponteira de 20 μL . Logo em seguida, o meio de cultivo foi aspirado com auxílio de uma pipeta pasteur, cada cavidade foi lavada duas vezes

com 200 μL de PBS e foi adicionado 200 μL de Meio de Manutenção (MEM+1% de SFB), com ou sem a adição do tratamento, e incubada na estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO_2 , por 48h.

Figura 1 - As etapas da técnica do *scratch*.

Técnica do Scratch



Fonte: Imagem gerada pela autora.

Para determinar o percentual de migração celular, foram feitos registros fotográficos de cada cavidade em intervalos de tempo determinados após a realização do *scratch*, utilizando a câmera digital Micrometrics 318CU acoplada ao microscópio óptico de luz invertido Olympus® IX71 com lentes objetivas de aumento de 4 vezes. O *software* utilizado para a captação de imagem foi Micrometrics® SE Premium (38) e o de análise de imagem foi o Fiji (39) com *plugin Wound-healing-size-tool* escrito por Suarez-Arnedo *et al.* (40).

O cálculo do percentual de migração celular foi feito através da comparação da *área aberta entre as células* a 0h, 24h e 48h após a realização do *scratch*, demonstrado na Equação 1. As tabelas geradas foram submetidas a análise estatística de *two way ANOVA*, com teste post-hoc de Tukey com o nível de significância de 5% ($p < 0.05$). O *software* utilizado foi GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows. Os valores de *p* apresentados nas figuras correspondem a: (*) - $p < 0,05$; (**) - $p < 0,01$; (***) - $p < 0,001$; (****) - $p < 0,0001$.

Equação 1: $Percentual\ de\ Fechamento\ da\ Ferida = \left[\frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0}} \right] \times 100$

Onde: $A_{t=0h}$ é a área aberta imediatamente após o *scratch* ($t = 0h$)

$A_{t=\Delta h}$ é a área aberta medida h horas após o *scratch*

3.3 Origem e Manutenção de *P. aeruginosa* e Bacteriófagos

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizada a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* N°27853 adquirida pelo Laboratório de Virologia Aplicada (LVA/MIP/UFSC) do banco *American Type Culture Collection* (ATCC). Os bacteriófagos PAPB2, PAPB5, PAPB7, PAT4 e PAS2 foram obtidos do banco de vírus do LVA, sendo originalmente derivados de culturas bacterianas de tecido humano (pele, osso e tendão) gentilmente cedidas ao LVA pelo Laboratório de Biologia Molecular, Micobactérias e Sorologia do Hospital Universitário (LBMMS/HU/UFSC).

O estoque das bactérias e dos bacteriófagos foram mantidos a -80°C em sala de criopreservação. Foram feitas alíquotas a partir do estoque de *P. aeruginosa* N°27853 ATCC e guardadas a -20°C , resultando em um estoque de uso. O estoque de uso dos bacteriófagos foi mantido a 4°C em tubos tipo Falcon de 50 mL.

3.4 Cultivo e Preparação do Estoque de Uso de *P. aeruginosa*

Uma alíquota de 1 mL de *P. aeruginosa* foi cultivada em erlenmeyer com 25 mL de Meio LB (Luria Bertani, Kasvi) através da incubação em estufa a 37°C , por 16h. Após este período, foi medida a sua Densidade Óptica (DO) a 600 nm a fim de determinar se o crescimento bacteriano atingiu a sua fase exponencial; uma vez que se obteve o valor de 0,5-0,6 de DO, o conteúdo do erlenmeyer foi alíquotado em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL para constituir o estoque de uso. Cada microtubo com 700 μL de solução bacteriana e 300 μL de glicerol estéril foi homogeneizado e estocado a -20°C .

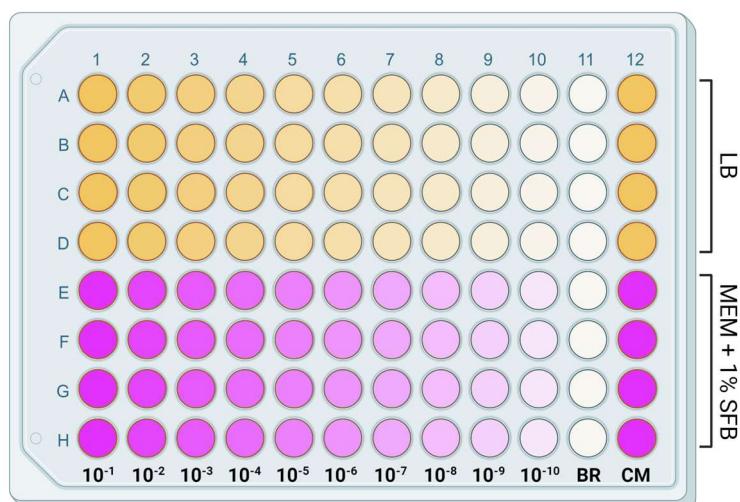
A fim de estipular o número de bactérias viáveis deste estoque, foi realizada a titulação bacteriana através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para 2 microtubos selecionados aleatoriamente. Assim, foi realizada uma diluição seriada de 100 μL da solução bacteriana descongelada em 900 μL de PBS, repetindo dez vezes, até atingir a diluição final de 10^{-10} . Um volume de 100 μL de cada diluição foi plaqueado, em réplica, em placa de petri com meio LB sólido, com auxílio de uma alça de drigalski, e todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C . Após 24h, realizou-se a contagem de UFC a fim de determinar o número médio de UFC/mL presente no estoque de uso, através da Equação 2.

$$\text{Equação 2: } \text{UFC/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Colônias Contabilizadas}}{\text{Diluição} \times \text{Volume do Inóculo (mL)}}$$

3.5 Curvas de Crescimento de *P. aeruginosa* em Meios Bacteriológico e Celular

Para determinar como o Meio Celular de Manutenção interfere no crescimento bacteriano, foram feitas curvas de crescimento de *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultivo: em (a) LB e em (b) MEM+1% SFB. Assim, foram realizadas 10 diluições seriadas (de 10^{-1} até 10^{-10}) de *P. aeruginosa* em meios de cultivo LB e MEM+1% SFB atuando como solventes, separadamente, para depois ser adicionado 100 μL de cada diluição, em quadruplicata, em uma placa de 96 cavidades, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - O desenho experimental da placa para gerar a curva de crescimento de *P. aeruginosa* em diferentes meios, LB e MEM+1% SFB. BR é o controle do branco; CM é o controle do meio.



Fonte: Imagem gerada pela autora.

A placa preparada foi incubada a temperatura ambiente no espectrofotômetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices) por 24h, tendo leituras de DO a 600 nm a cada 1h. O experimento foi realizado duas vezes independentemente, e os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows.

3.6 Propagação e Purificação dos Bacteriófagos

A fim de propagar os bacteriófagos selecionados, 1 mL de cada foi adicionado a um erlenmeyer com uma cultura da *P. aeruginosa*, cultivada em 25 mL de caldo LB e que atingiu a fase exponencial de crescimento. Cada erlenmeyer foi devidamente identificado e mantido

na estufa a 37°C por 12h. Posteriormente, foram adicionado 50 µL de Tween20 (0.002% (v/v)) para atuar como surfactante e impedir a futura adesão dos bacteriófagos às superfícies de plástico (41).

Em seguida, o conteúdo de cada erlenmeyer foi transferido para um tubo de 50 mL do tipo Falcon e centrifugado a 5000 rpm por 1h em centrífuga 5804 R (Eppendorf) para uma melhor separação do biofilme produzido pela *P. aeruginosa*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente filtrado com filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm para um novo tubo de 50 mL. A etapa de centrifugação poderia ser repetida caso houvesse necessidade de uma maior separação do biofilme do sobrenadante. Após, os bacteriófagos foram mantidos em uma geladeira a 4°C até a próxima etapa.

É importante apontar que somente centrifugação e filtração destas alíquotas bacteriofágicas não eliminam os metabólitos e partes estruturais de bactérias. Assim, o lisado bacteriano apresenta, além dos bacteriófagos selecionados, uma variedade de outras substâncias que podem ser citotóxicas, como os polissacarídeos, endo- e exotoxinas (7). Portanto, para avaliar a ação somente dos bacteriófagos selecionados na migração celular, utilizou-se a cultura pura de *P. aeruginosa* como o controle negativo do experimento. Assim, *P. aeruginosa* foi cultivada nas mesmas condições sem a adição dos bacteriófagos, e em seguida passou pelo mesmo processo de centrifugação, filtração e estocagem. Este controle negativo será referido ao longo do texto como simplesmente *toxinas bacterianas*.

3.7 Titulação dos Bacteriófagos

Para determinar a quantidade de Unidades Formadoras de Placas (UFPs) presentes nas amostras filtradas, foi realizada a titulação dos bacteriófagos através da técnica de duplo-ágar adaptada de M. H. Adams, 1959 (42). Para tal, primeiramente se fez a diluição seriada do bacteriófago isolado em SM buffer. Em seguida, em um tubo de ensaio é depositado 1 mL da cultura bacteriana em fase exponencial (DO = 0,6), 1 mL de bacteriófago diluído e 1 mL de meio LB semissólido aquecido até 45°C. O conteúdo do tubo é homogeneizado usando agitador automático do tipo Vortex e depois despejado em placas de petri que já contêm LB sólido. Todas são identificadas e incubadas em estufa a 37°C. Após 12h, as UFPs de cada bacteriófago isolado foram contabilizadas e o título de cada um foi determinado através da Equação 3.

$$\text{Equação 3: } UFP/mL = \frac{N^{\circ} \text{ de Placas de Lise}}{\text{Diluição} \times \text{Volume do Inóculo (mL)}}$$

A titulação dos bacteriófagos utilizados foi realizada por colaboradores do LVA que utilizaram as mesmas amostras para pesquisas próprias. Assim, a Tabela 1 apresenta a titulação das amostras mães, das quais foram feitas alíquotas para o presente estudo.

Tabela 1 - Titulação dos bacteriófagos utilizados no presente trabalho.

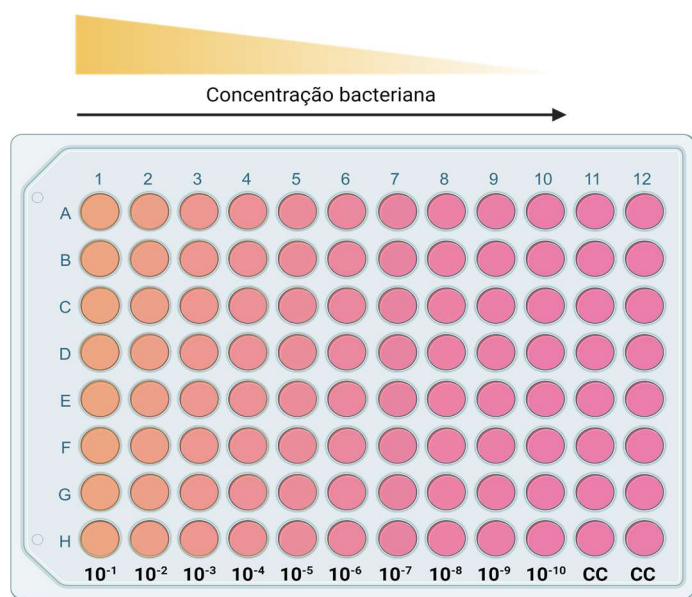
Nome do bacteriófago	Titulação (UFP/mL)
PAPB2	2×10^{13}
PAPB5	$3,2 \times 10^{10}$
PAPB7	6×10^{11}
PAT4	$1,8 \times 10^{10}$
PAS2	2×10^{11}

Fonte: Tabela gerada pela autora.

3.8 Determinação da Tolerância Celular a *P. aeruginosa*

Para determinar o intervalo de tolerância entre *P. aeruginosa* e o fibroblasto murino L929, foram primeiramente realizadas 10 diluições seriadas (de 10^{-1} até 10^{-10}) de *P. aeruginosa* em microtubos contendo 900 μL de MEM+1% SFB. Posteriormente, 50 μL de cada diluição bacteriana foi inoculada nas respectivas cavidades, como demonstra a Figura 3. Por fim, cada cavidade foi completada com o mesmo meio celular a fim de obter o volume final de 200 μL .

Figura 3 - O desenho experimental da placa para determinar a tolerância dos fibroblastos L929 frente a diferentes concentrações de *P. aeruginosa*. CC é o controle celular.



Fonte: Imagem gerada pela autora.

Após 24h e 48h, fez-se a leitura da sobrevivência celular através da observação de cada cavidade pelo microscópio óptico de luz invertido Olympus® IX71 no aumento efetivo

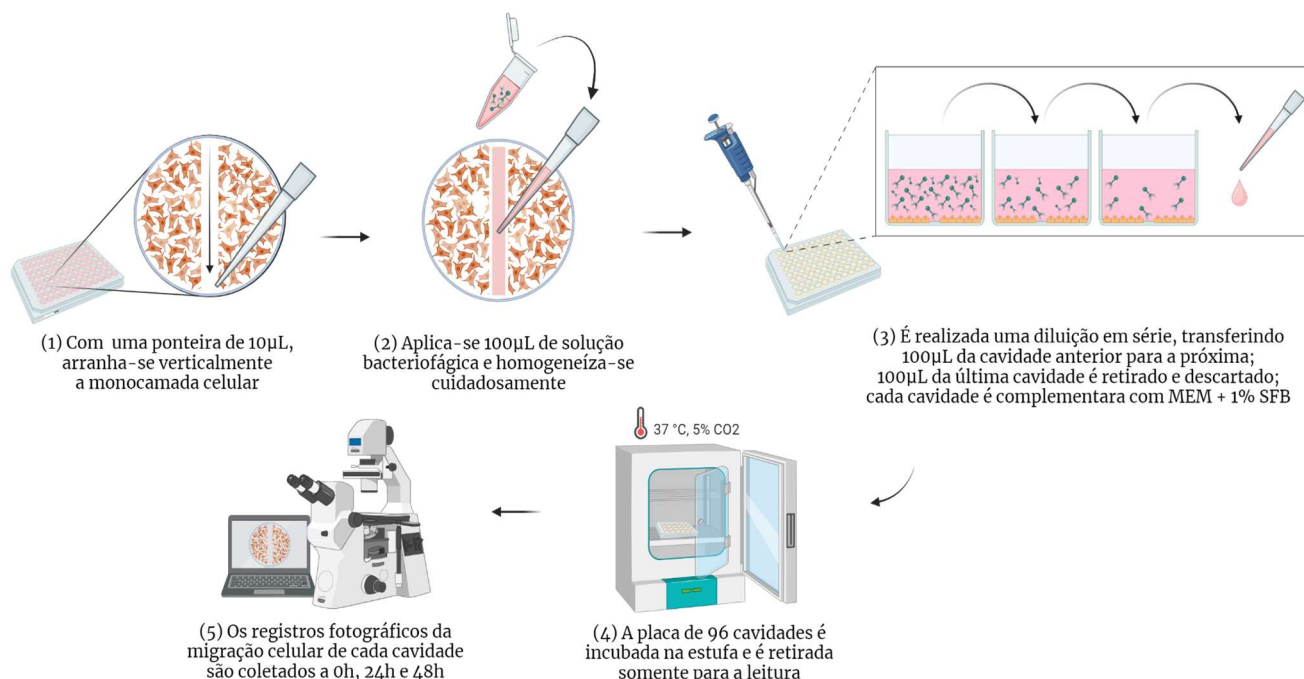
de 40 vezes. Cavidades que apresentavam morfologias atípicas de fibroblastos L929 foram consideradas intolerantes a suas concentrações iniciais de *P. aeruginosa*.

3.9 *Scratch* em Cultura Celular com Bacteriófagos

Visando determinar o efeito da solução bacteriófágica na migração de fibroblastos murinos L929, foram feitos ensaios de *scratch*. Para tal, inicialmente foi feita a diluição seriada dos bacteriófagos em microtubos com 900 μL de meio de manutenção celular (MEM+1% SFB) a fim de obter a mesma concentração aproximada de 10^9 UFP/mL de cada bacteriófago no estoque de uso. O controle negativo de toxinas foi previamente preparado como descrito na seção 3.6, e em seguida diluído 10 e 10^3 vezes em meio celular de manutenção. Em seguida, foi feito o *scratch* em uma placa de 96 cavidades, como descrito na seção 3.2.

Após isto, em cada primeira cavidade foi adicionado 100 μL da solução bacteriófágica preparada, o conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado e 100 μL deste foi transferido para a próxima cavidade, obtendo uma diluição em série. Esta etapa foi repetida mais uma vez, e 100 μL da última cavidade foi retirado e descartado. Cada cavidade foi completada com 100 μL de meio de manutenção celular e mantida na estufa a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 . A Figura 4 demonstra as etapas do experimento.

Figura 4 – Fluxograma do experimento de *scratch* com adição de bacteriófagos.



Fonte: Imagem gerada pela autora.

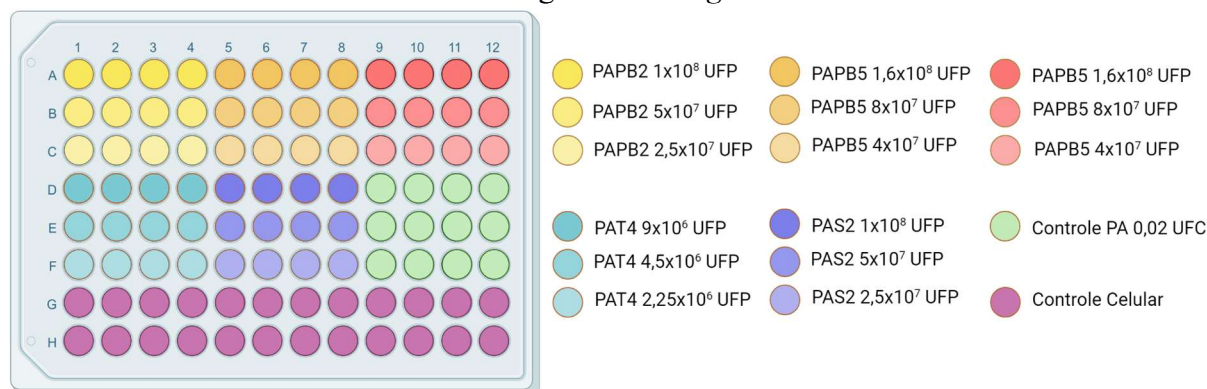
Os registros fotográficos de cada cavidade foram feitos a 0h, 24h e 48h após a realização do *scratch*. O experimento foi executado duas vezes independentes.

3.10 *Scratch* em Cultura Celular com Bacteriófagos e *P. aeruginosa*

Tendo em vista que trabalhos prévios demonstraram a efetividade dos bacteriófagos isolados no controle de crescimento de *P. aeruginosa* (43, 44), o teste de controle bacteriano foi feito diretamente em cultura celular. Para tal, inicialmente foi feita a diluição seriada dos bacteriófagos e da *P. aeruginosa* em meio de cultivo celular (MEM+1% SFB) a fim de obter uma concentração aproximada de 10^9 UFP/mL de cada bacteriófago e de 3,56 UFC/mL e 0,35 UFC/mL da bactéria no estoque de uso. Em seguida, foi feito o *scratch* em uma placa de 96 cavidades, como descrito na seção 3.2.

Primeiramente, foram feitas diluições seriadas das soluções bacteriofágicas como descrito na seção 3.9. Logo depois, adicionou-se 50 μ L da solução bacteriana na concentração 0,35 UFC/mL, e o conteúdo de cada cavidade foi completado até 200 μ L com meio de cultivo celular. A Figura 5 demonstra o desenho da placa (as UFP e UFC estão em números totais por cavidade).

Figura 5 - O desenho experimental da placa para o ensaio de *scratch* com adição de bacteriófagos e *P. aeruginosa*.



Fonte: Imagem gerada pela autora.

Os registros fotográficos de cada cavidade foram feitos a 0h, 24h e 48h após a realização do *scratch*. O experimento foi executado duas vezes independentes.

Para complementar os resultados obtidos, este experimento foi repetido mais duas vezes independentes com a concentração bacteriana maior, de 3,56 UFC/mL. Neste caso, os registros fotográficos de cada cavidade foram feitos a 0h, 16h, 24h e 40h após a realização do *scratch*.

4. RESULTADOS

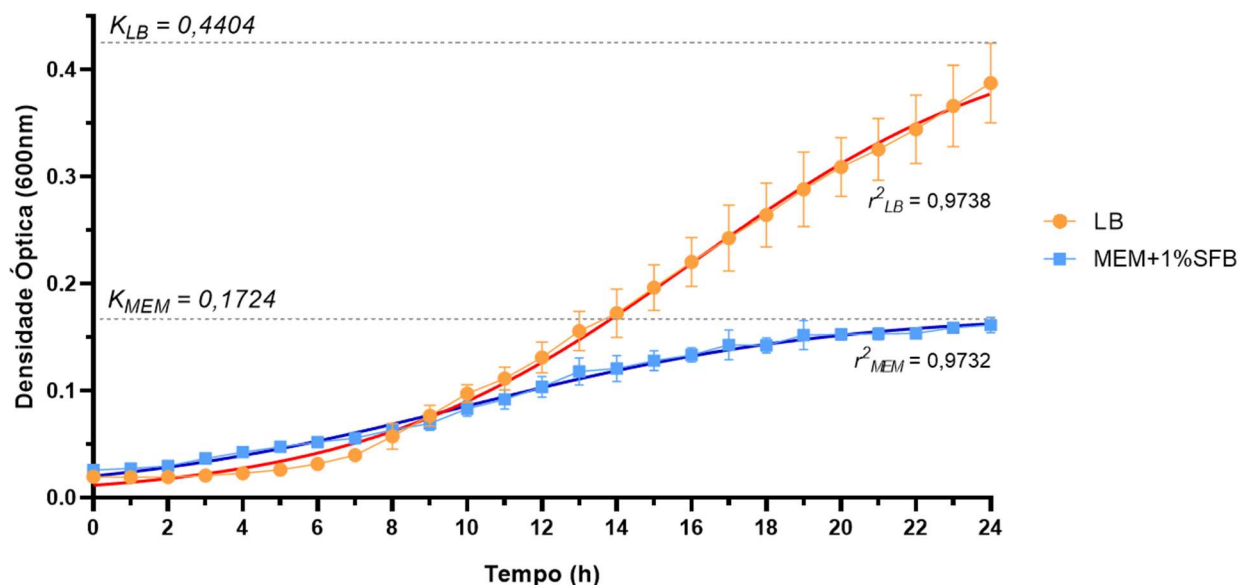
4.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia de *P. aeruginosa*

A partir dos dados brutos da Contagem de Unidades de Colônias, obteve-se a média de $3,56 \cdot 10^8$ UFC/mL no estoque de uso.

4.2 Comparação das Curvas de Crescimento de *P. aeruginosa*

Com base na absorbância de *P. aeruginosa*, foram construídas curvas de crescimento logístico e exponencial; entretanto, para fins didáticos, serão apresentadas somente as curvas de crescimento logístico da primeira diluição bacteriana, cujo inóculo inicial equivalia a $3,56 \cdot 10^7$ UFC/mL. Como demonstra o Figura 6, ambas as curvas tendem a um platô, e a projeção da capacidade suporte (K) corresponde a 0,44 para LB (95 IC; 0,4162 a 0,4704) e 0,17 para MEM+1% SFB (95 IC; 0,1678 a 0,1775), com $r^2 \cong 0,97$ para ambas as curvas. É interessante notar que a taxa de crescimento relativa ao tamanho (k) é próxima para ambas as curvas, sendo 0,21-0,24 para LB e 0,19-0,21 para MEM+1% SFB.

Figura 6 – Gráfico demonstrando as curvas de crescimento logístico de *P. aeruginosa* em meios LB (laranja) e MEM+1%SFB (azul), ao longo de 24h, com leituras a cada hora, a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. K é o valor projetado da capacidade suporte.



Fonte: Gráfico gerado pela autora.

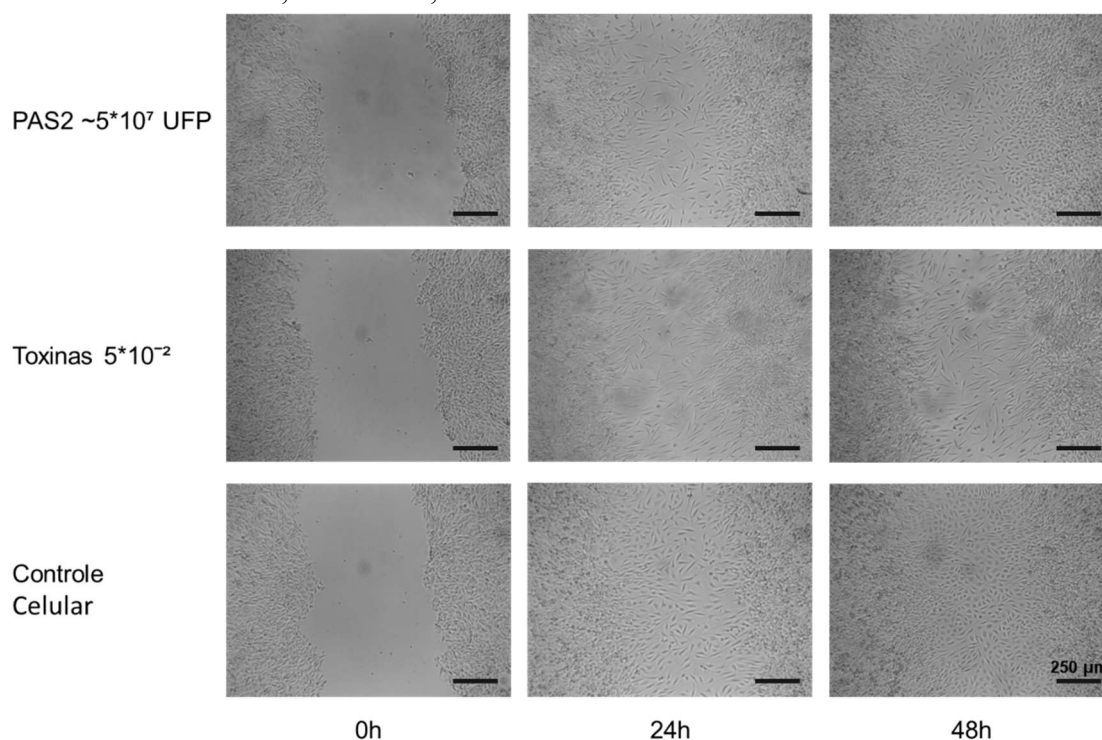
4.3 Determinação da Tolerância Celular a *P. aeruginosa*

As células L929 em monocamada toleraram apenas 3,56 UFC/mL de *P. aeruginosa* durante 24h de exposição, o que corresponde a uma média $\sim 0,18$ UFC de inóculo inicial em cada cavidade de cultivo. Não houve sobrevivência celular na presença de concentrações bacterianas maiores.

4.4 Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e de Toxinas Bacterianas

A Figura 7 demonstra os registros fotográficos do controle celular, do controle negativo Toxinas $5 \cdot 10^{-2}$ e do grupo tratamento PAS2 $\sim 5 \cdot 10^7$ UFP. Os registros foram feitos a 0h, 24h e 48h. Pode-se observar que a morfologia dos fibroblastos L929 na presença de toxinas bacterianas é distinta da morfologia do controle celular, sendo que há muito mais células fusiformes e alongadas após 48h.

Figura 7 - Os registros fotográficos do *scratch* com adição de bacteriófagos ou toxinas bacterianas, feitos a 0h, 24h e 48h. Aumento efetivo de 40x.

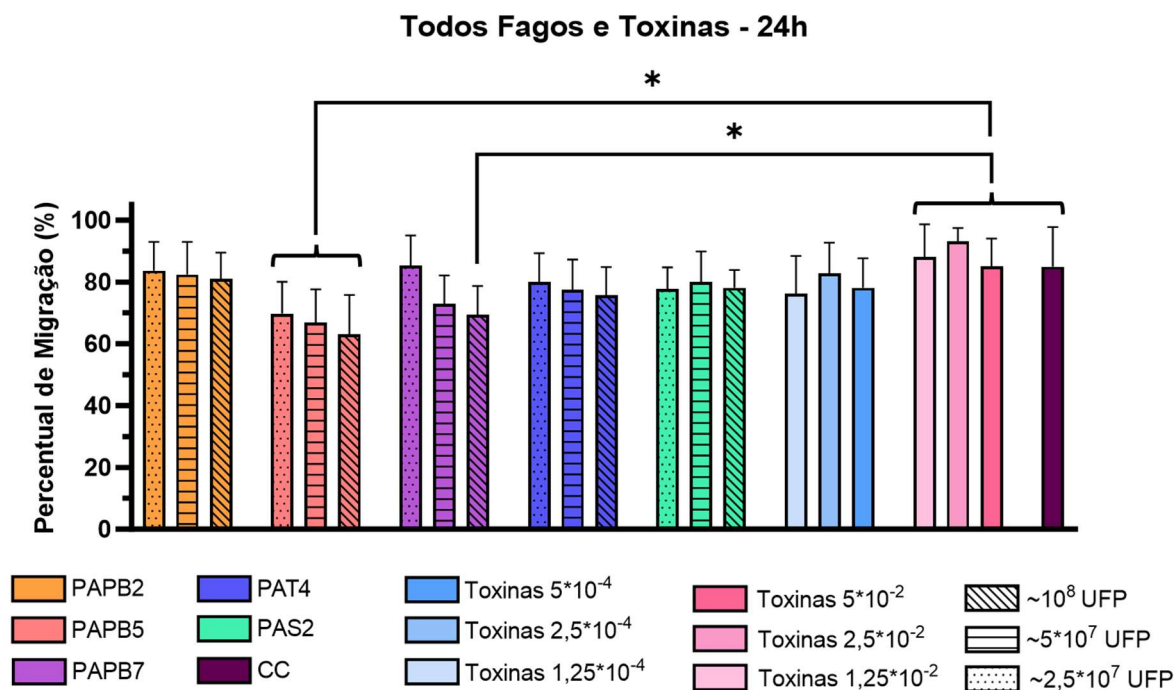


Fonte: Imagens geradas pela autora.

Após 24h, não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos controles Toxinas 10^{-4} , Toxinas 10^{-2} e Controle Celular (CC). Entretanto, estes últimos dois grupos apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) de migração celular quando tratadas com todas as concentrações do bacteriófago PAPB5, bem como com maior concentração de PAPB7 (PAPB7

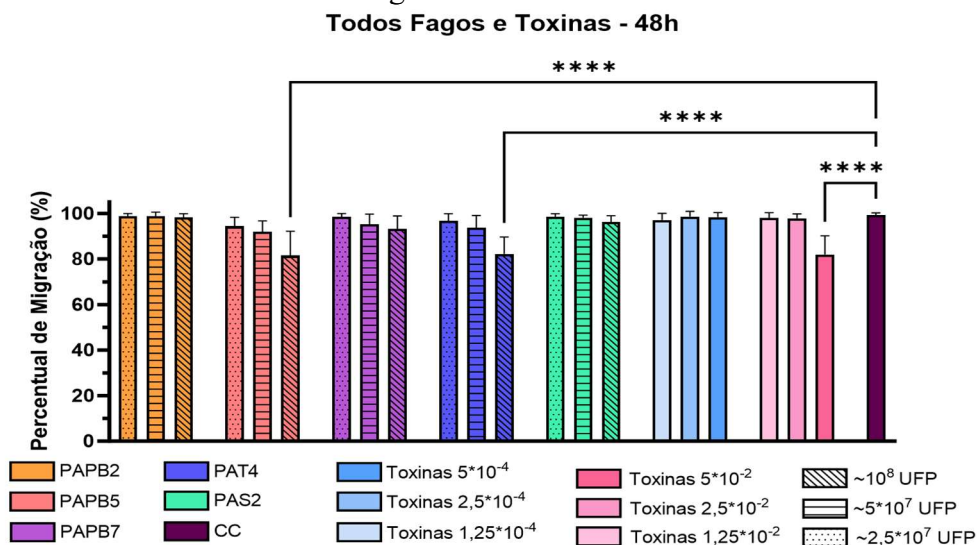
$\sim 10^8$ UFP). Quanto a comparação dentro dos grupos, somente PAPB7 teve diferença ($p < 0,01$) entre as suas maiores ($\sim 10^8$ UFP) e menores ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP) concentrações (não mostrado na Figura 8).

Figura 8 - Percentual de migração de L929 após 24h frente a adição de bacteriófagos ou toxinas bacterianas.



Por sua vez, a Figura 9 demonstra a migração celular após 48h. Nesta, destacam-se os grupos PAPP5 $\sim 10^8$ UFP, PAT4 $\sim 10^8$ UFP e Toxinas $5 \cdot 10^{-2}$, todos em maiores concentrações, por apresentarem os piores percentuais de migração ($81 \pm 1\%$) se comparados com o CC ($p \leq 0,01$). Nenhum outro grupo teve diferença significativa com o CC. Destacam-se os bacteriófagos PAPP2 e PAS2 que levaram $> 95\%$ de cicatrização em todas as suas concentrações. É interessante notar que no grupo Toxinas $5 \cdot 10^{-2}$ houve um impedimento de migração celular, tendo uma queda de $85,16\%$ a 24h para $81,95\%$ após 48h.

Figura 9 - Percentual de migração do fibroblasto L929 após 48h frente a adição de bacteriófagos ou toxinas bacterianas.

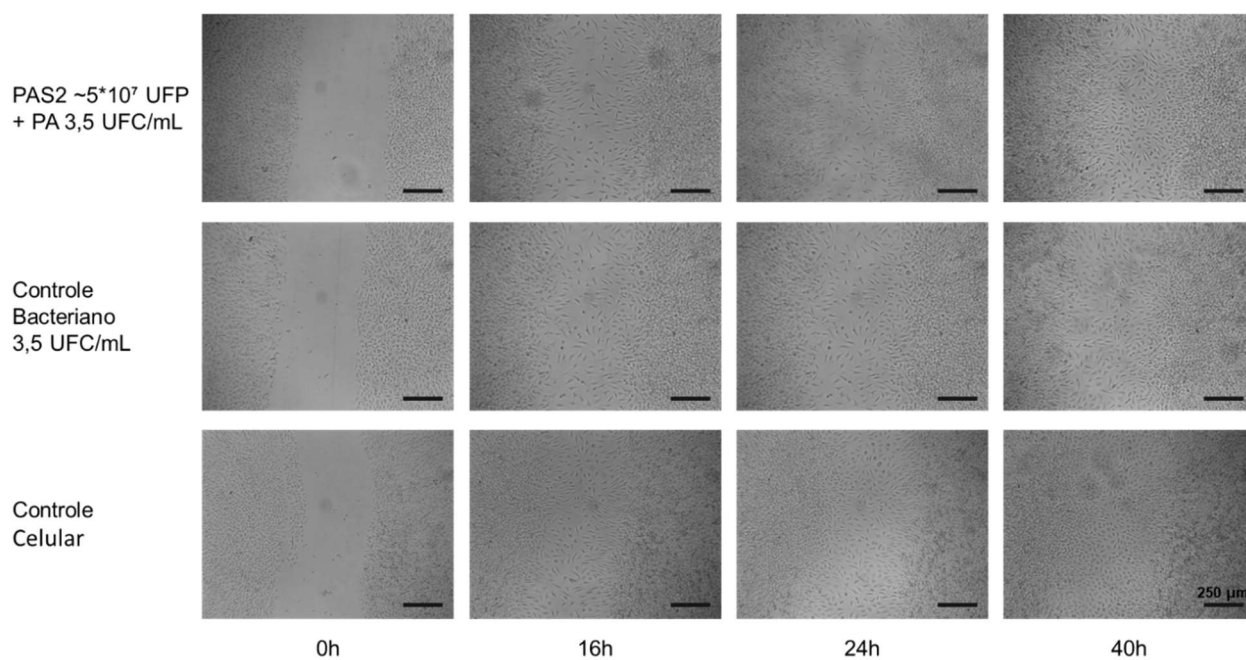


4.5 Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e *P. aeruginosa*

A Figura 10 apresenta os registros fotográficos do controle celular, e do grupo tratamento PAS2 $\sim 5 \times 10^7$ UFP e controle bacteriano na presença de *P. aeruginosa* a 3,5 UFC/mL. Os registros foram feitos a 0h, 16h, 24h e 40h. Pode-se observar que, após 16h, o controle celular já apresenta um maior fechamento do tapete celular e uma maior confluência.

Figura 7 - Os registros fotográficos do *scratch* com e sem o tratamento com bacteriófagos na presença de *P. aeruginosa* a 3,5 UFC/mL, feitos a 0h, 16h, 24h e 40h.

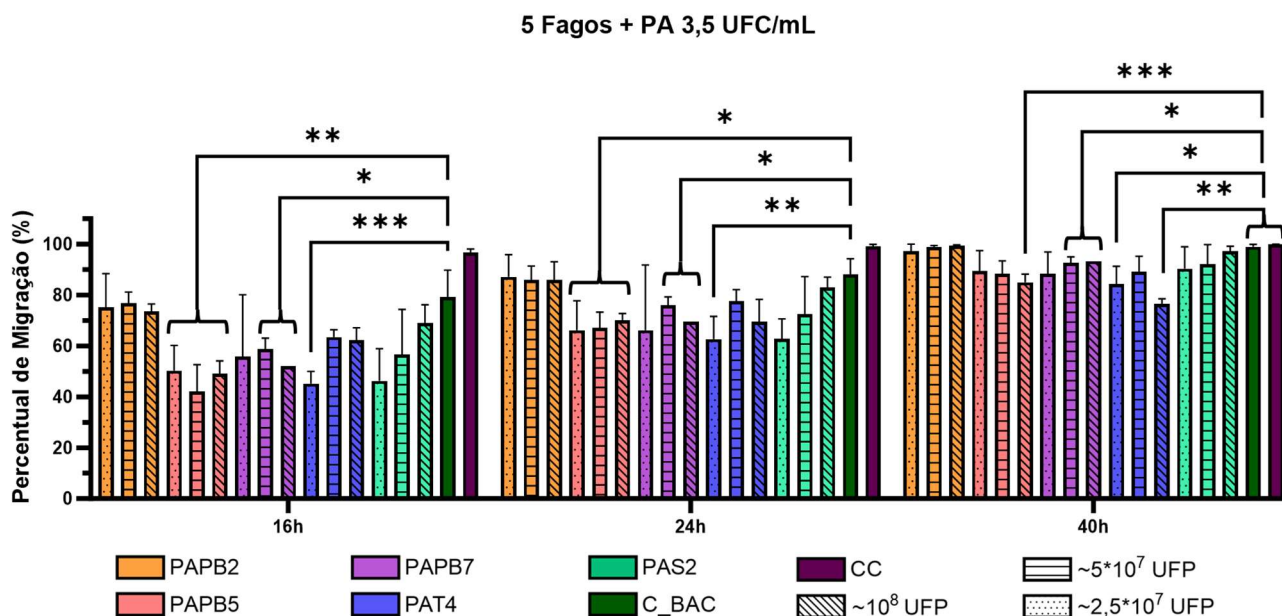
Aumento efetivo de 40x.



Fonte: Imagens geradas pela autora.

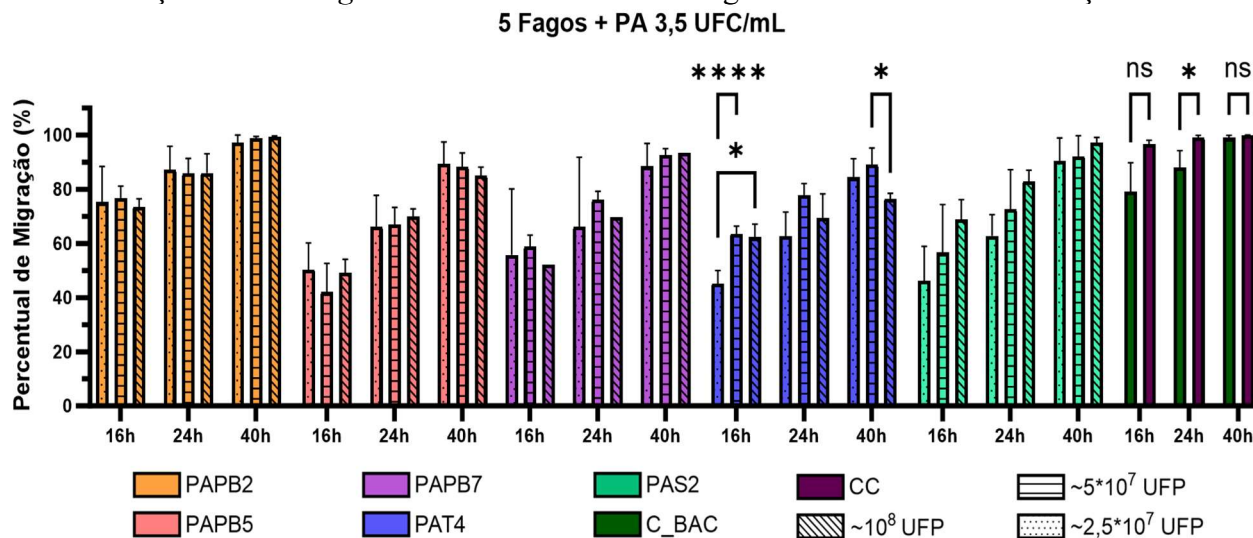
Analisaremos primeiramente a migração celular sob a maior concentração de 3,56 UFC/mL de *P. aeruginosa* na Figura 11. É interessante notar que o CC já após 16h apresentou 96,7% de fechamento da lesão, enquanto que o controle bacteriano (C_BAC) alcançou valores próximos (98,9%) somente após 40h de cicatrização. De modo geral, houve diferença estatística entre os grupos tratados e o CC em 16h e 24h. Nenhum tratamento com fago obteve uma média maior que do C_BAC em 16h (79%) e 24h (88%), porém o PAPB2 teve valores próximos de $75 \pm 2\%$ e $86 \pm 1\%$, respectivamente. Por fim, os piores percentuais de migração após 40h pertencem aos fagos PAPB2 (85%) e PAT4 (76,5%), ambos em maiores concentrações ($\sim 10^8$ UFP).

Figura 11 - Percentual de migração do fibroblasto L929 em 16h, 24h e 40h frente a adição de *P. aeruginosa* com ou sem bacteriófagos em diferentes concentrações.



A Figura 12 apresenta os mesmos dados, porém organizados por tipo de tratamento para uma melhor comparação dentro dos grupos. Desta forma, somente o fago PAT4 apresentou diferenças significativas em 16h e 40h. Destaca-se o bacteriófago PAS2 cujas médias de maior concentração ($\sim 10^8$ UFP) em todos os tempos acompanham as do C_BAC sem diferença significativa.

Figura 12 - Percentual de migração do fibroblasto L929 em 16h, 24h e 40h frente a adição de *P. aeruginosa* com ou sem bacteriófagos em diferentes concentrações.

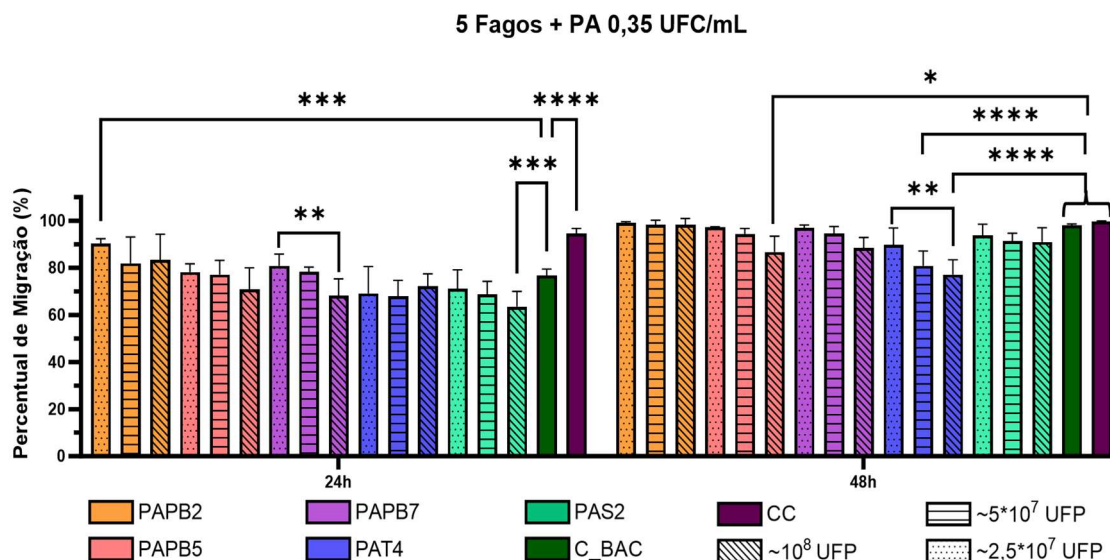


A migração celular na concentração de 0,35 UFC/mL de *P. aeruginosa*, após 24h o C_BAC (76,8%) foi significativamente distinto ($p < 0,0001$) do CC (94,6%), mas alcançou um valor de 98% de cicatrização após 48h, como mostra a Figura 13.

Em 24h, PAS2 apresentou o menor percentual de migração (63,5%), com diferença significativa ($p \leq 0,001$) com o C_BAC. Por outro lado, o grupo tratado com PAPB2 teve todas as suas médias acima do C_BAC, sendo que a sua menor concentração ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP) não teve diferença com o CC. Após 48h, os menores percentuais de migração foram dos grupos PAPB5 $\sim 10^8$ UFP (86,7%), PAT4 $\sim 5 \cdot 10^7$ (80,9%) e PAT4 $\sim 10^8$ UFP (77,2%).

Quanto à comparação interna dos tratamentos, somente os grupos tratados com PAPB7, em 24h, e PAT4, em 48h, tiveram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as suas maiores ($\sim 10^8$ UFP) e menores ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP) concentrações.

Figura 13 - percentual de migração do fibroblasto L929 em 24h e 48h frente a adição de *P. aeruginosa* com ou sem bacteriófagos em diferentes concentrações.



4.6 Migração Celular Mediada por Bacteriófago em 24h

Os dados compilados permitem analisar a migração celular frente ao tratamento com diferentes bacteriófagos em 24h. Entre os controles, somente o controle bacteriano PA 0,35 UFC/mL foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,0001$) do controle celular (Figura 14.A). O bacteriófago PAB2 (Figura 14.A) mostrou diferença somente na sua maior concentração (PAB2 $\sim 10^8$ UFP) em relação ao controle celular (CC). Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Todos os tratamentos usando o bacteriófago PAB5 (Figura 14.B) tiveram médias abaixo da média do controle bacteriano usando PA 3,5 UFC/mL, tendo diferenças significativas entre os grupos de tratamento Fago (todas as concentrações) e Fago + PA 3,5 UFC/mL (em concentrações $\sim 5 \cdot 10^7$ e $\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP).

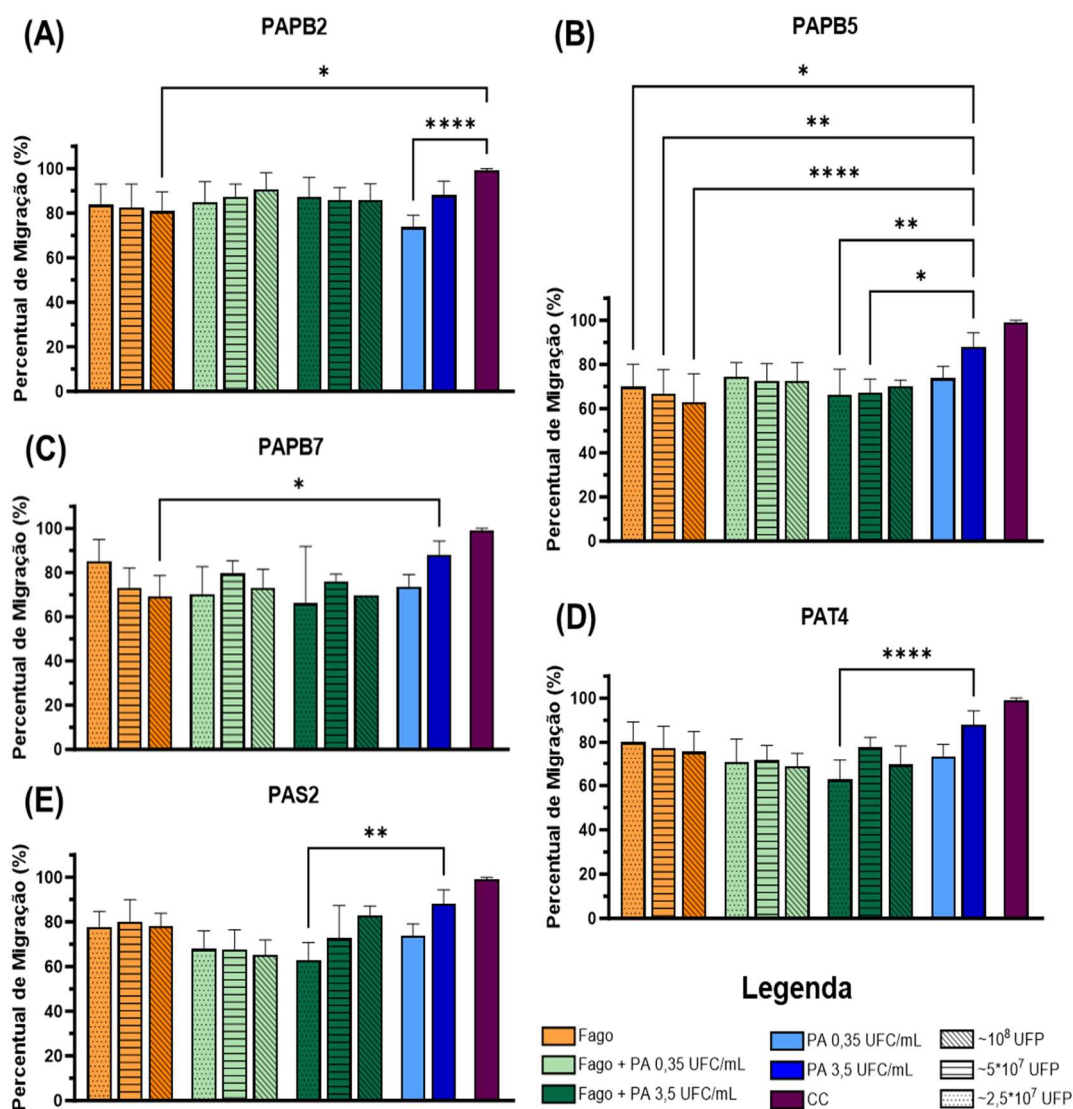
Quanto ao bacteriófago PAB7 (Figura 14.C), o grupo Fago na menor concentração ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP) não apresentou diferença estatística com o CC, mas média da sua maior concentração (PAB7 $\sim 10^8$ UFP) foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor que a do controle de PA 3,5 UFC/mL

Todos os tratamentos com o bacteriófago PAT4 (Figura 14.D) apresentaram médias inferiores à do controle bacteriano PA 3,5 UFC/mL, com diferença significativa ($p \leq 0,0001$) somente no grupo Fago + PA 3,5 UFC/mL na menor concentração ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP).

Por último, sobre o PAS2 (Figura 14.E), o tratamento Fago + PA 3,5 UFC/mL na maior concentração do fago ($\sim 10^8$ UFP), porém a sua menor concentração ($\sim 2,5 \cdot 10^7$ UFP) do mesmo tratamento com o controle bacteriano PA 3,5 UFC/mL.

De forma geral, em 24h, nenhum fago apresentou ação cicatrizante superior ao controle celular, e as médias de todos os tratamentos com fagos se mantiveram próximas ou inferiores a média do controle bacteriano PA 3,5 UFC/mL (88%). Não houve nenhuma diferença significativa entre os 3 grupos de tratamento (Fago, Fago + PA 0,35 UFC/mL e Fago + 3,5 UFC/mL).

Figura 7 - Percentual de migração celular após 24h com ou sem a presença de *P. aeruginosa* em diferentes concentrações referente a cada bacteriófago: (A) PAPB2; (B) PAPB5; (C) PAPB7; (D) PAT4; (E) PAS2. A Legenda é comum a todos os Figuras; CC para controle celular; PA para *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Gráficos gerados pela autora.

5. DISCUSSÃO

5.1 Curva de Crescimento

O meio celular MEM possui características físico-químicas distintas do meio microbiológico LB, o que afeta tanto o crescimento bacteriano, como os parâmetros de leitura da sua espectrofotometria. Wijesinghe e colaboradores, por exemplo, analisaram as curvas de crescimento de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em meio celular RPMI 1640 e meio microbiológico LB a 492nm (45), um comprimento de onda distinto do empregado na metodologia do presente trabalho. Analisando mais a fundo, percebeu-se que os meios celulares como MEM, DMEM e RPMI comumente possuem o corante vermelho de fenol, que é um indicador de pH. Ou seja, exatamente esta modificação de cor dependente do pH do meio que interfere na leitura de espectrofotometria (46). Por outro lado, o trabalho do Paul Held demonstra que as absorvâncias do DMEM em pHs abaixo de 7,0 a 600 nm têm valores muito próximos (46). Portanto, considerando que o pH inicial do meio MEM+1% SFB é 7,0, e que o crescimento de *P. aeruginosa* resulta em uma acidificação do meio, optou-se por manter a leitura de DO a 600nm.

Quanto às curvas de crescimento geradas, somente a concentração inicial de $3,56 \cdot 10^7$ UFC/mL de *P. aeruginosa* conseguiu apresentar crescimento logístico em ambos os meios, sendo que suas concentrações menores apresentaram crescimento exponencial em pelo menos um dos meios, não sendo possível, assim, a sua comparação. Entretanto, as projeções do valor de K diferem consideravelmente entre si, mesmo sendo um crescimento a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$); a razão entre K_{LB} e K_{MEM} é de 2,59, sugerindo assim que o segundo meio (MEM+1% SFB) é mais limitante para o crescimento bacteriano.

Estes dados corroboram com a literatura, sugerindo que a composição de meios celulares como MEM, DMEM e RMPI contém muito mais aminoácidos do que carboidratos simples (45). Por exemplo, o meio utilizado MEM contém 1g/L de glicose (47) como fonte de carbono, enquanto o LB contém pelo menos 2 vezes mais ($>2\text{g/L}$) devido principalmente ao extrato de levedura presente na sua composição. Desta forma, os meios para cultura celular suportam um crescimento bacteriano, porém este é muito mais lento e limitado se comparado com os meios microbiológicos.

Tal informação é importante para a criação de um modelo experimental entre células eucarióticas e bactérias, visto que delimita melhor a escolha das linhagens e espécies para um cocultivo. É muito importante se ater a velocidade de migração/proliferação celular (no caso

do *scratch*, o tempo de fechamento da “cicatriz”) e a curva de crescimento da bactéria escolhida no meio de cultivo celular, pois o seu metabolismo muda de acordo com a disponibilidade de nutrientes. Assim, em cenário ideal, procura-se obter o fechamento do *scratch* antes da bactéria atingir a fase estacionária, o que simularia uma infecção inicial no tecido danificado. Como, por exemplo, foram feitos experimentos de tolerância célula-bactéria com Fibroblastos Gengivais Humanos (HGFs), linhagem finita, no começo da adaptação do modelo experimental, porém esta linhagem não se sustentou pois o tempo de fechamento do *scratch* era maior do que o tempo de *P. aeruginosa* atingir a fase estacionária.

5.2 Tolerância Celular a *P. aeruginosa*

A avaliação da tolerância de L929 a *P. aeruginosa* deve ser interpretada frente à capacidade desta bactéria a formar biofilmes. Mas e colaboradores demonstraram que já nos estágios iniciais, *P. aeruginosa* sintetiza uma matriz fibrosa de polissacarídeo Psl que fica ancorado à superfície bacteriana, promovendo contato e interação entre as bactérias e criação de agregados de células planctônicas (48). Desta forma, é muito provável que uma UFC foi originada não somente de 1 célula viável, mas de um agregado bacteriano. Assim, o experimento de tolerância celular indicou que ~0,18 UFC contém bactérias viáveis para a colonização da cavidade. Portanto, pode-se supor que há pelo menos 10 vezes mais células bacterianas viáveis no estoque de uso do que as UFC. Ademais, o número de células fibroblásticas no momento da inoculação da bactéria provavelmente estava entre $2 \cdot 10^4$ e $3 \cdot 10^4$ células por cavidade, já que a cada 14-24h elas se duplicam (49).

É importante apontar que a metodologia utilizada apresenta algumas limitações, como: o erro experimental de pipetagem, onde não podemos ter certeza de quantas células bacterianas viáveis de fato foram postas em cada cavidade; e a probabilidade das bactérias pipetadas já dentro das cavidades morrerem ou entrarem em estado de senescência por causa do ambiente pobre em carboidratos simples ou dos metabólitos liberados pelos fibroblastos. Portanto, para mitigar esta incerteza, foram utilizadas duas concentrações de *P. aeruginosa* no ensaio de *scratch*, a de 3,56 UFC/mL e de 0,35 UFC/mL. Desta forma, uma cavidade semeada com 10^4 células viáveis de L929 tolera um inóculo inicial ~1-10 células de *P. aeruginosa* por pelo menos 24h.

5.3 Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e de Toxinas Bacterianas

Um dos maiores gargalos do presente trabalho foi a purificação dos bacteriófagos, já que a sua solução não é livre das toxinas de *P. aeruginosa*, e para aplicações em células vivas, mesmo que *in vitro*, deve-se ter um certo grau de pureza. Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos), o limite de endotoxinas em fármacos de via intravenosa é estabelecido em 5,0 EU/kg ou 0,5 EU/ml (1 *Endotoxin Unit* (EU) é equivalente a aproximadamente 0,1-0,2 ng de endotoxinas/mL) (50, 51), e o mesmo limite é recomendado para manutenção de culturas celulares (52). As endotoxinas, ou os lipopolissacarídeos (LPSs), são macromoléculas presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, como é o caso de *P. aeruginosa*. Elas são citotóxicas e são usadas em culturas celulares com ação pró-inflamatória, portanto, deve-se evitar a sua presença nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Kutlu e colaboradores, por exemplo, indica que na presença de 1 µg/mL de LPS a proporção de células L929 viáveis após 24h em relação ao grupo controle decai até 64.39% (53).

Quanto à migração celular, PAPB5 e PAT4 na maior concentração ($\sim 10^8$ UFP) tiveram as menores taxas de migração (81,49% e 82,22%, respectivamente), que equivaliam à de Toxinas $5 \cdot 10^{-2}$ (81,95%), sugerindo uma concentração semelhante de toxinas entre estes grupos. Isso pode se dar ao fato de alguns bacteriófagos possuírem a espícula caudal (*tailspike proteins*) que se liga a parte mais externa do LPS, ao antígeno O, para fins de adsorção. Em uma solução com bactérias lisadas há muitos LPSs livres que acabam se ligando aos fagos (54). E já que a porção citotóxica do LPS é o Lipídeo A que fica na outra extremidade, é provável que a solução bacteriofágica carregue mais endotoxinas do que a solução de controle negativo.

Por mais que nenhum bacteriófago apresentou ação cicatrizante em 24h, pelo menos 3 fagos (PAPB2, PAPB7 e PAS2) conseguiram atingir o patamar do controle celular após 48h. Levando em consideração que há muito mais relatos na literatura da ação anti-inflamatória dos fagos (55), é plausível hipotetizar que, com uma purificação melhor e diminuição na concentração de LPSs, os bacteriófagos testados teriam taxas de migração celular melhores do que as presentes.

5.4 Migração Celular na Presença de Bacteriófagos e *P. aeruginosa*

É importante relembrar que a concentração de 0,35 UFC/mL de *P. aeruginosa* foi testada partindo da premissa que havia $\sim 10^9$ bactérias viáveis no estoque de uso. Assim, por mais que o controle bacteriano apresentou diferença significativa com o controle celular e até o PAPB2 $\sim 2,5 \cdot 10^7$ em 24h, as suas médias não são significativamente distintas das dos

bacteriófagos. Portanto, concentrações menores que 3,56 UFC/mL, ou $\sim 0,18$ UFC por cavidade, são muito suscetíveis ao erro experimental e não são recomendados para a validação dos dados.

Quanto à concentração de 3,56 UFC/mL de *P. aeruginosa*, é interessante notar que a presença de bactéria diminui consideravelmente a velocidade de migração celular e retarda o fechamento total do *scratch* por pelo menos 24h. Isso se deve a ação pró-inflamatória das bactérias que podem liberar metabólitos citotóxicos no meio externo, como LPSs, Exotoxina A ou proteases (56, 57), ou mesmo através do contato direto com as células eucarióticas por pili ou LPSs que possibilita até uma internalização no ambiente intracelular (58). Possivelmente existe um limiar de tolerância celular a todos estes fatores citotóxicos.

5.5 Migração Celular por Bacteriófago em 24h

Os bacteriófagos possuem várias estratégias de interação tanto com bactérias como com células eucarióticas. Estudos demonstram que bacteriófagos não afetam a migração dos monócitos e granulócitos humanos (55), porém diminuem a migração em linhagens tumorais como melanoma humano Hs294T (59). Os fagos também possuem altos percentuais de propagação e mutabilidade, gerando assim após um único ciclo replicativo várias cópias distintas do bacteriófago original. Isso interfere da sua interação com o meio, e pode facilmente trocar a sua estratégia de lítica para lisogênica (30). Portanto, é necessário observar o seu papel sob duas perspectivas: na capacidade anti-inflamatória com células eucarióticas, e na sua interação com as bactérias hospedeiras (34).

Analisando os dados por bacteriófago, podemos afirmar que nenhum apresentou ação cicatrizante. Ademais, quando se juntavam com a maior concentração bacteriana (PA 3,5 UFC/mL), geralmente tinham percentuais menores de migração. Pode-se imaginar que isso seria resultado de acúmulo de toxinas presentes em ambas as soluções de bactérias e de fagos. Por outro lado, PAPB2 demonstrou algum potencial na migração celular, pois os tratamentos tiveram valores muito próximos ao controle celular, mesmo na presença de bactérias. Já, células tratadas com PAS2 apresentaram os percentuais promissores de migração na presença de 3,5 UFC/mL de *P. aeruginosa*, sendo que maior dose do fago também resultou em maior migração celular.

É difícil prever a interação fago-bactéria em uma cultura celular usando somente o microscópio óptico. Estudos anteriores com os mesmos isolados demonstram que os fagos conseguem controlar a curva de crescimento bacteriana (43, 44), porém em cultura celular

entram outros fatores a serem analisados, como a modificação de virulência bacteriana após esta interação. O modelo de ferida crônica *in vitro* demonstrou que fagos adicionados conjuntamente com *P. aeruginosa* conseguem impedir a proliferação bacteriana (60). Outro cenário a ser considerado é que a *P. aeruginosa* é capaz de invadir células epiteliais (32, 61), assim como os bacteriófagos, mas pouco se sabe sobre a sua interação no ambiente intracelular, onde as condições do meio são bem distintas das do meio extracelular.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a possibilidade da criação de modelo celular *in vitro* para avaliação da migração celular na presença de *Pseudomonas aeruginosa* e de bacteriófagos utilizando a técnica de *scratch* em linhagem de fibroblastos murinos L929. Este modelo tem potencial de se estender para o uso de outras linhagens celulares, espécies bacterianas e bacteriófagos ou outros agentes antibacterianos.

Verificou-se que 10^4 células viáveis de fibroblastos L929 toleram um inóculo inicial ~1-10 células (3,56 UFC/mL) de *P. aeruginosa* por pelo menos 24h, e que o meio celular MEM+1% SFB limita em pelo menos 2 vezes o crescimento bacteriano do que o meio microbiológico LB, especialmente devido a sua alta concentração de aminoácidos e pouca de fontes de carboidratos.

A presente metodologia de semeadura de bactérias em cultura celular demonstrou-se limitante, porém inovadora devido a ausência de registros bibliográficos anteriores de cultivo de bactérias em cultura celular por mais de 24h.

A migração celular na presença somente de bacteriófagos filtrados mostrou-se promissora, com percentuais próximos ao controle celular após 48h. Estima-se que estes valores são mais dependentes das concentrações de toxinas, em especial os LPSs, do que dos bacteriófagos; uma purificação mais eficiente poderá diminuir esta interferência nos valores.

Por fim, houve demonstração de diferentes percentuais de migração celular frente a presença de *P. aeruginosa* e bacteriófagos, porém estas sempre abaixo do controle celular. Nenhum bacteriófago apresentou ação cicatrizante, entretanto o PAPB2 e PAS2 se mostraram como candidatos promissores para estudos futuros, já que estimularam a migração de L929, mesmo na presença de toxinas bacterianas e *P. aeruginosa*. Um maior número de experimentos é necessário para a validação estatística do presente modelo, bem como o uso de bacteriófagos purificados e estritamente líticos como um controle positivo em futuras análises.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.
2. MURRAY, C. J. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 19 jan. 2022.
3. O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.** Archives of Pharmacy Practice, v. 7, n. 3, p. 110, maio 2016. Disponível em: <<https://apo.org.au/node/63983>>.
4. PITTET, D.; DONALDSON, L. Clean Care is Safer Care: a worldwide priority. **The Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1246–1247, out. 2005.
5. IREK, E. O. et al. A systematic review of healthcare-associated infections in Africa: An antimicrobial resistance perspective. **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 7, n. 2, 6 dez. 2018.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lack of innovation set to undermine antibiotic performance and health gains.** Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains>>.
7. LAZARETTI, A. et al. RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA AOS ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, p. 10–19, 10 out. 2022.
8. BUSH, L. M. et al. **INFECÇÕES POR PSEUDOMONAS.** Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/infecções/infecções-bacterianas-bactérias-Gram-negativas/infecções-por-pseudomonas>.
9. GONÇALVES, B. S.; SILVA. Principais aspectos da Pseudomonas aeruginosa – revisão bibliográfica. **Pucgoias.edu.br**, 2021.
10. OVERBYE, K.; BARRETT, J. Antibiotics: Where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 2005.
11. PALMER, A. C.; ANGELINO, E.; KISHONY, R. Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance. **Nature chemical biology**, v. 6, n. 2, p. 105–107, 1 fev. 2010.
12. CZAPLEWSKI, L. et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 239–251, fev. 2016.
13. SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356–361, set. 2005.
14. WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127–181, maio 2004.

15. ACKERMANN, H.-W. Bacteriophage Taxonomy. **Microbiology**, Australia, p. 90-94, 2011. Disponível em: https://health.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages_Taxonomy_2011-Ackermann.pdf. Acesso em: 04 nov. 2023.
16. LEFKOWITZ, E. J. et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D708–D717, 13 out. 2017.
17. OFIR, G.; SOREK, R. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1260–1270, mar. 2018.
18. ELOIS, M. A. et al. Bacteriophages as Biotechnological Tools. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 349, 1 fev. 2023.
19. MAGILL, D. J. et al. Localised genetic heterogeneity provides a novel mode of evolution in dsDNA phages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13731, 23 out. 2017.
20. LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 162, 6 ago. 2017.
21. FU, W. et al. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 397–404, 1 jan. 2010.
22. CHAN, Benjamin K.; SISTROM, Mark; WERTZ, John E.; KORTRIGHT, Kaitlyn E.; NARAYAN, Deepak; TURNER, Paul E.. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**. [S.L.], 26 maio 2016. p. 1-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep26717>. Acesso em: 11 dez. 2021.
23. BOJANA. **The Potential of Bacteriophages in Drug Delivery**. Disponível em: <https://www.fixed-phage.com/blog/the-potential-of-bacteriophages-in-drug-delivery/#:~:text=Recently%2C%20evidence%20has%20emerged%20describing>. Acesso em: 15 nov. 2023.
24. YOSEF, I. et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 23, p. 7267–7272, 18 maio 2015.
25. DRULIS-KAWA, Z. et al. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 699–722, 1 dez. 2012.
26. POŁASKA, M.; SOKOŁOWSKA, B. Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry. **AIMS microbiology**, v. 5, n. 4, p. 324–346, 2019.
27. D'HERELLE, F. Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). **CR Soc. Biol.** 81:1160-2, 1918.
28. YANG, Q. et al. Regulations of phage therapy across the world. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 6 out. 2023.

29. ALMEIDA, G. M. DE F.; SUNDBERG, L.-R. The forgotten tale of Brazilian phage therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. e90–e101, 1 maio 2020.
30. PRINCIPI, N.; SILVESTRI, E.; ESPOSITO, S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 8 maio 2019.
31. HUNSTAD, D. A.; JUSTICE, S. S. Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic Escherichia coli. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 203–221, 13 out. 2010.
32. PENARANDA, C.; CHUMBLER, N. M.; HUNG, D. T. Dual transcriptional analysis reveals adaptation of host and pathogen to intracellular survival of Pseudomonas aeruginosa associated with urinary tract infection. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 4, p. e1009534, 26 abr. 2021.
33. GARZONI, C.; KELLEY, W. L. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59–65, fev. 2009.
34. VAN BELLEGHEM, J. et al. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 10, 25 dez. 2018.
35. SWANN, Garry. **The skin is the body's largest organ**. Editorial, Journal of Visual Communication in Medicine, 33:4, p. 148-149. Dez. 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/17453054.2010.525439?journalCode=ijau20>. Acesso em: 28 maio 2022.
36. SILVA, Cassilei de Carvalho. Farmacêutico Digital. **Feridas e o Processo de Cicatrização Dicas de Saúde**. 2021. Disponível em: <https://farmaceuticodigital.com/2021/03/feridas-e-o-processo-de-cicatrizacao.html#3-Presenca-de-infeccao-ou-grau-de-contaminacao>. Acesso em: 15 nov. 2023.
37. GRADA, Ayman; OTERO-VINAS, Marta; PRIETO-CASTRILLO, Francisco; OBAGI, Zaidal; FALANGA, Vincent. Research Techniques Made Simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 137, n. 2, p. 1-6, fev. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X16327622?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jul. 2022.
38. **Micrometrics® SE Premium (318CU & 518CU), Software & Updates**. Disponível em: <https://accu-scope.com/support/software-updates>. Acesso em: 15 nov. 2023.
39. SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676–82, 2012.
40. SUAREZ-ARNEDO, A. et al. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0232565, 28 jul. 2020.
41. RICHTER, Ł. et al. Adsorption of bacteriophages on polypropylene labware affects the reproducibility of phage research. **Scientific Reports**, v. 11, 2021.

42. ADAMS, Mark Hancock. **Bacteriophages**. With chapters by E. S. Anderson [and others] Electron micrographs by E. Kellenberger. [S.L.], p. 450-454, 1959. Interscience Publishers. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.6966>. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/6966>. Acesso em: 05 jul. 2022.
43. CORRÊA, E. P. **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 – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2023.
44. SOUZA, A. F. K. **Redução de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* mediada por bacteriófagos visando aplicação em elementos de titânio**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2023.
45. WIJESINGHE, G. et al. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 1, p. 28–35, 2019.
46. HELD, P. Using Phenol Red to Assess pH in Tissue Culture Media. **Application Note Cancer Biology Author**. 2018. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media-5994-3391EN-agilent.pdf>.
47. MERCK. **Minimum Essential Medium Eagle (MEM) Formulation**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/mem-formulation>. Acesso em: 15 nov. 2023.
48. MA, L. et al. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 27 mar. 2009.
49. BUNTHOEURN KHANN et al. Fabrication of Sacha Inchi Oil-Loaded Microcapsules Employing Natural-Templated *Lycopodium clavatum* Spores and Their Pressure-Stimuli Release Behavior. **ACS omega**, v. 8, n. 23, p. 20937–20948, 31 maio 2023.
50. OFFICE OF REGULATORY AFFAIRS. **Bacterial Endotoxins/Pyrogens**. Disponível em: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/bacterial-endotoxinspyrogens>.
51. European Pharmacopoeia. **European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM)**. França, 2020. Disponível em: <https://www.edqm.eu/documents/52006/277487/Free+access+to+supportive+pharmacopoeial+texts+in+the+field+of+vaccines+for+human+use+during+the+coronavirus+disease+%28COVID-19%29+pandemic+Updated+package+-+October+2020.pdf/72875b16-432e-3854-36ca-51422e221d68?t=1637742526915>.
52. MERCK. **Cell Culture FAQs: Bacterial Endotoxin Contamination**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pyrogen-testing/what-is-endotoxin>. Acesso em: 15 nov. 2023.

53. ZERRIN KUTLU et al. Ferulago pauciradiata Boiss. & Heldr. Effects of Prantschimgin Compound Isolated from the Root of the Plant on LPS-Induced Inflammation Model in the L929 Cell Line. **Erzincan University Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 704–713, 31 ago. 2021.
54. WRIGHT, A.; MCCONNELL, M. R.; SHIRO KANEGASAKI. Lipopolysaccharide as a Bacteriophage Receptor. **Springer eBooks**, p. 27–57, 1 jan. 1980.
55. GÓRSKI, A.; BORYSOWSKI, J.; MIĘDZYBRODZKI, R. Bacteriophage Interactions With Epithelial Cells: Therapeutic Implications. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 18 jan. 2021.
56. ATCC® 27853TM | **Pseudomonas aeruginosa**. Disponível em: <https://genomes.atcc.org/genomes/a96dd3fec62a4470?tab=annotations-tab>. Acesso em: 15 nov. 2023.
57. POLLACK, M. The Role of Exotoxin A in Pseudomonas Disease and Immunity. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, p. S979–S984, 1983. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4453255>.
58. ANGUS, A. A. et al. Pseudomonas aeruginosa Induces Membrane Blebs in Epithelial Cells, Which Are Utilized as a Niche for Intracellular Replication and Motility. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 1992–2001, maio 2008. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.01221-07?casa_token=glJkwPfr_UEAAAAA%3AuoBytbAyC9I9C_Q2D6dWS2kEJuWSkP-JpN1x6zayWwoepyLMO7_FfZR2uyEv9nW-JIcaAPszSzQT0zk. Acesso em: 05 nov. 2023.
59. DĄBROWSKA, K. et al. The effect of bacteriophages T4 and HAP1 on in vitro melanoma migration. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 13, 2009.
60. DARCH, S. E. et al. Phage Inhibit Pathogen Dissemination by Targeting Bacterial Migrants in a Chronic Infection Model. **ASM Journals**. v. 8, n. 2, 3 maio 2017.
61. FLEISZIG, S. M. et al. Pseudomonas aeruginosa invades corneal epithelial cells during experimental infection. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3485–3493, 1994.