

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Medicina Veterinária

Ana Beatriz Mendes de Oliveira

**TREINAMENTO DE BACTERIÓFAGOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA**

São Paulo

2024

Ana Beatriz Mendes de Oliveira

**TREINAMENTO DE BACTERIÓFAGOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de medicina
veterinária da Universidade Santo
Amaro – UNISA, como requisito parcial
para obtenção do título Bacharel em
medicina veterinária

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso
Miotto

Coorientadora: Aline Maria da Silva
(Instituto de Química da USP)

São Paulo

2024

Ana Beatriz Mendes de Oliveira

**TREINAMENTO DE BACTERIÓFAGOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSAS PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de medicina veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em medicina veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

São Paulo, 03 de dezembro de 2024

Banca Examinadora

A todos os cientistas.

Que continuemos curiosos.

Laroyê!

AGRADECIMENTOS

Okê Arô meu pai Oxóssi!

Agradeço à minha família, à minha Mãe, Maria Cristina de Queiroz Mendes, por estar do meu lado em todos os momentos, me acolher e lutar por mim. Agradeço ao meu Avô, Gutembergue Fernandes Mendes, por me dar conselhos e por todo o suporte; agradeço a minha avó, Maria da Penha, por todo o carinho e cuidado. Agradeço ao meu padrasto, Marcelo Rossali Paulino, por tentar ser o que eu não tive. Agradeço ao meu pai, Wilson de Oliveira Júnior, pelo suporte financeiro.

Agradeço ao meu orientador, Bruno Alonso Miotto, por ter enxergado potencial no brilho dos meus olhos.

Agradeço à minha orientadora externa, Aline Maria da Silva do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que infelizmente veio a falecer no último dia 14 de outubro, pela oportunidade de aprender mais. Agradeço a supervisora do meu projeto, Layla Farage Martins, pelo conhecimento, companheirismo e amizade. Agradeço a Giullia Luiza Takahashi Rodrigues, por ser minha parceira de laboratório. Agradeço à Doris, por me ensinar sobre dignidade e orgulho, agradeço a todos os meus colegas do PhageBioLab e do CEPID B3.

Agradeço aos meus Filhos de Fagos, Rafael Melo, Bianca Camargo, e agora à terceira geração, composta por Amanda Lopes e Beatriz Gimenez, por tudo o que construímos juntos, e que ainda estão construindo.

Agradeço às minhas amigas, porque nunca sabemos Quem Realmente Vai, estar com a gente até o final. Agradeço à Heloisa Marcelino por me escolher, agradeço à Bianca Cristina, por me compreender e, agradeço à Ana Carolina Chinaia por estar comigo sempre. Agradeço a Marcelo Marcelino de Carvalho, pela ajuda com a formatação, me ouvir surtar e todos os cookies.

Agradeço à Ana Beatriz Mendes de Oliveira, por não ter desistido.

Agradeço à FAPESP pelo fomento processo 2023/06729-4.

O importante não é aquilo que fazem de nós, mas
o que nós mesmos fazemos do que os outros
fizeram de nós. – Jean Paul Sartre

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um dos maiores desafios atuais para a saúde pública global. A utilização indiscriminada de antibióticos, frequentemente associada a práticas inadequadas na medicina humana e veterinária, tem acelerado o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes. O conceito de "Saúde Única", que enfatiza a interdependência entre seres humanos, animais e o meio ambiente, tem se mostrado essencial para o enfrentamento desse problema, pois propõe uma abordagem integrada na prevenção e controle de doenças infecciosas. A fagoterapia, que utiliza bacteriófagos para combater infecções bacterianas, surge como uma alternativa promissora à utilização de antibióticos. Esses vírus são capazes de infectar e destruir bactérias de maneira altamente específica, o que representa uma vantagem significativa no combate à RAM. Estudos têm demonstrado que a fagoterapia é eficaz no tratamento de infecções em animais, especialmente em infecções resistentes a antibióticos, como as observadas em frangos e bovinos. Contudo, sua aplicação em animais de companhia ainda é pouco explorada, e os resultados, embora promissores, exigem mais investigação. Para superar limitações na aplicação da fagoterapia, como a especificidade dos bacteriófagos, estratégias como a engenharia genética e protocolos de adaptação, como o de Appelmans, têm sido investigadas. Esses avanços visam aumentar a eficácia dos bacteriófagos no tratamento de uma gama mais ampla de infecções bacterianas, oferecendo uma alternativa viável ao uso excessivo de antibióticos e contribuindo para o controle da resistência antimicrobiana. Nesse estudo é realizada a aplicação do protocolo Appelmans em um coquetel com 3 fagos utilizando uma população de 2 bactérias sensíveis e 8 não sensíveis, os resultados são promissores com todas as bactérias tendo algum grau de susceptibilidade ao coquetel evoluído.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, bacteriófagos, treinamento de fagos.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the greatest current challenges to global public health. The indiscriminate use of antibiotics, often associated with inadequate practices in human and veterinary medicine, has accelerated the development of resistant bacterial strains. The concept of "One Health," which emphasizes the interdependence between humans, animals, and the environment, has proven essential in addressing this issue as it proposes an integrated approach to preventing and controlling infectious diseases. Phage therapy, which utilizes bacteriophages to combat bacterial infections, has emerged as a promising alternative to antibiotic use. These viruses can infect and destroy bacteria in a highly specific manner, representing a significant advantage in the fight against AMR. Studies have shown that phage therapy is effective in treating infections in animals, particularly antibiotic-resistant infections, such as those observed in poultry and cattle. However, its application in companion animals remains underexplored, and while the results are promising, further investigation is required. To overcome limitations in phage therapy application, such as bacteriophage specificity, strategies like genetic engineering and adaptation protocols, such as Appelmans' method, have been investigated. These advances aim to enhance the effectiveness of bacteriophages in treating a broader range of bacterial infections, offering a viable alternative to excessive antibiotic use and contributing to antimicrobial resistance control. This study applies the Appelmans protocol to a cocktail of three phages using a population of two sensitive and eight non-sensitive bacterial strains. The results are promising, with all bacteria showing some degree of susceptibility to the evolved cocktail.

Keywords: Bacterial resistance, bacteriophages, phage training.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2.OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos | 16 |
| 3. METODOLOGIA | 17 |
| 3.1. Cultivo de cepas de <i>P. aeruginosa</i> | 18 |
| 3.2. Protocolo de Appelmans..... | 18 |
| 3.3. Medida da Densidade Óptica (DO600nm) | 19 |
| 3.4. Teste de abrangência de hospedeiros (Teste do pingo) | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 5. DISCUSSÃO | 25 |
| 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 28 |
| REFERÊNCIAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

O globo tem enfrentado diversas catástrofes por influência da mão humana, desastres ambientais, guerras, que impactam não apenas os animais humanos, como também o ambiente e os animais não-humanos que vivem nele. Isso reflete o conceito de Saúde Única, que põe o ser humano dentro do ecossistema, colocando-o no mesmo patamar do ambiente e dos animais, revelando as influências que podem acontecer entre eles e por eles (Ministério da Saúde, 2024).

Um exemplo marcante de como a ação humana pode gerar impactos devastadores em múltiplos níveis foi a Segunda Guerra Mundial. Esse conflito global não apenas ceifou milhões de vidas humanas, mas também teve implicações significativas para o meio ambiente e os animais não-humanos. O período foi um marco na história dos antimicrobianos: o uso em larga escala durante a guerra salvou inúmeras vidas, mas também inaugurou uma nova era de desafios, incluindo a disseminação da contaminação do ambiente por antimicrobianos. Todos os seres vivos estão em processo de se adaptar ao ambiente em que estão, dos aspectos mais confortáveis aos inóspitos. Isso inclui as bactérias, cuja adaptação a substâncias que existem no meio gera o fenômeno da resistência aos antimicrobianos (RAM), sejam essas substâncias desinfetantes, antibióticos, resíduos ou substâncias naturais do meio (SANTOS, 2004; XIA *et al.*, 2019). Elas podem alcançar esse objetivo por meio de mutações aleatórias, aquisição de genes de outras bactérias (conjugação), captação de material genético do ambiente ou interação com bacteriófagos temperados (WANG, *et al.* 2023; NA *et al.* 2022; DEL FIOLE *et al.*, 2017).

Com o tempo, o uso indiscriminado de antibióticos levou ao aumento da resistência. Já na década de 1960, aproximadamente 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* eram resistentes à penicilina (Levy & Marshall, 2004). Desde então, tem-se observado um declínio na eficácia dos agentes antimicrobianos devido ao aparecimento de cepas bacterianas resistentes a múltiplos antibióticos (Davies & Davies, 2010).

Hoje, a situação da RAM é crítica, um estudo de 2022 estimou a quantidade de mortes que podem ser atribuídas à RAM no ano de 2019, e esse número corresponde a 1,27 milhões de mortes, enquanto 4,94 milhões podem ser associadas a ela (MURRAY, *et al.* 2022). Em 2021, foram 1,14 milhões de mortes atribuídas e 4,71 milhões associadas, uma diminuição durante a pandemia de COVID19 que provavelmente se deve a fatores como o isolamento social (KOVACEVIC *et al.*, 2024; TOMCZYK *et al.*, 2021). Uma análise sugere o crescimento de 69,6% das mortes mundiais por RAM e um aumento de 67,0% das mortes associadas à RAM entre 2022 e 2050, as estimativas demonstram que em 2050 serão 1,91 milhão de mortes atribuídas e 8,22 milhões de mortes associadas e, cumulativamente, nesse cenário o número de mortes pode chegar a 39 milhões entre 2025 e 2050 (NAGHAVI *et al.*, 2024).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde alerta para a necessidade de intensificar pesquisas voltadas à descoberta, desenvolvimento e produção de novos agentes terapêuticos que combatam bactérias resistentes aos antibióticos (WHO, 2023). Nesse contexto, a fagoterapia surge como uma ferramenta promissora no controle de infecções bacterianas. Os bacteriófagos e suas enzimas têm sido propostos tanto para uso isolado quanto como adjuvantes aos antibióticos convencionais (Kropinski, 2006; Pires *et al.*, 2016; Maciejewska *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Gorski *et al.*, 2020).

Nesse cenário, os bacteriófagos, entidades virais acelulares e parasitas intracelulares obrigatórios de células procariontes, são altamente especializados em infectar e lisar bactérias e têm se destacado como promissora alternativa ao uso de antibióticos tradicionais (ABEDON *et al.*, 2018).

Os bacteriófagos podem ser classificados de acordo com seu ciclo viral, sendo virulentos ou temperados. Fagos virulentos possuem um ciclo lítico, onde irão usar a célula bacteriana para produzir partículas próprias. Ou seja, irão adsorver na célula, a partir do encontro com receptores que podem ser proteínas da membrana como porinas, glicoproteínas, estruturas para locomoção como cílios e pilus, o próprio LPS de células bacterianas gram-negativas, injetar seu genoma no citoplasma da bactéria, que passará a ser copiado e expresso para que haja a síntese das proteínas virais, culminando na lise da célula hospedeira.

Fagos temperados, por outro lado, possuem ciclo lítico e ciclo lisogênico, que permitem a reprodução do vírus sem que haja morte celular, embora as etapas de adsorção e injeção do DNA sejam idênticas às do ciclo lítico. Neste tipo de fago, também denominado de profago, o genoma é recombinado ao genoma da bactéria ou mantido em forma de DNA circular no citoplasma, sem que haja necessariamente expressão dos genes e produção de proteínas virais. O bacteriófago se multiplica quando a célula o fizer, sendo copiado junto com o material genético da célula hospedeira, ainda assim, os profagos podem realizar o ciclo lítico a partir de condições de estresse da célula bacteriana, como exposição à luz UV (ultravioleta) ou substâncias tóxicas (Guttman *et al.*, 2005; Feiner *et al.*, 2015).

A primeira descrição dessas entidades biológicas foi registrada em 1896, quando Ernest Harkin relatou que a água dos rios Ganges e Jumna, na Índia, curava cólera e atribuiu isso à existência de organismos menores que as bactérias (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Stone, 2002). Dois anos depois, Nikolay Gamaleya observou o mesmo acontecimento em *Bacillus subtilis*. Em 1915, na Inglaterra, Frederick Twort testava a propagação de vírus em meio artificial, então viu a alteração de turbidez em colônias bacterianas que eram contaminantes de seus experimentos, mas não prosseguiu a investigação (SUMMERS, 2005; SUMMERS, 2012).

Em 1917, Felix d'Herelle, do Instituto Pasteur na França que estudava a patogênese de *Shigella*, criou o termo bacteriófago a partir do idioma grego, onde “fago” significa “aquele que come”. Suas pesquisas levaram a crer que partículas inofensivas aos seres humanos infectavam e lisavam as bactérias. Com isso, a terapia com bacteriófagos (fagoterapia ou terapia fágica) começa a ser usada em infecções bacterianas, mesmo sem se conhecer a natureza biológica desses vírus. Os fagos foram reconhecidos como vírus somente duas décadas mais tarde (STONE, 2002; SUMMERS, 2012). Logo após o fim da guerra, d'Herelle continuou a usar bacteriófagos como agentes terapêuticos, tratando disenterias, peste (*Yersinia pestis*) e cólera (SULAKVELIDZE & KUTTER, 2005).

Em 1923, d'Herelle e Giorgi Eliava fundaram, na então República Democrática da Geórgia, o Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology, localizado em Tbilisi. Esse foi o primeiro instituto dedicado à fagoterapia no mundo (STONE, 2002). Até a década de 1930, a fagoterapia foi amplamente utilizada com sucesso no

tratamento de diversas infecções em humanos (SULAKVELIDZE & KUTTER, 2005; KORTRIGHT *et al.*, 2019; BRIVES & POURRAZ, 2020).

No entanto, a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, e sua eficácia no combate ao *Staphylococcus aureus*, representou um marco que enfraqueceu a fagoterapia (DEMAIN & SANCHEZ, 2009). O obscurecimento da terapia fágica nas décadas posteriores ao início da comercialização da penicilina pode ser explicado por outros motivos, como a falta de embasamento a partir de ensaios clínicos, ou a falta de protocolos bem estabelecidos para a produção e aplicação de bacteriófagos (SULAKVELIDZE & KUTTER, 2005). Por conta disso, especialmente no ocidente, a fagoterapia foi gradualmente substituída pela antibioticoterapia. Apenas alguns países do leste europeu continuaram a realizar pesquisas e a utilizar bacteriófagos terapeuticamente (SULAKVELIDZE & KUTTER, 2005; GORSKI *et al.*, 2018; KORTRIGHT *et al.*, 2019; ŻACZEK *et al.*, 2020).

Hoje, a fagoterapia tem cada vez mais estudos que demonstram o potencial terapêutico com fagos. De acordo com uma revisão de 2022 com 59 artigos, 57 estudos demonstraram segurança na realização da fagoterapia com reações acontecendo em 7% dos pacientes contra 15% do grupo controle, e todos os 59 estudos reportam eficácia da terapia com fagos, com 79% de melhora dos pacientes e erradicação bacteriana em 87% dos casos, dados que confirmam as tendências de outras revisões (UYTTEBROEK *et al.*, 2022; UYTTEBROEK *et al.*, 2022 *apud* LAVERN *et al.*, 2018 e MIĘDZBRDZKI, 2012). Revisões de estudos que utilizam a fagoterapia contra diversas infecções, incluindo infecção articular periprotética indicando 80% de remissão (YANG *et al.*, 2024; YOUNG *et al.*, 2024), casos de pneumonia, onde houve participação da terapia fágica na redução de mortes nos modelos (RAHMAN, 2024), e estudos com aplicação em pacientes queimados (ROSE *et al.*, 2014).

A literatura científica sobre a aplicação da terapia fágica em animais de produção é mais robusta em comparação aos estudos realizados em animais de companhia. Em frangos, a fagoterapia é amplamente recomendada para o controle de infecções bacterianas comuns, como salmonelose, campilobacteriose e colibacilose, com diversas evidências respaldando sua eficácia (LOPONTE *et al.*, 2021). Em bovinos, os fagos são tradicionalmente utilizados contra *Escherichia coli* O157:H7, uma cepa altamente zoonótica que coloniza o trato digestivo dos animais e

pode causar diarreia enterro-hemorrágica severa em humanos (DEC *et al.*, 2020). Além disso, os bacteriófagos têm mostrado resultados promissores no tratamento da mastite, especialmente em casos envolvendo cepas multirresistentes (GILL *et al.*, 2006a, 2006b; O'FLAHERTYI., 2005; GARCIA *et al.*, 2024).

Na suinocultura, a terapia fágica tem sido testada para controlar agentes zoonóticos como *E. coli* e *Salmonella enterica*, além de doenças respiratórias causadas por *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*, que impactam significativamente a produção econômica (LOPONTE *et al.*, 2021). Uma meta-análise conduzida por Desiree *et al.* (2021) evidenciou uma redução significativa da concentração de bactérias desafiadoras em suínos tratados com fagos, destacando as vantagens do uso profilático e terapêutico contra infecções como salmonelose e colibacilose.

Embora os benefícios da terapia fágica na produção animal sejam bem documentados, com foco no bem-estar e na produtividade em sistemas de confinamento, os estudos em animais de companhia são escassos. Pesquisas em cães, por exemplo, têm se concentrado no tratamento de otite externa. Marza *et al.* (2006) relataram a primeira aplicação clínica de fagos em cães para tratar otite externa crônica bilateral causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos, com sucesso completo após a administração tópica de uma solução fágica que demonstrou eficácia *in vitro* na lise de cepas bacterianas.

Este cenário aponta para o potencial ainda pouco explorado da fagoterapia em animais de companhia, enquanto em animais de produção ela já é consolidada como uma alternativa viável para combater infecções bacterianas e reduzir o uso de antibióticos.

Os bacteriófagos são a entidade biológica mais abundante do mundo, e se destacam por sua alta especificidade, ao contrário dos antibióticos, atacando apenas cepas bacterianas específicas, minimizando, portanto, o impacto sobre o equilíbrio da microbiota do hospedeiro. Embora seja benéfica, essa especificidade também representa um desafio, já que o baixo espectro pode ser uma desvantagem quando se desconhece a bactéria/cepa que se deseja eliminar (JONGE *et al.*, 2018).

Para resolver essa questão, estão sendo exploradas e aplicadas tecnologias inovadoras, como a engenharia genética, que visa modificar as proteínas da cauda

dos fagos para possibilitar a ligação a novas proteínas da membrana bacteriana. Além disso, protocolos microbiológicos, como o protocolo de Appelmans, estão sendo utilizados para "treinar" os bacteriófagos. Uma estratégia amplamente adotada na República da Geórgia envolve a criação de coquetéis de fagos de amplo espectro, projetados para combater uma variedade de bactérias patogênicas. Quando um patógeno se torna resistente a um coquetel, um novo fago capaz de atacar esse patógeno resistente é introduzido, ou o protocolo de Appelmans é aplicado para revitalizar o coquetel e restaurar sua eficácia. Esse protocolo consiste na exposição repetida de populações de fagos a culturas bacterianas específicas, permitindo ajustar a virulência e a capacidade de infecção dos fagos conforme necessário (ABDELSATTAR *et al.*, 2024; CHANISHVILI *et al.* 2009; APPELMANS, 1921).

Durante o protocolo, fagos são expostos repetidamente a populações bacterianas. A cada passagem, apenas os fagos que conseguem adsorver e se replicar nas bactérias presentes sobreviverão e se multiplicarão. Esse processo de seleção favorece a evolução de variantes fágicas com características que lhes permitem infectar as bactérias hospedeiras de forma mais eficaz, sem que novas informações genéticas sejam artificialmente adicionadas. Além disso, as mutações espontâneas no material genético dos fagos podem resultar em alterações nas proteínas que medeiam a ligação entre o fago e a bactéria, permitindo que o fago reconheça e se ligue a novos receptores. A troca genética entre fagos e possíveis profagos, e a adaptação ao ambiente também contribuem para a modificação das capacidades de infecção dos fagos (BURROWES *et al.*, 2019).

Diante dos potenciais benefícios do treinamento de fagos, o presente trabalho teve como objetivo aplicar o protocolo Appelmans e verificar seus efeitos nas condições de laboratório.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer protocolo para treinamento de fagos de *Pseudomonas aeruginosa* em um coquetel, visando expandir a abrangência de seus hospedeiros.

2.2 Objetivos específicos

- Submeter um cocktail de fagos com baixa amplitude de hospedeiros a sucessivas rodadas de exposição a diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar o efeito desta exposição na expansão de sensibilidade dos fagos utilizados.

3. METODOLOGIA

O método que foi escolhido para teste da evolução *in vitro* dos fagos foi o protocolo de Appelmans, conforme descrito por Burrowes *et al.*, 2019 e já utilizado anteriormente (MAPES, *et al.* 2016; GLONTI e PINARDI, 2022; BORIN, *et al.* 2021; BURROWES, *et al.* 2019). Nesse protocolo, um coquetel composto de fagos é exposto a um grupo de bactérias repetitivamente, sendo que nesse grupo devem existir bactérias que esse coquetel seja capaz de infectar previamente, não sendo essencial que seja a mesma cepa, mas, todos os fagos do coquetel devem ser capazes de adsorver e se replicar em pelo menos uma. Essa exposição é realizada em placas de 96 poços *overnight*, cada linha sendo uma bactéria/cepa e cada coluna uma diluição desse coquetel (conforme figura 1A). Deixando a primeira coluna como controle para comparação de turbidez entre os poços. Então é coletado todos os poços com lisado (perda de turbidez) e um poço sem perda de turbidez (conforme figura 1B), é feito um pool de todos esses poços e adicionado 10% de clorofórmio e homogeneizado para lisar as bactérias ainda presentes, o produto disso é centrifugado a 18.000xg por 5 minutos para remoção de debris celulares que formam um pellet que é descartado enquanto sobrenadante, chamado de Round 1, dará início a próxima exposição em culturas frescas das células bacterianas originais.

No presente trabalho um coquetel composto por três fagos diferentes com genomas completamente distintos e pertencentes a famílias não relacionados, foi submetido a 30 rodadas do protocolo de Appelmans, aplicadas utilizando grupo de dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo 8 isolados clínicos e 2 usadas como cepas de referência (modelo). Entre essas, apenas duas cepas demonstraram sensibilidade inicial aos fagos originais antes da otimização do coquetel, sendo elas à PASM (cepa clínica) e PA14 (cepa modelo).

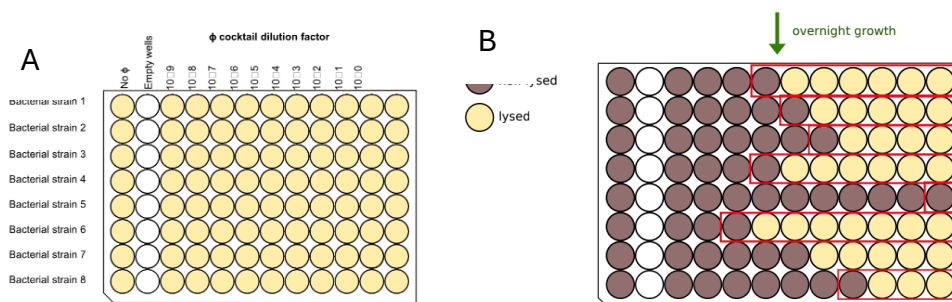


Figura 1: (A) Esquema de distribuição e realização do experimento, demonstra distribuição de fagos e bactérias enquanto (B) como é feita coleta dos poços.

3.1. Cultivo de cepas de *P. aeruginosa*

As cepas de referência de *P. aeruginosa* PA14 (sensível ao ZC01 e ZC03) e PAO1 e isolados clínicos foram cultivados a 37°C overnight em meio TSB (Tryptic Soy Broth), contendo ou não 1,5% de Bacto Agar (Difco). Os estoques dessas cepas e isolados foram mantidos em meio TSB contendo glicerol (10%) e armazenadas a -80°C e/ou em tanques de nitrogênio líquido. Os isolados clínicos utilizados foram PASM (isolado de um paciente de São Luiz do Maranhão, hospedeira do LAFX), e cepas gentilmente cedidas pelas Dra. Silvia Figueiredo Costa (FMUSP) e Ana Cristina Gales (EPM-UNIFESP) (RAHME *et al.* 1995; STOVER *et al.* 2000). Dentre as cepas utilizadas estão BC1410, BC1680, BC1303 e BC1136 que possuem SPM-1 (São Paulo Metallo- β -lactamase) que hidrolisa preferencialmente cefalosporinas e carbapenêmicos, GES-1 (Guiana- β -lactamase de amplo espectro): potencialmente resistente a todos os β -lactâmicos, IMP-16 (Imipenemase), que hidrolisa cefalosporinas de amplo espectro; imipenem (carbapenêmico) e serina- β -lactamases OXA-18 (Oxacilinase), que tem efeito sobre cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos.

3.2. Protocolo de Appelmans

Os fagos selecionados para compor o coquetel foram ZC01 E ZC03, cuja hospedeira e única bactéria sensível é a PA14, ambos os fagos isolados de

compostagem respectivamente, os morfotipos de sifovírus e podovírus (AMGARDEN, *et al.*, 2017), e LAFX, que a cepa sensível é a PASM, isolado a partir de um córrego sitiado na Universidade de São Paulo, próximo ao Portão 1, apresenta morfotipo de miovírus. Além de morfotipos distintos, esses três fagos apresentam genomas completamente diferentes e pertencem a famílias e gêneros não relacionados.

O coquetel dos três fagos pré-selecionados foi exposto as dez cepas, oito não sensíveis e as duas hospedeiras por 30 vezes (rounds)., Para o preparo do coquetel foi os foram misturadas preparações puras dos fagos na mesma titulação, sendo essa 10^9 PFU/mL (Unidades Formadoras de Placa). Essa preparação foi feita diluída de maneira seriada até 10^{-9} em tampão SM. O coquetel concentrado e as diluições seriadas foram aplicados nas colunas de uma placa de 96 poços (100 μ L/poço), cada coluna uma diluição, sendo da mais diluída 10^{-9} até o concentrado. Cada linha da placa continha uma cepa de *P. aeruginosa*, sendo adicionado 1 μ L de cultura bacteriana incubada anteriormente por uma noite e 100 μ L de 2xTSB, O controle (sem coquetel de fagos) continha tampão SM, 1 μ L de cultura bacteriana e 100 μ L de 2xTSB. Essa placa, tampada, foi mantida em agitação a 37°C por 12-16 horas. Após a incubação a turbidez de cada poço foi observada e comparada com o controle, sendo que, quanto menor a turbidez, maior o efeito do coquetel de fagos, o qual pode estar impedindo a multiplicação da bactéria ou causando sua lise. O esperado é que a densidade óptica da cultura deve reduzir ao longo das passagens (rounds), como consequência do efeito da evolução dos fagos.

A partir dessa comparação, são recolhidos os poços que apresentarem qualquer perda de turbidez e um com a turbidez inalterada (conforme demonstrado em figura 1B), é feito um pool de todos esses poços, adicionado 10% de clorofórmio e homogeneizado para lisar as bactérias ainda presentes, o produto disso é centrifugado a 18.000xg por 5 minutos para remoção de debris celulares que formam um pellet que é descartado enquanto sobrenadante, chamado de Round 1, dará início a próxima exposição em culturas frescas das células bacterianas originais.

3.3. Medida da Densidade Óptica (DO600nm)

A mensuração de Densidade Óptica (DO) a 600 nm, que mede a turbidez do meio e, assim, a quantidade de bactérias, foi realizada no equipamento Spectramax que mede a DO diretamente nas placas de 96 poços.

3.4. Teste de abrangência de hospedeiros (Teste do pingo)

O teste de abrangência de hospedeiros foi realizado através do teste do pingo, avaliando a capacidade do fago infectar diferentes cepas. Para isso, 120µL da cultura em fase log de cada cepa de *P. aeruginosa* foi misturado com 3-5mL do top-ágar (TSB com 0,7% ágar) derretido e em seguida a mistura foi depositada em placa de petri contendo TSB-ágar. Após solidificação do top-ágar, 5µL de diluições seriadas (6 diluições 1:10) de amostras de fagos, sendo o coquetel inicial para apenas três cepas, PASM, PA14 e PA01 e o pool resultante dos rounds cada 10 rounds em todo o grupo. foram depositados delicadamente sobre o top-ágar (Figura 2), e após secagem dos pingos, as placas foram incubadas a 37°C por pelo menos 12 horas (AZEREDO e SILLANKORVA, 2018).

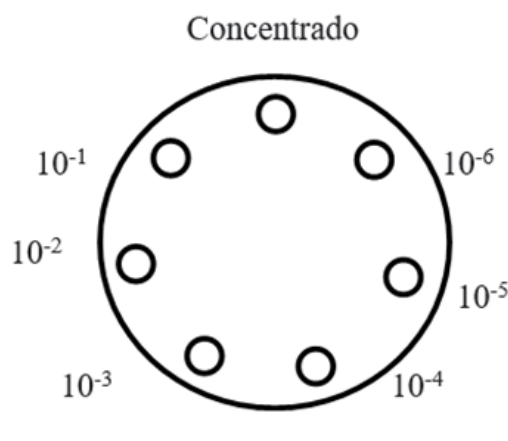


Figura 2: Esquema do teste do pingo. As suspensões dos fagos do menos diluído (concentrado) para o mais diluído são aplicadas em sequência no sentido anti-horário.

4. RESULTADOS

Com o acompanhamento dos dados de densidade óptica (Figura 3), foi possível ver uma tendência geral à redução da densidade, entretanto, a redução não foi linear, tendo variações.



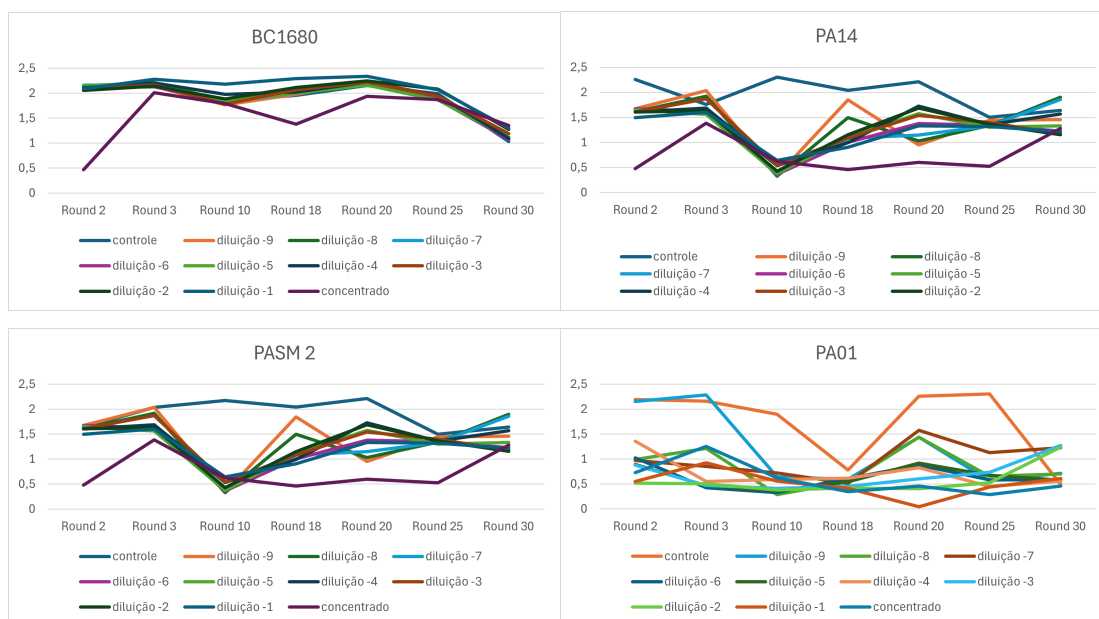


Figura 3: Medida da densidade óptica (eixo y) das diferentes culturas expostas ao coquetel de fagos nos diferentes rounds. O controle é a cultura da bactéria não exposta ao coquetel.

No exemplo da Figura 4, é possível observar as variações visuais de coloração, logo, de turbidez do meio, indicando a lise bacteriana e o aumento da capacidade dos fagos de infectar bactérias antes resistentes.

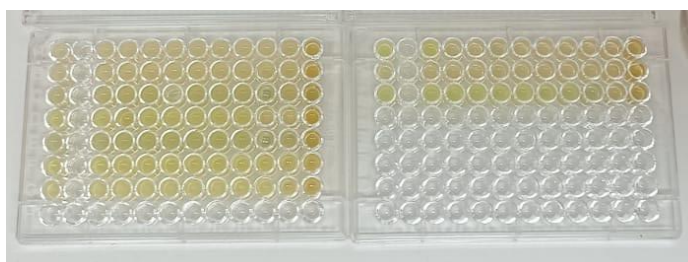


Figura 4: Imagem de placas de 96 poços com cultivos das cepas (linhas) submetidas a exposição de diluições seriadas do coquetel dos fagos (colunas).

O teste do pingo foi realizado com o coquetel inicial dos 3 fagos para apenas três cepas (Figura 5). Na Figura 5, como esperado, por não ser hospedeira primária de nenhum fago do coquetel, a cepa PAO1 não é sensível a , enquanto a cepa PASM

e a cepa PA14 demonstram sensibilidade. O teste do pingo realizado com pool dos rounds 10, 20 e 30 em todas as 10 cepas utilizadas no protocolo de Appelmans (Tabela 1). Foi observado que, conforme a passagem dos rounds, todas as cepas apresentaram algum grau de sensibilidade.

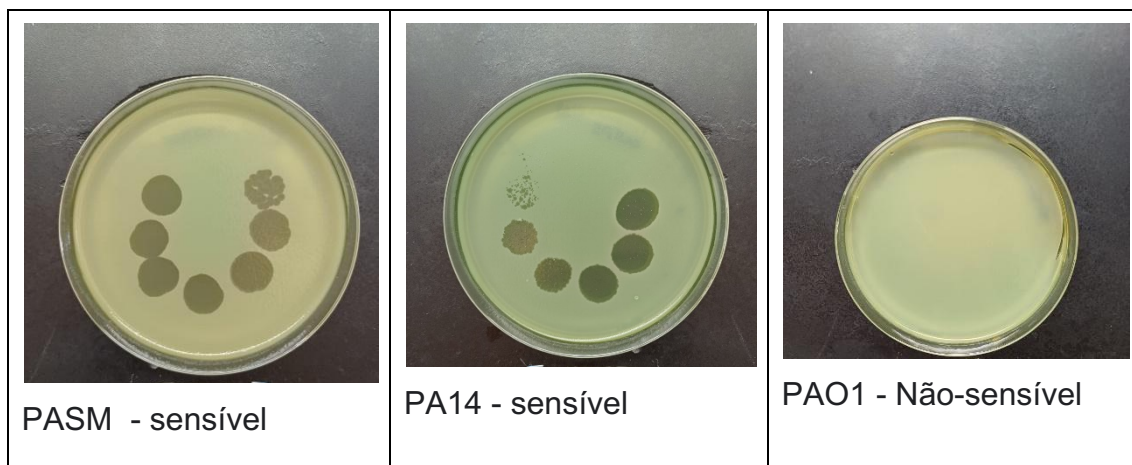


Figura 5: Teste do pingo realizado com o coquetel inicial dos 3 fagos contra 3 cepas de *P. aeruginosa*.

O aumento da capacidade dos fagos com o passar das exposições pode ser resumido na Tabela 1, iniciando com 20% das cepas testadas sendo sensíveis, e finalizando com 100% delas. A capacidade em cada cepa é variável, podendo ser classificada como incapaz de infectar, capaz de infectar (+), e muito eficiente em infectar (++)

Tabela 1: Sensibilidade no teste do pingo, o espaço vazio correspondente incapaz de infectar, + capaz de infectar e ++ muito eficiente em infectar.

| CEPAS | Coquetel | ROUND 10 | ROUND 20 | ROUND 30 |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| PA14 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PAO1 | | ++ | ++ | ++ |
| PASM | ++ | ++ | ++ | ++ |
| BC1680 | | | + | ++ |
| BC1136 | | | | ++ |
| BC1303 | | | + | ++ |
| BC1410 | | | + | + |
| OXA-18 | | + | + | + |
| GES-1 | | | ++ | ++ |
| IMP-16 | | ++ | ++ | ++ |
| % sensibilidade | 20 | 50 | 90 | 100 |

5. DISCUSSÃO

Os resultados alcançados sugerem a evolução do coquetel inicial composto por três fagos, resultando em um aumento progressivo da sua capacidade de abranger as cepas-alvo. Após 30 rounds de aprimoramento, o coquetel alcançou 100% de eficácia, abrangendo todas as dez cepas selecionadas. Esses resultados sugerem uma otimização significativa comparada com a do coquetel inicial, evidenciando a adaptabilidade e o potencial dos fagos em evoluir para atender a um espectro mais amplo de cepas bacterianas.

Esses resultados são semelhantes aos descritos por Burrowes *et al.* (2019). Além de usar um coquetel, o autor procedeu o mesmo protocolo aplicado no presente trabalho em fagos individualmente, observando aumento da amplitude de hospedeiros, contudo, muito menor que em relação ao coquetel com três fagos. No mesmo trabalho, o autor procedeu o isolamento de fagos do coquetel evoluído e o sequenciamento de um dos fagos resultantes do experimento demonstrou que o genoma viral incluía seções genômicas de dois fagos originais do coquetel. Esses resultados apontam que um coquetel aplicado a culturas onde há mais de um vírus na mistura de fagos favorece recombinações que podem gerar maior diversidade genética em um pool de fagos.

Fenômeno semelhante foi descrito por Vu *et al.* (2024), em estudo com *Acinetobacter baumannii*, que além das cepas de desenvolvimento do protocolo, testou em cepas clínicas adicionais. Nas cepas usadas para realização do protocolo houve aumento de abrangência de três, sensíveis inicialmente, para oito cepas, após a evolução do coquetel das dez em que foi aplicado. Além dessas cepas, foi realizado testes com os rounds em outras dez cepas fora do desenvolvimento do protocolo encontrando aumento da capacidade do fago, com a abrangência e estendendo a seis dessas cepas externas; também descrito por Mapes *et al.*, (2016) que realizou testes em cepas externas o desenvolvimento, sendo alcançadas dez cepas externas ao protocolo sensíveis.

Vu *et al.* (2024) realizou 90 rounds aumentando a abrangência do coquetel de 30% para 70% ao final do estudo, enquanto em *Pseudomonas* foi alcançado 100% de abrangência em Burrowes *et al.* (2019), e no presente trabalho em 30 rounds; em

Mapes *et al.*, (2016) realizado com dezesseis cepas de *Pseudomonas*, inicialmente seis cepas sensíveis (37,5%) e após 30 ciclos a abrangência foi estendida para treze das cepas envolvidas no protocolo (81,25%).

Esses resultados indicam grande possibilidade de uso na clínica médica, já que com o aumento da abrangência tanto interna quanto externa ao desenvolvimento do protocolo cepas não testadas podem ser lisadas pelo coquetel evoluído.

Em Burrowes *et al.* (2019) e Vu *et al.* (2024) o sequenciamento traz informações relevantes sobre as mutações nos fagos. No presente trabalho, o sequenciamento ainda está sendo avaliado, a fim de caracterizar as mudanças que ocorreram ao longo da evolução do coquetel. Os dados de Densidade Óptica (D.O.) apresentaram resultados diferentes em relação ao teste do pingô, o que pode ser entendido a partir de diversos fatores. Durante as 16 horas de incubação, tempo em que a D.O. foi medida, as bactérias sensíveis aos fagos provavelmente foram lisadas, espaço para que as resistentes, sempre presentes em menor quantidade devido à diversidade da população, se proliferassem. Esse processo reflete a capacidade das bactérias de evoluírem e atualizarem continuamente seus mecanismos antifagos, tornando-as mais aptas a sobreviver à ação dos vírus (ROSTØL; MARRAFFINI, 2019). Essa dinâmica natural de adaptação bacteriana pode causar variações significativas nos resultados. Outro ponto importante é que tanto as bactérias quanto os fagos têm suas particularidades genéticas e fenotípicas, que podem influenciar a eficácia da infecção. Pequenas diferenças nas características das bactérias ou dos fagos podem explicar variações nos resultados, principalmente relacionadas com as proteínas da cauda do fago que determinam seus receptores (NÓBREGA *et al.*, 2018 *apud* MARGOLIN, 2015; ARNAUD, 2017; GONZALEZ-GARCIA, 2020).

Também não pode ser descartada a possibilidade de erros técnicos durante o experimento, como pequenas imprecisões nas diluições, diferenças no tempo de incubação, contaminação cruzada das cepas ou não deposição de algum elemento. Por fim, é importante destacar que a D.O. mede a turbidez geral do meio, ou seja, a quantidade total de células (KOCH, 1968), enquanto o teste do pingô avalia diretamente a atividade dos fagos (AZEREDO e SILLANKORVA, 2018). Por isso, cada método fornece uma perspectiva diferente de um mesmo fenômeno, e essas diferenças ajudam a compreender melhor as interações complexas entre fagos e

bactérias. O método deve ser aprimorado em relação as vantagens da utilização da D.O com relação ao análise a olho nu.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados aqui indicam que o protocolo de Appelmans foi bem-sucedido, visto que observamos aumento da abrangência de hospedeiros do coquetel dos fagos ZC01, ZC03 e LAFX de duas cepas sensíveis inicialmente para todas as dez testadas, ou seja, as cepas cujo os fagos eram incapazes de infectar o experimento de evolução *in vitro* os tornou capaz, devido aos eventos de recombinação que podem acontecer e seleção destes fagos ao longo do tempo, bem como mutações espontâneas que os fazem se adaptar às cepas resistentes.

Esses dados representam grande possibilidade para fins terapêuticos, já que o aumento da abrangência de hospedeiros torna a fagoterapia uma abordagem mais viável e eficaz para combater infecções bacterianas resistentes sem ter de isolar e caracterizar um fago cepa específico, possibilitando o uso de bacteriófagos previamente caracterizados e estudados de forma a garantir ainda mais segurança ao paciente. Este trabalho gerou resultados que continuarão a ser explorados. Amostras de DNA dos rounds 1, 2, 5, 10, 20 e 30 estão sendo sequenciadas, e foram isolados quatro fagos resultantes desse processo para elucidar os mecanismos que levaram o coquetel a ser capaz de infectar as cepas resistentes. Estes novos isolados evoluídos ainda serão testados individualmente em todas as cepas utilizadas.

REFERÊNCIAS

ABDELSATTAR, A. S.; DAWOOD, A.; REZK, N.; MAKKY, S.; SAFWAT, A.; RICHARDS, P. J.; EL-SHIBINY, A. How to train your phage: the recent efforts in phage training. *Biologics*, v. 10, n. 2, 2024. DOI: 10.3390/biologics1020005.

APPELMANS, R. Le dosage du Bacteriophage. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 85, p. 1098, 1921.

AZEREDO, J.; SILLANKORVA, S. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. Nova York: Humana Press, 2018. 303 p.

BORIN, J. M.; AVRANI, S.; BARRICK, J. E.; PETRIE, K. L.; MEYER, J. R. Coevolutionary phage training leads to greater bacterial suppression and delays the evolution of phage resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 23, e2104592118, 2021. Acesso em: 10 out. 2024.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BENJAMIN, D. K.; *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009. Acesso em: 11 out. 2024.

BURROWES, B. H.; MOLINEUX, I. J.; FRALICK, J. A. Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol. *Viruses*, v. 11, n. 3, 2019. Acesso em: 12 out. 2024.

DOWAH, Ahmed; **CLOKIE, Martha**. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophysical Reviews*, 2018. DOI: 10.1007/s12551-017-0382-3.

GLONTI, T.; PIRNAY, J. P. In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses-Basel*, v. 14, n. 7, p. 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14071281>. Acesso em: 18 out. 2024.

JONGE, P. A. de; **NOBREGA, F. L.**; **BROUNS, S. J. J.**; **DUTILH, B. E.** Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*, 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.08.006. Acesso em: 13 out. 2024.

KOCH, Arthur L. *Theory of the Angular Dependence of Light Scattered by Bacteria and Similar-sized Biological Objects*. *Journal of Theoretical Biology*, v. 18, p. 133–156, 1968.

LAVIGNE, R.; GAGNEUR, S.; WILLIAMS, G. Phage Therapy: The Role of Phage Adaptation in the Evolution of Bacterial Resistance. *Annual Review of Microbiology*, v. 65, p. 1-25, 2011. Acesso em: 14 out. 2024.

MAPES, A. C.; TRAUTNER, B. W.; LIAO, K. S.; RAMIG, R. F. Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriophage*, v. 6, n. 1, e1096995, 2016. Acesso em: 15 out. 2024.

MARTINS JUNIOR, A.; MORONI, J. G.; SOUZA, J. M.; *et al.* Infecções por bactérias do grupo "ESKAPE" em pacientes internados em unidade de terapia intensiva por COVID-19. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103373>. Acesso em: 16 out. 2024.

MURRAY, Christopher J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

NAGHAVI, Mohsen et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, v. 404, n. 10459, p. 1199–1226, 2024.

NÓBREGA, F. L.; VLOT, M.; DE JONGE, P. A. et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, p. 760–773, 2018. DOI: [10.1038/s41579-018-0070-8](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8).

4o

mini

RAHME, L. G.; STEVENS, E. J.; WOLFORT, S. F.; et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.

ROSTØL, Jakob T.; MARRAFFINI, Luciano. Fighting Phages: How Bacteria Resist Their Parasites. *Cell Host & Microbe*, v. 25, n. 2, p. 184–194, 2019. DOI: [10.1016/j.chom.2019.01.009](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.009).

SANTOS, Neusa de Queiroz. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 13, n. spe, p. 64–70, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.

TOMCZYK, Sara et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the surveillance, prevention and control of antimicrobial resistance: a global survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, n. 11, p. 3045–3058, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkab300>.

VU, Thao Nguyen et al. Appelmans protocol – A directed in vitro evolution enables induction and recombination of prophages with expanded host range. *Virus Research*, v. 331, 199272, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199272>.

WHO. Antimicrobial Resistance. *World Health Organization*, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

WHO. Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Genebra: *World Health Organization*, 2024. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>.

XIA, J.; SUN, H.; ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; REN, H.; YE, L. Aromatic compounds lead to increased abundance of antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors. *Water Research*, v. 166, p. 115073, 2019.

ZHANG, Z. et al. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature Communications*, v. 13, p. 1553, 2022.

