

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ARIOSVALDO PEREIRA DOS SANTOS JUNIOR

Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Versão corrigida da Dissertação defendida em 18/08/2020

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
08/07/2020

ARIOSVALDO PEREIRA DOS SANTOS JUNIOR

Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

**São Paulo
2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S237c Santos-Junior, Ariosvaldo Pereira dos
Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e
avaliação de seu potencial para fagoterapia em
infecções por Pseudomonas aeruginosa / Ariosvaldo
Pereira dos Santos-Junior. - São Paulo, 2020.
70 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: da Silva, Aline Maria

1. Fago. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. PA14. 4.
Fagoterapia. 5. Despolimerase. I. T. II. da Silva,
Aline Maria , orientador.

"Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*"

ARIOSVALDO PEREIRA DOS SANTOS JUNIOR

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Aline Maria da Silva
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini
IQ - USP

Prof. Dr. Beny Spira
ICB - USP

Prof. Dr. Marcelo Brocchi
IB - UNICAMP

SÃO PAULO
18 de agosto de 2020

Dedico esse trabalho a minha avó Julia da
Costa Nery e minha irmã Danielle Cristina
Nery dos Santos, por serem minha luz

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais Maria de Lourdes da Costa Nery e Ariosvaldo Pereira dos Santos por serem meus maiores gigantes, sendo fundamentais para meu crescimento em todos os aspectos.

As minhas irmãs Dayana Karla, Danielle Cristina e Kamyla Luiza por todo o investimento que em mim depositaram. Obrigado a toda minha família que é meu porto seguro.

À Profa. Aline Maria da Silva, minha orientadora, por ter me aceitado em seu grupo, acreditado e investido em meu potencial, pela incrível orientação, todas as lições e ensinamentos que me passou, apoio e imprescindíveis dicas de análises e desenvolvimento desse trabalho, assim como seu enorme entusiasmo em relação a ciência e ao desenvolvimento científico.

À Dra. Layla Farage Martins pela supervisão cotidiana desse trabalho, pelo imprescindível apoio na interpretação e discussão dos dados e cuidadosa revisão do texto, além da amizade e carinho durante esses dois anos de pesquisa e estudos.

Ao Prof. Ronaldo Bento pelo apoio na bancada e orientação nas metodologias de purificação de fagos.

Ao Dr. Germán Gustavo Sgro pela realização da microscopia eletrônica de transmissão e dicas para a análise de sequências proteicas.

À Profa. Kelly Ishida e sua aluna Gaby Soares pela ajuda com os ensaios em modelo animal.

Ao Prof. Giuseppe Palmisano pelo apoio na realização da proteômica *shotgun*.

Ao Prof. João Carlos Setúbal pelo apoio nas metodologias bioinformáticas, além da disponibilidade e atenção ao longo desses dois anos.

Aos colegas de laboratório e de pós-graduação, Paulo Pierry, Oséias Feitosa, Guillermo Uceda, Fernando Rossi, Deibs Barbosa, Raquel Riyuzo, Roberta Pereira e Remigio Rodrigues, pelas discussões sobre resultados, dicas e suporte em todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

Ao *PhageGroup* por suas reuniões tão proveitosas, pelas constantes discussões e aprendizados que construímos juntos.

Ao técnico de laboratório Alexandre Sanchez pelo suporte técnico e profissional constante durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores e professoras das disciplinas que cursei e fui monitor, por contribuírem com a construção de minha formação profissional.

Ao Programa de Bioquímica do Instituto de Química, e a todos os funcionários do IQ-USP pelo suporte e apoio imprescindíveis.

Aos amigos e amigas que de alguma forma fizeram parte de meu aprendizado, em especial a Rafaela, Karen, Katherine e Isabela.

Aos meus irmãos de pais diferentes Vitor, Gibran, Dyego e Cleydson que sempre me apoiaram em minhas escolhas, me dando apoio moral necessário.

Agradeço a oportunidade de sair da minha zona de conforto que me expôs a dificuldades e me mostrou o real valor da vida.

À CAPES (Projeto No. 3385/2013) pelo apoio financeiro aos laboratórios da Profa. Aline M. da Silva e do Prof. João C. Setúbal.

À CAPES pela bolsa de Mestrado.

“Um anão inteligente faz amizade com os gigantes. Senta-se em seu ombro e enxerga o mundo”.

(Isaac Newton)

RESUMO

SANTOS-JR, ARIOSVALDO PEREIRA. Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. 2020. 66 páginas. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Vírus que utilizam bactérias como hospedeiros para sua propagação são denominados bacteriófagos ou fagos. A partícula viral (vírion) contém uma cópia do genoma do fago envolto por uma capa proteica ou lipídica e proteica de morfologia variada. Os fagos se propagam através do ciclo de vida lítico ou lisogênico. No ciclo lítico, após interação do vírion com moléculas receptoras da superfície bacteriana, o fago injeta o material genético na célula, novas partículas virais são produzidas e liberadas para o ambiente pela lise da célula bacteriana. Além da atividade bactericida propriamente dita, os fagos possuem enzimas, genericamente denominadas de despolimerases, que degradam polissacarídeos bacterianos e poderiam ser utilizadas como antibacterianos. Nos últimos anos, o interesse no uso de fagos como agente terapêutico (fagoterapia) foi retomado como estratégia para o controle biológico de bactérias multidrogarresistentes. Em trabalho anterior foram isolados fagos de amostras de compostagem utilizando-se o patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA14) como bactéria hospedeira. O fago ZC01 foi classificado no grupo denominado *Siphoviridae YuA-like* (família *Siphoviridae*) e o fago ZC03 pertence a um novo clado no grupo denominado *Podoviridae N4-like* (família *Podoviridae*). ZC01 e ZC03 são líticos para PA14 e se mostraram capazes de dissolver o biofilme dessa cepa. Neste trabalho tivemos como objetivos aprofundar a caracterização dos fagos ZC01 e ZC03 e avaliar seu potencial para fagoterapia na infecção por *P. aeruginosa* em modelo de *Galleria mellonella*. Determinamos que o fago ZC01 tem um período de latência de 100 minutos e produz ~87 partículas virais por célula infectada (*burst size*) aos 120 minutos do início da infecção, diferentemente do relatado para o fago ZC03 que possui um período latente de 50 minutos e *burst size* de aproximadamente 10 fagos. Nossos resultados mostraram que os fagos ZC01 e ZC03 são mais estáveis em temperaturas e pHs compatíveis com os fisiológicos (25°C e 37°C, pH 7,5) sendo que apresentam importante redução da viabilidade em pHs ácidos e alcalinos ou temperaturas acima de 60°C. Através de análises de proteômica, estimamos que os vírions de ZC01 e ZC03 sejam constituídos por, no mínimo, 27 e 40 proteínas, respectivamente, as quais incluem, além de proteínas estruturais típicas, como proteínas do capsídeo, cauda e de fibras da cauda, enzimas relacionadas a interação do fago e seu hospedeiro e proteínas com função ainda desconhecida. Apresentamos evidência empírica de que o fago ZC01 apresenta atividade de despolimerase possivelmente codificada por um domínio da ORF ZC01_066, anotada como proteína da fibra da cauda. Além disso, confirmamos que estes dois fagos têm uma abrangência restrita e relativamente distinta de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Finalmente, resultados iniciais mostraram que os fagos ZC01 e ZC03 são capazes de combater, ainda que parcialmente, a infecção por PA14 em larvas de *G. mellonella*. O desenvolvimento desse trabalho possibilitou o estabelecimento de protocolos de propagação e obtenção de vírions adequados para sua caracterização através de técnicas analíticas, tais como proteômica e microscopia eletrônica, e avaliação de seu potencial para fagoterapia.

Palavras chave: fago; *Pseudomonas aeruginosa*; PA14; fagoterapia, despolimerase

ABSTRACT

SANTOS-JR, ARIOSVALDO PEREIRA. Characterization of bacteriophages ZC01 and ZC03 and evaluation of their potential for phage therapy in *Pseudomonas aeruginosa* infections. 2020. 66 pages. Masters Dissertation - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Viruses that use bacteria as hosts for replication are called bacteriophages or phages. A viral particle (virion) contains a copy of the genome packaged within a capsid of varied morphology that is composed of proteins or lipids and proteins. Phages propagate through lytic or lysogenic life cycles. In the lytic cycle, after interaction with receptor molecules on the bacterial surface, the phage injects its genetic material into the cell, new viral particles are produced and released into the environment after bacterial cell lysis. In addition to the bactericidal activity itself, the phages produce enzymes, generally called as depolymerases. These enzymes degrade polysaccharides and have been suggested as antibacterials. Recently, the use of phages as therapeutic agents (phage therapy) has been renewed as a strategy for biological control of multidrug-resistant bacteria. In a previous work, phages were isolated from composting samples using as host bacterium the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (strain PA14). The phage ZC01 was classified in the *Siphoviridae* YuA-like group (family *Siphoviridae*) and the phage ZC03 belongs to a new clade in the *Podoviridae* N4-like group (family *Podoviridae*). ZC01 and ZC03 are lytic for PA14 and have been shown to dissolve the biofilm of this strain. In this work we aimed to expand the characterization of phages ZC01 and ZC03 and to evaluate their potential for phage therapy in *P. aeruginosa* infection using *Galleria mellonella* as animal model. We determined that phage ZC01 has a latency period of 100 minutes and produces ~87 viral particles per infected cell (burst size) upon 120 minutes after infection. On the other hand, it has been reported that phage ZC03 has a latent period of 50 minutes and burst size of approximately 10 phages. Our results showed that the phages ZC01 and ZC03 are more stable at temperatures and pHs compatible with physiological values (25°C and 37°C, pH 7.5), showing reduction in their viabilities upon exposure at acidic and alkaline pHs or temperatures above 60°C. Using proteomics, we estimated that the virions of ZC01 and ZC03 are composed of at least 27 and 40 proteins, respectively, which include, besides the typical structural proteins, such as capsid, tail and tail fiber proteins, enzymes related to the host-phage interaction as well as proteins with yet unknown function. We present empirical evidence that phage ZC01 has depolymerase activity possibly encoded by a domain in the ORF ZC01_066 which is annotated as a tail fiber protein. In addition, we confirm that these two phages have a restricted and relatively distinct host range of *P. aeruginosa* clinical isolates. Lastly, our initial results showed that phages ZC01 and ZC03 are capable of protect, even partially, the PA14 infection in *G. mellonella* larvae. The development of this work allowed us to establish protocols to obtain phage preparation adequate for characterization through analytical techniques, such as proteomics and electron microscopy, and for evaluation of phage therapy potential.

Keywords: phage; *Pseudomonas aeruginosa*; PA14; phage therapy; depolymerase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR:	<i>Antimicrobial/Antibiotic Resistance</i> (Resistência a antimicrobiano/antibiótico)
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMDR:	bactéria multidrogarresistente
CATG:	Centro Avançado de Tecnologias em Genômica
CEFAP:	Centro de Facilidades para a Pesquisa
CDS:	<i>Coding sequence</i> (Sequência codificadora de proteína)
CFU:	<i>Colony-forming unit</i>
DO_{600nm}:	Densidade ótica medida a 600nm
dsDNA:	DNA fita-dupla
dsRNA:	RNA fita-dupla
EOP:	<i>Efficiency of plating</i> (Eficiência de plaqueamento)
Fago:	Bacteriófago
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i> dos Estados Unidos da América
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
ICB-USP:	Instituto de Ciência Biomédicas da USP
ICTV:	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
IOC:	Instituto Oswaldo Cruz
IQ-USP:	Instituto de Química da USP
LC-MS/MS:	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
LPS:	Lipopolissacarídeo
MDR:	Multidrogarresistente
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão
MOI:	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplicidade de infecção)
MS/MS:	Espectrometria de massas sequencial
MS:	Espectrometria de massas
NCBI:	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
OMP:	<i>Outer Membrane Protein</i> (Proteína de membrana externa)
ORF:	<i>Open Read Frame</i> (Fase de leitura aberta)
PA14:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PA14
PAO1:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PAO1
pb:	pares de base
PE:	<i>Paired-end</i> (Extremidades pareadas)
PFU:	<i>Plaque-forming unit</i>
RBP:	<i>Receptor-binding protein</i> (Proteína de ligação ao receptor)
RPM:	Rotações por minuto
ssDNA:	DNA fita-simples
ssRNA:	RNA fita-simples
T4P:	Pilus do tipo 4
TSB:	<i>Trypticase Soy Broth</i>
USP:	Universidade de São Paulo
UV:	Ultravioleta
UFC:	Unidade formadora de colônia
UFP:	Unidade formadora de placa de lise
XDR:	Extensivamente drogarresistente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Marcos da fagoterapia.....	14
1.2. Fagoterapia no Brasil	15
1.3. Usos recentes da fagoterapia em humanos	17
1.4. Aspectos da biologia dos bacteriófagos	20
1.4.1. Determinantes do reconhecimento específico fago-bactéria	23
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2. OBJETIVOS	28
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
3.1. Cultivo e manutenção de <i>P. aeruginosa</i>	30
3.2. Medida da eficiência de plaqueamento (EOP).....	30
3.3. Curva de crescimento em uma etapa (<i>one step growth curve</i>).....	30
3.4. Propagação e purificação dos fagos ZC01 e ZC03	31
3.5. Efeito de pH, temperatura, UV e clorofórmio na estabilidade dos fagos	32
3.6. Análise proteômica dos vírions.....	32
3.6.1. Identificação de polipeptídios separados em SDS-PAGE	32
3.6.2. Proteômica <i>shotgun</i>	33
3.7. Detecção da atividade despolimerases de vírions.....	34
3.8. Ensaio de infecção com PA14 e fagos em <i>Galleria mellonella</i>	34
3.9. Análises bioinformáticas.....	35
3.10. Análises estatísticas.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Estabelecimento do protocolo para obtenção de preparação aprimorada de fagos	36
4.2. Curva de crescimento em uma etapa de ZC01 e comparação com ZC03...37	
4.3. Ensaio de estabilidade de ZC01 e ZC03	39
4.4. Identificação da composição proteica dos vírions de ZC01 e ZC03.....	42
4.4.1. Composição proteica dos vírions de ZC01	43
4.4.2. Composição proteica dos vírions de ZC03.....	46
4.5. Avaliação da possível despolimerase de ZC01	50

4.6. Avaliação da suscetibilidade de um conjunto previamente selecionado de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> à infecção por ZC01 e ZC03	51
4.7. Avaliação da eficácia de ZC01 e ZC03 no tratamento de larvas de <i>Galleria mellonella</i> submetidas à infecção por PA14	54
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

Vírus que utilizam bactérias como hospedeiros para sua propagação são denominados bacteriófagos ou, simplesmente, fagos (Guttman *et al.*, 2005). A partícula viral (vírion) contém uma cópia do genoma do fago (DNA ou RNA, fita-dupla ou fita simples) envolto por uma capa proteica ou lipídica e proteica (capsídeo) de morfologia variada (Nobrega *et al.*, 2018; Dion *et al.*, 2020; Koonin *et al.*, 2020). Além disso, a maioria dos cromossomos bacterianos incluem genomas de fagos, nesse caso denominados prófagos, os quais podem ser completos ou representar fragmentos de genomas virais (Brussow *et al.*, 2004; Feiner *et al.*, 2015).

De acordo com seu ciclo de vida predominante, os fagos são classificados como líticos (ou virulentos) ou lisogênicos (ou temperados). No ciclo lítico, após interação do vírion com moléculas receptoras da superfície bacteriana, o fago injeta o material genético na célula hospedeira e utiliza sua maquinaria de transcrição e tradução para produção de novas partículas virais que são liberadas no ambiente pela lise da bactéria. Por outro lado, os fagos temperados podem iniciar um ciclo alternativo, chamado de ciclo lisogênico, onde o genoma do fago é integrado ao cromossomo bacteriano (ou a um plasmídeo), tornando-se um prófago que se replica juntamente com o genoma da bactéria hospedeira (Guttman *et al.*, 2005; Feiner *et al.*, 2015).

Desde sua descoberta no início do século 20, os fagos têm sido ferramentas muito importantes no desenvolvimento da biologia molecular e da biotecnologia (Haq *et al.*, 2012; Harada *et al.*, 2018). Os fagos sempre foram considerados como agentes antimicrobianos potenciais. Entretanto, o advento dos antibióticos nas décadas de 30 e 40, aliado ao conhecimento insuficiente da biologia dos fagos, enfraqueceu o potencial de aplicação dos fagos como antimicrobianos, apesar dos vários casos de sucesso reportados em países da Europa Oriental (Stone, 2002; Dublanchet & Bourne, 2007). Nos últimos anos, o interesse no uso de fagos como agente terapêutico (fagoterapia) foi retomado como estratégia para o controle biológico de bactérias multidrograrresistentes (BMDR) (Brives & Pourraz, 2020; Moghadam *et al.*, 2020; Vila *et al.*, 2020).

Além da atividade bactericida propriamente dita, os fagos expressam uma gama de enzimas, genericamente denominadas de despolimerases, as quais degradam polissacarídeos bacterianos. Há um crescente interesse nessas enzimas, visto que poderiam ser utilizadas diretamente como antibacterianos ou como adjuvantes aos antibióticos convencionais (Pires *et al.*, 2016; Maciejewska *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Knecht *et al.*, 2020).

Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa foi realizado o isolamento de novos fagos a partir da compostagem termofílica do Parque Zoológico de São Paulo,

utilizando-se *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA14) como bactéria hospedeira. Os genomas desses fagos foram sequenciados e analisados (Amgarten *et al.*, 2017; Rossi, 2019). O isolamento e caracterização de fagos inéditos pode contribuir para elucidação de seu papel ecológico, além de abrir novas perspectivas para sua aplicação biotecnológica e terapêutica. O presente trabalho teve como objetivos aprofundar a caracterização de dois fagos isolados da compostagem, nomeados de ZC01 e ZC03, e avaliar seu potencial para fagoterapia na infecção por *P. aeruginosa* em modelo de *Galleria mellonella*.

1.1. Marcos da fagoterapia

Em 1896, o bacteriologista inglês Ernest Harkin relatou que a água dos rios Ganges e Jumna, na Índia, poderia combater o patógeno da cólera, e atribuiu esta atividade predatória a existência de microrganismos menores que bactérias (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Stone, 2002). Essa foi a primeira descrição de entidades biológicas capazes de infectar bactérias. Dois anos após essa descoberta, o microbiologista ucraniano Nikolay Gamaley observou o mesmo fenômeno em *Bacillus subtilis* (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Durante os anos seguintes vários pesquisadores observaram fenômenos semelhantes, mas somente em 1915 o assunto foi retomado, quando Frederick Twort, na Inglaterra, testava a hipótese dos vírus se propagarem em meios de cultura artificiais. Twort observou a ocorrência da mudança de aspecto em colônias de bactérias que contaminavam suas culturas, as quais se tornavam translúcidas, e sugeriu que esse efeito devia-se a vírus ultramicroscópicos, mas não avançou na sua investigação (Summers, 2005; Summers, 2012).

Em 1917, o termo bacteriófago (“fago”, do grego, “aquele que come”) é criado por Felix d’Herelle, microbiologista do Instituto Pasteur na França, que estudava a patogênese de *Shigella* e investigava tratamentos para disenteria de soldados franceses durante a Primeira Guerra Mundial. Seus estudos corroboravam resultados de outros pesquisadores, e levaram a hipótese de que partículas inofensivas aos humanos infectavam e matavam essas 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 dos bacteriófagos. 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, em Tbilisi na República Democrática da Geórgia, o *Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology*¹, primeiro instituto de fagoterapia no mundo (Stone, 2002). Até meados dos anos 30 a fagoterapia foi mundialmente utilizada com sucesso em várias infecções em humanos (Sulakvelidze & Kutter, 2005; Kortright *et al.*, 2019; Brives & Pourraz, 2020).

A descoberta da penicilina e suas propriedades antibióticas contra *Staphylococcus aureus*, em 1928 por Alexander Fleming (Demain & Sanchez, 2009) abalou a fagoterapia, a qual não estava adequadamente embasada em ensaios clínicos e não haviam protocolos bem estabelecidos para produção e uso de fagos terapêuticos (Sulakvelidze & Kutter, 2005). Assim, principalmente no ocidente, ela foi substituída pela antibioticoterapia e apenas alguns países do leste europeu continuaram a pesquisar e utilizar a fagoterapia (Sulakvelidze & Kutter, 2005; Gorski *et al.*, 2018; Kortright *et al.*, 2019; Źaczek *et al.*, 2020).

Porém, o uso indiscriminado de antibióticos resultou no aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos, e já em 1960, 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* eram resistentes a penicilina (Levy & Marshall, 2004). Ao longo do tempo tem se observado declínio na eficiência de agentes antimicrobianos, como consequência do surgimento de cepas bacterianas resistentes a múltiplos antibióticos (Davies & Davies, 2010). Há alguns anos, a Organização Mundial da Saúde tem alertado para a necessidade do incentivo da pesquisa para descoberta, desenvolvimento e produção de novos agentes terapêuticos contra bactérias resistentes a antibióticos². Nesse cenário, a fagoterapia tem sido retomada como uma ferramenta valiosa para o controle de infecções bacterianas, em que fagos e/ou enzimas de fagos poderiam ser utilizados isoladamente ou como adjuvante 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).

1.2. Fagoterapia no Brasil

Como já mencionado, no início de 1920 a fagoterapia se espalhou pela Europa e América (Dublanquet & Bourne, 2007). A história da fagoterapia no Brasil foi recentemente revisada (Almeida & Sundberg, 2020) destacando-se o pioneirismo do Dr. José da Costa Cruz, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) nessa área. Seus primeiros trabalhos reportando o uso de fagos contra a bactéria *Shigella dysenteriae* causadora de disenteria foram divulgados em 1923 (Pacheco, 1941). Embora o Dr. Costa Cruz não tenha tido sucesso

¹ <http://www.eliava-institute.org/?rid=2>

² <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

nos primeiros ensaios, o uso de fagos mais ativos resultou na melhora dos sintomas de pacientes com disenteria após 4-5 horas de tratamento (Almeida & Sundberg, 2020). Nesse mesmo ano, o IOC produziu 10 mil preparações de fagos que foram distribuídas por todo o Brasil para tratamento da disenteria. Foram reportados muitos casos de sucesso mostrando que a fagoterapia era o melhor tratamento contra disenteria na época, com sintomas desaparecendo em 2 dias. Estas preparações de fagos se tornaram a “Bacteriofagina disentérica”, produto que foi usado durante a Revolta Paulista de 1924. Esta foi, aparentemente, a primeira aplicação de fagoterapia em larga escala no mundo, e uma demonstração de sua segurança e eficácia. Sob este aspecto, o Brasil pode ser considerado um dos pioneiros na era de ouro da fagoterapia (Dublanche & Bourne, 2007; Almeida & Sundberg, 2020).

A partir de 1924, a fagoterapia começou a ser mais discutida pela comunidade médica brasileira, com relatos de casos clínicos de sucesso no tratamento de infecções por *Escherichia coli* e *Staphylococcus*. Em 1934, Dr. Costa Cruz foi um dos autores de um trabalho publicado na Academia Nacional Médica descrevendo um caso de sucesso da fagoterapia contra uma infecção causada por *Staphylococcus* em um garoto. Além da Bacteriofagina, outros produtos comerciais à base de fagos começaram a ser produzidos tais como Estafilofagina, Colifagina e Lisogenina Coli contra infecções por estafilococos e *E.coli* (Almeida & Sundberg, 2020).

Os fagos foram considerados como uma “terapêutica heroica” e, em pacientes tratados, as bactérias raramente se tornaram resistentes aos fagos. Vários pesquisadores brasileiros começaram a se interessar pelo assunto, pois nesse período o Brasil enfrentava sérios problemas com disenterias e infecções causadas por estafilococos. Entretanto, esse interesse praticamente desapareceu após a descoberta dos antibióticos. Em 1944, um experimento conduzido com ovos de galinha infectados com *Staphylococcus sp* tratados com antibióticos e fagos, mostrou que a penicilina era mais eficiente no tratamento. Outros ensaios clínicos de sucesso recomendando o uso de antibióticos para o tratamento de disenterias e relatos de insucessos da fagoterapia no mundo levaram ao abandono da fagoterapia no Brasil. A última publicação na literatura brasileira sobre o uso de fagos no Brasil ocorreu em 1950 (Almeida & Sundberg, 2020).

Assim como em outros países, também no Brasil, o surgimento de bactérias multidrogarresistentes (MDR) ressuscitou algum interesse na fagoterapia desde o final da década de 90, quando surgem relatos de pesquisadores brasileiros sobre o isolamento e uso de fagos para tratamento de infecções por *Salmonella* e *S. aureus* em frangos de corte e vacas leiteiras (Barrow *et al.*, 1998; Fiorentin *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2020). Em 2004, foi relatado um estudo *in vitro* utilizando fagos contra infecções causadas por *Enterococcus faecalis*, em dentes humanos (Paisano *et al.*, 2004). Os autores

mostraram que os fagos líticos foram eficientes em inibir o crescimento bacteriano em diferentes concentrações e, houve uma redução significativa da viabilidade das bactérias após 6 dias de incubação. Esse estudo sugeriu que a fagoterapia pode ser uma alternativa no tratamento de infecções do canal radicular dentário, em relação a terapias convencionais.

1.3. Usos recentes da fagoterapia em humanos

Apesar dos casos de sucesso relatados em países da Europa Oriental (Stone, 2002; Sulakvelidze & Kutter, 2005; Brussow, 2012; Kortright *et al.*, 2019; Żaczek *et al.*, 2020), a fagoterapia era, até recentemente, ignorada no resto do mundo, principalmente, pela insuficiência de estudos clínicos abrangentes que tenham demonstrado inequivocamente sua eficácia e segurança em humanos e ausência de regulamentação para sua utilização (Pirnay *et al.*, 2018; Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Os resultados do primeiro ensaio clínico multicêntrico, randomizado, simples-cego para avaliar a segurança e eficácia da fagoterapia em humanos foram publicados somente em 2019 (Jault *et al.*, 2019). Esse estudo denominado *PhagoBurn* foi proposto em 2010, com a definição de protocolos de boas práticas aprovados por agências regulatórias da França, Bélgica e Suíça, e teve como objetivo avaliar a eficácia da fagoterapia em infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em feridas de queimaduras severas. No estudo, realizado em 2017, foram recrutados 27 pacientes, dos quais 13 foram aleatoriamente selecionados para uso de um coquetel de 12 fagos líticos com título inicial estimado de 10^9 PFU/mL, formulados em uma pomada a base de alginato, a qual foi aplicada diretamente na queimadura, uma vez ao dia durante 7 dias, com seguimento por mais 14 dias. O grupo controle foi tratado com protocolo padrão usando pomada de sulfadiazina de prata. Os resultados obtidos mostraram que a fagoterapia reduziu a infecção em mais da metade dos pacientes, porém em tempo muito mais longo do que o verificado no grupo controle, sendo que não foram observados efeitos colaterais decorrentes do uso dos fagos. Esses resultados foram explicados pela instabilidade da preparação de fagos que resultou na aplicação de doses com 4 a 5 ordem de grandezas menores que o inicialmente previsto, entre outras limitações do estudo tais como pequeno número de pacientes e diferenças entre a composição da pomada utilizada no grupo controle e na fagoterapia (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Jault *et al.*, 2019).

Apenas em 2019, o FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA aprovou o primeiro ensaio clínico de terapia com bacteriófagos administrada por via intravenosa (Voelker, 2019). Nesse ensaio clínico serão avaliados os aspectos de segurança,

tolerabilidade e eficácia da fagoterapia em 10 pacientes com respiração mecânica que tenham desenvolvido infecções por *S. aureus*.

Dentre os relatos recentes do uso de fagoterapia, está o tratamento de uma paciente de 67 anos de idade com infecção recorrente no trato urinário causada por *P. aeruginosa* e refratária ao tratamento com múltiplos antibióticos (Khawaldeh *et al.*, 2011). O tratamento ocorreu em um hospital na Austrália mediante autorização de uso compassivo. Para esse tratamento foi utilizada uma preparação contendo 6 fagos líticos da coleção do *Eliava Institute* selecionados contra a linhagem infectante. Os fagos foram aplicados com um cateter diretamente na bexiga a cada 12 horas durante 10 dias, sendo iniciada a administração de antibióticos após 6 dias e mantida por 30 dias. Após 8 dias do início da fagoterapia foi observada a redução da infecção, seguida da total eliminação da bactéria colonizante (Khawaldeh *et al.*, 2011).

Em um caso ocorrido em 2017, na Itália, (Corbellino *et al.*, 2020) foi administrada uma preparação de bacteriófago lítico para tratar uma grave infecção sistêmica e recorrente causada por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a carbapenêmicos em uma paciente de 57 anos com doença Crohn (doença inflamatória do trato gastrointestinal). O fago lítico específico para o isolado bacteriano colonizador foi obtido da coleção de fagos do *Eliava Institute*, e a preparação de fagos foi administrada via oral (suspensão aquosa cada 12 horas durante 3 semanas) e intra-retal (supositório 1 vez ao dia por 2 semanas). Os autores reportaram a erradicação da linhagem colonizadora e ausência de efeitos adversos para a paciente.

Nos EUA, em 2018, foi realizada a fagoterapia em um paciente de 68 anos de idade diabético com pancreatite necrosante agravada por infecção com *Acinetobacter baumannii* MDR (Schooley *et al.*, 2018). Ao longo de 4 meses foi realizado o tratamento com antibióticos o qual não eliminou a infecção e a condição clínica do paciente deteriorou. A fagoterapia foi então indicada mediante autorização de uso compassivo. Para tal foram utilizados 9 fagos líticos, obtidos de diferentes coleções de fagos nos EUA, efetivos contra isolados de *A. baumannii* MDR oriundos do próprio paciente. Três coquetéis diferentes de fagos foram aplicados via percutânea diretamente nas cavidades ou via intravenosa, inicialmente a cada 12 horas por 2 dias e, posteriormente a cada 2 horas por 18 semanas. Ao longo das 3 semanas após início da fagoterapia foi observada melhora da condição clínica do paciente, com concomitante desaparecimento da infecção por *A. baumannii*. Durante o tratamento, os fagos foram administrados em conjunto com antibióticos para o controle de infecções por outras bactérias. O paciente foi liberado do hospital após 136 dias do início da fagoterapia (após 245 dias do início da infecção) e considerado curado (Schooley *et al.*, 2018).

Em 2019, um coquetel de 3 fagos engenheirados geneticamente foi usado, na Inglaterra, para tratar uma paciente de 15 anos com fibrose cística que apresentou uma infecção disseminada por *Mycobacterium abscessus* após transplante pulmonar. A paciente foi submetida a antibioticoterapia, que não impediu o aparecimento de lesões cutâneas. Inicialmente foi feita a aplicação tópica do coquetel de fagos em única dose, seguindo-se aplicação por via intravenosa a cada 12 horas por 32 semanas. Após 1 mês do início da fagoterapia, foi observada melhoria das lesões, incluindo cicatrização gradual da ferida esternal que recebeu a aplicação tópica dos fagos. Após 6 meses a paciente apresentou função hepática e pulmonar melhorada e desaparecimento substancial de nódulos cutâneos infectados (Dedrick *et al.*, 2019). Os fagos empregados nesse tratamento derivaram de uma coleção de mais de 10 mil fagos que foram isolados utilizando-se *Mycobacterium smegmatis* como hospedeira, e foram geneticamente modificados para melhorar sua eficiência lítica e ampliar o espectro de linhagens suscetíveis (Hatfull, 2015; Dedrick *et al.*, 2019).

A estes relatos de caso, somam-se outros nos quais, embora a infecção bacteriana tenha sido esterilizada pela fagoterapia, o paciente, geralmente com quadro clínico severo já no início do tratamento, morreu de outras causas após término da fagoterapia (Duplessis *et al.*, 2017; Jennes *et al.*, 2017; Gilbey *et al.*, 2019).

Dentre as vantagens elencadas para uso de fagos como agente terapêutico estão a sua alta especificidade e abrangência limitada de hospedeiros, que são características comuns para a maioria dos fagos já conhecidos e que permite supor que a microbiota comensal não deve ser afetada nessa estratégia de tratamento. Além disso, a fagoterapia pode ser empregada onde outros tratamentos falharam e possui baixa ou nenhuma toxicidade. Somado a isso, os fagos têm a capacidade de multiplicação no local da infecção e, teoricamente, se mantêm viáveis até redução completa da população bacteriana alvo. Outra vantagem é a facilidade de obtenção de fagos com alto grau de pureza (Brussow, 2017; Brives & Pourraz, 2020; Gorski *et al.*, 2020; Moghadam *et al.*, 2020; Vila *et al.*, 2020). Entre as desvantagens, estão o fato da fagoterapia requerer a identificação precisa da espécie/linhagem bacteriana alvo e o potencial desenvolvimento de resistência bacteriana contra o fago lítico. Para contornar algumas destas questões, propõe-se o uso de coquetéis de fagos distintos para ampliar o espectro de ação da fagoterapia (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Moghadam *et al.*, 2020).

As características de interesse na seleção de fagos terapêuticos incluem: serem obrigatoriamente líticos, não-transdutores, que reconheçam como receptores fatores de virulência do patógeno alvo (no caso de se tornarem resistentes, os patógenos seriam menos virulentos) e que derivem de ambientes naturais (Brussow, 2017). Já existem

coleções de centenas de bacteriófagos líticos para linhagens de patógenos importantes, as quais estão sendo constantemente expandidas (Weber-Dabrowska *et al.*, 2016).

1.4. Aspectos da biologia dos bacteriófagos

Vírus que infectam microrganismos procarióticos ou eucarióticos, são atualmente referidos como vírus de microrganismos (VOM) (Hyman & Abedon, 2018). Porém, tradicionalmente, os vírus que utilizam bactérias como hospedeiros, são denominados bacteriófagos ou, simplesmente, fagos (Guttman *et al.*, 2005). Além disso, a maioria dos cromossomos bacterianos incluem genomas de prófagos, os quais podem ser completos ou representar fragmentos de genomas virais (Brussow *et al.*, 2004; Feiner *et al.*, 2015).

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica foi possível identificar as estruturas virais, e verificar que essas entidades biológicas são formadas de proteínas, DNA ou RNA, fita-dupla ou simples, propagando-se como hospedeiros obrigatórios em células de todos os domínios da vida (Ackermann, 2012). Hoje sabemos que os vírus não atuam só como agentes patogênicos, mas desempenham papel na evolução e no equilíbrio de ecossistemas. Estima-se que os vírus sejam encontrados em todos os ambientes. A predição é de que existam de 10 a 100 vírus para cada célula microbiana, sendo os fagos, portanto, as entidades biológicas mais abundantes na biosfera (Rohwer *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018; Koonin *et al.*, 2020).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV)³ classifica os vírus seguindo o sistema hierárquico similar a taxonomia de Lineu, isto é, de clados mais altos para os mais baixos (ex: classe, ordem, família, subfamília, gênero e espécie) (Gorbalenya *et al.*, 2020). Atualmente há complexas discussões sobre o conceito de espécie em vírus, por ser considerado até então um grupo polifilético (Moreira & López-García, 2009; Bobay & Ochman, 2018).

A classificação taxonômica dos fagos, baseada em similaridades morfológicas e genômicas, também está em constante discussão (Rohwer & Segall, 2015). Os critérios atuais de classificação se baseiam na natureza de seu material genético (DNA ou RNA, fita-dupla ou fita-simples) e na morfologia da partícula viral (vírion), visualizada por microscopia eletrônica (Nobrega *et al.*, 2018; Dion *et al.*, 2020; Koonin *et al.*, 2020) (Figura 1).

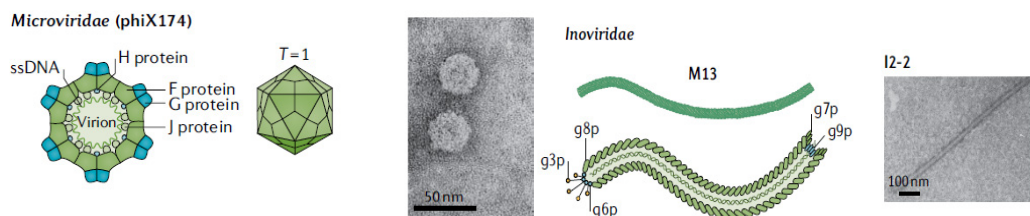
A grande maioria dos fagos conhecidos (~95%) pertencem a ordem *Caudovirales* (*tailed-phages*) (Figura 1B). Os fagos dessa ordem têm o genoma de DNA fita-dupla (dsDNA) envolto por capsídeo proteico poliédrico, frequentemente icosaédrico, que está

³ <https://talk.ictvonline.org/>

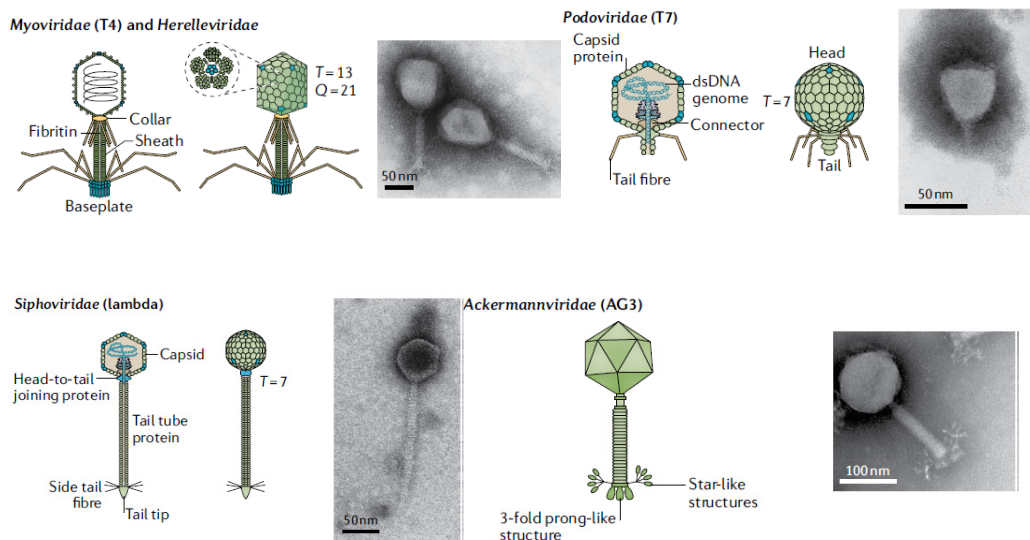
conectado com uma cauda proteica que pode conter fibras e/ou espigas (*spike*) terminais. Esta ordem é constituída das famílias *Myoviridae*, *Herelleviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* e *Ackermannviridae*. (Gandon, 2016; Fernandez *et al.*, 2018; Nobrega *et al.*, 2018; Dion *et al.*, 2020). Os *Myoviridae* e *Herelleviridae* possuem uma cauda complexa e contrátil (ex: fago T4), os *Podoviridae* tem uma cauda curta não-contrátil (ex: fago T7), os *Siphoviridae* apresentam uma cauda longa e não-contrátil (ex: fago λ). Membros da família *Ackermannviridae* (ex: fago AG3) são morfológicamente similares aos *Myoviridae*, porém distintos quanto as respectivas estruturas das fibras terminais da cauda (Figura 1B).

Estudos de genômica e proteômica de fagos mostram que a grande maioria dos genes e proteínas dos fagos são de função e origem desconhecida (Rohwer & Segall, 2015; Ha & Denver, 2018; Harada *et al.*, 2018; Turner *et al.*, 2018; Shkoporov & Hill, 2019), o que certamente irá resultar em mudanças na classificação adotada atualmente.

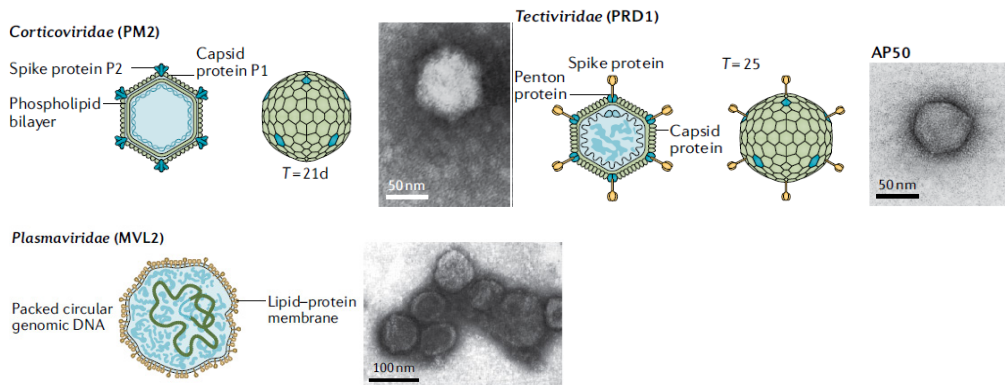
A- Fagos ssDNA



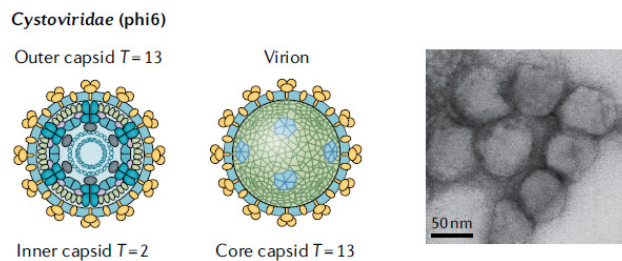
B- Fagos dsDNA com cauda (*Caudovirales*)



C- Fagos ssDNA sem cauda



D- Fagos ssRNA



E- Fagos dsRNA

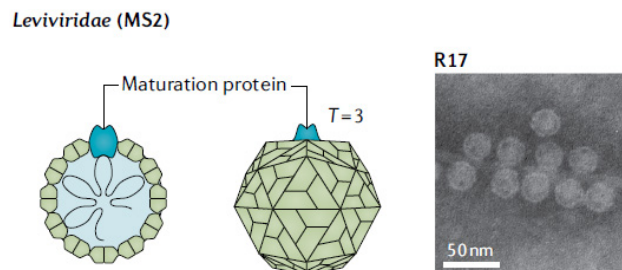


Figura 1. Classificação dos fagos com base na morfologia e tipo do material genético. Para cada tipo são mostrados um esquema e a imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET). **(A)** Fagos de DNA fita simples (ssDNA). **(B)** Fagos de DNA fita-dupla (dsDNA) com cauda, ordem *Caudovirales*. O capsídeo (*head*), a cauda (*tail*), placa basal (*baseplate*) e fibras terminais (*tail fibers*) estão indicados. **(C)** Fagos de dsDNA sem cauda. **(D)** Fagos de RNA fita simples (ssRNA). **(E)** Fagos RNA fita-dupla (dsRNA). A classificação mostrada é segundo o ICTV. Os esquemas foram retirados de Dion *et al.* (Dion *et al.*, 2020).

Após os fagos se ligarem à superfície da célula hospedeira (etapa de adsorção) e injetar seu material genético através da membrana bacteriana, os fagos se propagam através do ciclo de vida lítico ou ciclo lisogênico. No ciclo lítico novas partículas virais são

produzidas utilizando-se a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria hospedeira, ocorrendo a lise da bactéria e liberação da progênie viral para o ambiente (Guttman *et al.*, 2005). No cultivo laboratorial realizado sobre uma camada de bactérias (tapete de bactérias) em meio sólido, a infecção por fagos líticos resulta no surgimento de pequenos círculos claros no tapete bacteriano, referidos como placas de lise. A contagem do número de placas de lise é a forma mais comum para determinar a concentração de vírions na amostra, isto é, o número de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL ou UFC/mL) aplicadas ao tapete bacteriano (Anderson *et al.*, 2011). Embora o ciclo lítico esteja geralmente associado à lise celular, alguns tipos de fagos, como o fago filamentosso M13 de *E. coli*, são liberados sem que ocorra a lise do hospedeiro (Loh *et al.*, 2019).

Os fagos chamados de temperados, embora capazes de catalisar um ciclo lítico, podem estabelecer uma relação mais duradoura com seu hospedeiro, pela integração de seu material genético no genoma bacteriano no ciclo lisogênico. Nesse caso, há transmissão vertical do genoma do fago que se replica juntamente com seu hospedeiro (ciclo lisogênico), podendo permanecer por infinitas gerações como prófago (Feiner *et al.*, 2015; Gandon, 2016). No fago λ , um fago temperado de *Escherichia coli*, a lisogenização está sob o controle de uma proteína repressora (cI) que é expressa pelo prófago e previne a expressão de genes relacionados à ativação do ciclo lítico. Frente a estresses ambientais, principalmente os que causam danos no DNA, o ciclo lítico é disparado. No modelo do fago λ , a mudança do ciclo lisogênico para lítico deve-se a diminuição da concentração do repressor cI com consequente ativação dos genes de transcrição relacionados ao ciclo. Embora naturalmente probabilística, a decisão do fago λ pelo ciclo lítico ou lisogênico parece ser influenciada pelo estado nutricional da bactéria infectada e pelo número de fagos coinfectantes (Gandon, 2016).

1.4.1. Determinantes do reconhecimento específico fago-bactéria

A interação dos fagos com a bactéria hospedeira ocorre, inicialmente, por colisões randômicas e difusão na superfície celular, o que pode ser influenciado por fatores físico-químicos (temperatura, pH e presença de certos íons) e pelo estado fisiológico da bactéria. Uma vez que o fago é aderido (adsorvido) de modo específico a superfície bacteriana, inicia-se o processo de infecção. A etapa de adsorção envolve interações reversíveis e irreversíveis do vírion a estruturas da bactéria (receptores) que possibilitam seu reconhecimento específico como um potencial hospedeiro suscetível para infecção (Silva *et al.*, 2016; Nobrega *et al.*, 2018). Esta etapa é característica de cada par fago-hospedeiro e é crucial no processo de infecção, representando o primeiro contato do vírus com o

hospedeiro e determinando a especificidade e abrangência dessa interação (*host-range*) (Silva *et al.*, 2016; Letarov & Kulikov, 2018; Nobrega *et al.*, 2018; de Jonge *et al.*, 2019).

O sucesso da infecção lítica dependerá da superação dos mecanismos de defesa (sistemas de imunidade) do hospedeiro e da eficiente subversão de seus processos celulares de modo a favorecer a propagação e liberação de novos vírions (De Smet *et al.*, 2017; de Jonge *et al.*, 2019; Hampton *et al.*, 2020).

Os vírions possuem proteínas de ligação ao receptor (RBP, *receptor-binding protein*) capazes de reconhecer e ligar-se de forma específica aos diferentes tipos de receptores existentes na superfície bacteriana (de Jonge *et al.*, 2019). As RBPs são altamente diversas, o que pode dificultar sua identificação *in silico* na análise de genomas virais. Nos *Caudovirales*, as RBPs já identificadas reconhecem diferentes moléculas ou estruturas na superfície da bactéria, tais como lipopolissacarídeo (LPS), polissacarídeos, proteínas da membrana externa (OMP, *outer membrane protein*), fimbrias, *pilus* e flagelo (Silva *et al.*, 2016; Letarov & Kulikov, 2018; Nobrega *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018). Alguns fagos reconhecem apenas um tipo de receptor (fagos monovalentes) enquanto outros podem se ligar a variantes de um mesmo tipo de receptor ou a múltiplos receptores (fagos polivalentes). No primeiro caso, a previsão é que tais fagos apresentem abrangência limitada de linhagens bacterianas suscetíveis à infecção (*narrow host-range*) enquanto no segundo caso é possível que tais fagos tenham um espectro maior de hospedeiros suscetíveis (*broad host-range*). A maioria dos fagos conhecidos encaixam-se no primeiro caso, exibindo uma abrangência restrita de hospedeiros limitada a poucas cepas bacterianas. Vale destacar que os fagos evoluem rapidamente, e podem, em certas condições, alterar sua abrangência de hospedeiros (de estreita para ampla) como resultado de mutações em suas RBPs ou em outros genes (de Jonge *et al.*, 2019).

Na bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, os principais receptores da adsorção já identificados para fagos dessa bactéria são o *pilus* do tipo 4 (T4P) (Budzik *et al.*, 2004; Chibeu *et al.*, 2009; Bae & Cho, 2013; Kim *et al.*, 2018) e o LPS (Latino *et al.*, 2017; Olszak *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Latino *et al.*, 2019).

O T4P de *P. aeruginosa* está envolvido na formação de biofilme e adesão às células do hospedeiro eucariótico, além de permitir motilidade celular do tipo *twitching* (Burrows, 2012). Os T4P têm estrutura alongada, fina e fibrosa, sendo que, em *P. aeruginosa*, a proteína PilA é a pilina majoritária do filamento (Craig *et al.*, 2019). Estão descritas cinco variantes de PilA em *P. aeruginosa*, as quais diferem quanto ao seu tamanho (150 a 173 aminoácidos), quanto ao número de aminoácidos (12 a 29 aminoácidos) entre as duas cisteínas C-terminal, que formam uma alça com ligação dissulfeto que é crítica para função estrutural e funcional da proteína, e pela presença de genes acessórios na vizinhança do gene *pilA*. Duas das variantes de PilA podem ser glicosiladas, sendo que a glicosilação de

PilA está relacionada a mecanismos de defesa da bactéria à adsorção dos fagos (Harvey *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018).

O LPS de *P. aeruginosa* contribui substancialmente para sua virulência (Lam *et al.*, 2011). Três elementos estruturais compõem o LPS: lipídio A polissacarídeo central e o polissacarídeo (antígeno-O). Em *P. aeruginosa* são sintetizados dois tipos de cadeias do antígeno O: cadeia A (homopolímero de trissacarídeos de ramnose), mais curta, e cadeia B (heteropolímero de di- a pentassacarídeos de diversos açúcares), mais longa. A estrutura da cadeia B (antígeno O-específico) fornece a base para classificação dos 20 sorotipos de *P. aeruginosa*. Estudos com mutantes em genes da via de síntese do antígeno O demonstraram que alguns fagos de *P. aeruginosa* requerem a presença de cadeias B longas para o sucesso da infecção (Latino *et al.*, 2017).

Em diversos *Caudovirales* já caracterizados, as RBPs estão nas fibras laterais e fibra central da cauda, nas espigas da cauda e/ou nas estruturas protuberantes da placa basal (Nobrega *et al.*, 2018). Para alguns poucos fagos de *P. aeruginosa*, a proteína da fibra da cauda foi experimentalmente identificada como uma RBP, sendo que no caso do fago LKA1 esta proteína exibe atividade de polissacarídeo-liase do antígeno O (Le *et al.*, 2013; Olszak *et al.*, 2017).

Além de proteínas estruturais e enzimas relacionadas a replicação e expressão do genoma viral, os fagos expressam proteínas que reconhecem, ligam e degradam polissacarídeos, as quais são genericamente denominadas de despolimerases (Pires *et al.*, 2016; Latka *et al.*, 2017). Estas enzimas são importantes para que o fago supere as diversas barreiras de polissacarídeos das bactérias (peptoglicano, LPS, exopolissacarídeos) até que consiga aderir a célula bacteriana e ejetar o material genético no citoplasma da hospedeira. As despolimerases auxiliam na adsorção irreversível do fago, pela degradação dos polissacarídeos de “fora para dentro”. Também poderiam ser incluídas dentre as despolimerases, as enzimas que degradam a parede bacteriana para liberação dos novos vírions, as endolisinas, nesse caso uma degradação de polissacarídeos de “dentro para fora” (Oliveira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Knecht *et al.*, 2020).

As despolimerases podem ser encontradas como proteínas associadas aos vírions, podendo também ser encontradas como domínios catalíticos de proteínas estruturais do vírion (Hsieh *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018). Como já mencionado, a proteína da fibra da cauda do fago LKA1 tem um domínio de polissacarídeo-liase (Olszak *et al.*, 2017) que degrada o antígeno O. De modo similar, a proteína da fibra da cauda do fago AB6 de *Acinetobacter baumannii*, que também é uma RBP, apresenta um domínio de despolimerase responsável pela degradação do exopolissacarídeo (Lee *et al.*, 2017). Por outro lado, foi demonstrado que o genoma de um novo fago de *E. coli* codifica uma

despolimerase que degrada biofilme, atividade que foi confirmada pela expressão recombinante da enzima (Guo *et al.*, 2017). A atividade de despolimerase de vírions pode ser verificada experimentalmente pela formação de um halo túrbido ao redor da placa de lise, o qual resulta da degradação do exopolissacarídeo quando não há mais propagação do fago (Pires *et al.*, 2016; Knecht *et al.*, 2020).

Há um crescente interesse nas despolimerases de fagos, as quais poderiam ser utilizadas diretamente como antibacterianos ou como adjuvantes da fagoterapia ou da antibioticoterapia convencional (Maciejewska *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Knecht *et al.*, 2020).

1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista que causa infecções agudas ou crônicas em pacientes imunodeprimidos. A infecção aguda pode se espalhar rapidamente, causando intenso dano tecidual e sepse, enquanto a infecção crônica pode persistir por semanas ou meses. As infecções por essa bactéria lideram as causas de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística, e é frequente em outras doenças pulmonares. *P. aeruginosa* também é um dos principais agentes de infecções nosocomiais, podendo contaminar respiradores e cateteres entre outros equipamentos hospitalares. De particular importância são as infecções por *P. aeruginosa* em feridas crônicas e de queimaduras em tecidos moles. Embora, menos prevalente, esse patógeno também pode causar otite média e foliculite em infecções comunitárias adquiridas (Beaume *et al.*, 2017; Juan *et al.*, 2017; Moradali *et al.*, 2017).

P. aeruginosa é uma bactéria aeróbica Gram-negativa que pode ser encontrada em diferentes e variados habitats como plantas, animais, solo e água. A capacidade dessa espécie colonizar com sucesso diversos hospedeiros e ambientes tem sido associada a elevada complexidade e plasticidade de seu genoma, considerado relativamente grande (5–7 Mpb) (Moradali *et al.*, 2017; Freschi *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* exibe enorme versatilidade metabólica, sendo capaz de produzir ampla gama de metabólitos secundários e substâncias poliméricas, além de poder utilizar diferentes fontes de carbono e aceptores de elétrons. Essa versatilidade metabólica, a produção de vasto repertório de fatores de virulência, a formação de biofilme e sua marcante resistência intrínseca a distintos antimicrobianos são determinantes críticos que contribuem para a virulência e patogenicidade de *P. aeruginosa* (Moradali *et al.*, 2017).

Somada a reduzida sensibilidade a uma ampla variedade de antibióticos, *P. aeruginosa* apresenta uma extraordinária capacidade de desenvolver/adquirir resistência adicional a antibióticos, por mutações em seu cromossomo ou por transferência lateral de

genes (Poole, 2011; Botelho *et al.*, 2019). Independentemente dos mecanismos envolvidos, tem se observado, mundialmente, o aumento da prevalência de clones de *P. aeruginosa* multidrogarresistentes (MDR) ou extensivamente drogarresistentes (XDR), com taxas variando de 15% a 30% dependendo da região geográfica (Horcajada *et al.*, 2019).

P. aeruginosa é parte do grupo ESKAPE, acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, que inclui patógenos responsáveis pela maioria das infecções hospitalares e que exibem crescente virulência e resistência a drogas (Rice, 2008; Mulani *et al.*, 2019). Em 2017, OMS listou a *P. aeruginosa* juntamente a *A. baumannii* e *Enterobacteriaceae* dentre os 3 patógenos resistentes a carbapenêmicos⁴ que demandam máxima prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018). Ao lado da busca por novos antibióticos, o desenvolvimento de estratégias alternativas para o combate de patógenos ESKAPE tem recebido bastante atenção nos últimos anos, tais como uso combinado de diferentes antibióticos (com ou sem compostos adjuvantes), peptídeos antimicrobianos, terapia fotodinâmica, nanopartículas de prata e fagoterapia (Horcajada *et al.*, 2019; Mulani *et al.*, 2019; Vila *et al.*, 2020).

Como discutido anteriormente (item 1.3), o interesse na fagoterapia foi retomado na última década, e alguns casos de sucesso no tratamento de pacientes acometidos por infecções bacterianas graves têm sido reportados. Dentre estas, destacamos a aplicação da fagoterapia em infecções por *P. aeruginosa* em feridas de queimaduras, no âmbito do ensaio clínico denominado *PhagoBurn* (Jault *et al.*, 2019) e, mediante uso compassivo, no tratamento de paciente com infecção crônica no trato urinário (Khawaldeh *et al.*, 2011). Alguns estudos também já demonstraram a eficácia da fagoterapia em infecções por *P. aeruginosa* em modelos murino, de *Galleria mellonella* ou de *zebra fish* (Beeton *et al.*, 2015; Danis-Wlodarczyk *et al.*, 2016; Oechslin *et al.*, 2016; Waters *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018; Forti *et al.*, 2018; Cafora *et al.*, 2019; Jeon & Yong, 2019).

Fagos que infectam *Pseudomonas spp.* podem ser isolados de amostras de solo e de água, e são também encontrados em tecidos humanos infectados por *P. aeruginosa* (Ceyssens & Lavigne, 2010; James *et al.*, 2012; De Smet *et al.*, 2017). A análise comparativa de genomas de fagos de *Pseudomonas* (130 sequências publicamente disponíveis até fevereiro/2016, destas 107 de fagos de *P. aeruginosa*) demonstrou elevada diversidade e alto mosaicismismo genômico, e grande número de ORFs sem função predita, como observado em fagos de outras espécies bacterianas (Ha & Denver, 2018).

⁴ <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivos** aprofundar a caracterização dos fagos ZC01 e ZC03 e avaliar seu potencial para fagoterapia na infecção por *P. aeruginosa* em modelo de *Galleria mellonella*. Para tal, estipulamos os seguintes **objetivos específicos**:

1. Estabelecer protocolos de propagação, obtenção e purificação de vírions adequados para sua caracterização através de técnicas analíticas, tais como proteômica e microscopia eletrônica, e para avaliação de seu potencial para fagoterapia;
2. Determinar o número de partículas virais produzidas por célula (*burst size*) para o fago ZC01 para uma comparação com ZC03 (já determinado em trabalho anterior);
3. Avaliar a estabilidade dos fagos ZC01 e ZC03 em diferentes temperaturas e pHs e na exposição a luz UV e clorofórmio;
4. Determinar a composição proteica dos vírions de ZC01 e ZC03 através de proteômica;
5. Prospectar atividade de despolimerase nos fagos;
6. Confirmar a suscetibilidade ou resistência a infecção por ZC01 e ZC03 de um conjunto previamente selecionado de isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
7. Avaliar a eficácia de ZC01 e ZC03 no controle da infecção por *P. aeruginosa* utilizando larvas de *Galleria mellonella* como modelo animal;

Os fagos ZC01 e ZC03 investigados nesse trabalho foram isolados de amostras de compostagem utilizando-se *P. aeruginosa* cepa PA14 como hospedeira, e tiveram seus genomas sequenciados e anotados. O fago ZC01 foi classificado no grupo denominado *Siphoviridae YuA-like* (família *Siphoviridae*) enquanto ZC03 pertence a um novo clado no grupo denominado *Podoviridae N4-like* (família *Podoviridae*). O genoma do fago ZC01 tem 57.061 pb e conteúdo G+C de 63% enquanto que o genoma de ZC03 apresenta 69.844 pb e conteúdo G+C de 42% (Amgarten *et al.*, 2017).

ZC01 e ZC03 são líticos para PA14 e se mostraram capazes de dissolver o biofilme dessa cepa. Por outro lado, a cepa de referência PAO1 não é suscetível a lise por esses fagos. Estudos iniciais mostraram que esses fagos exibem uma abrangência restrita de hospedeiros, sendo efetivos em apenas um pequeno conjunto de isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Amgarten *et al.*, 2017).

Como já mencionado (item 1.5), *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que causa infecções agudas ou crônicas em pacientes imunodeprimidos, que apresenta resistência intrínseca a distintos antimicrobianos. A cepa PA14 de *P. aeruginosa* foi isolada, na década de 70, de queimadura em um paciente hospitalizado nos EUA (Mathee, 2018). A cepa PAO1 é um mutante espontâneo derivado do isolado PAO obtido na Austrália em 1954 a partir de uma ferida (Chandler *et al.*, 2019). A cepa PA14 é altamente virulenta tanto em animais como em plantas e contém duas ilhas de patogenicidade que estão ausentes em PAO1 (He *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006), e está gradualmente substituindo a cepa PAO1 em estudos de patogenicidade de *P. aeruginosa* (Mathee, 2018).

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Cultivo e manutenção de *P. aeruginosa*

As cepas (PA14 e PAO1) e isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram cultivados a 37°C em meio TSB (*Trypticase Soy Broth*) contendo ou não bacto-ágar 1,5%. Os estoques de células foram mantidos em TSB contendo 10% (v/v) de glicerol em freezer a -80°C ou em tanques de nitrogênio líquido.

3.2. Medida da eficiência de plaqueamento (EOP)

O protocolo para medida da eficiência de plaqueamento (EOP) foi adaptado do protocolo descrito por Letarov e Kulikov (Letarov & Kulikov, 2018). Culturas das cepas ou isolados de *P. aeruginosa* crescidas por 16 horas a 37°C foram normalizadas para $DO_{600nm} = 1,0$ (correspondendo a $\sim 3 \times 10^9$ CFU/mL) e incubadas por 10 min a 37°C com 8 diluições seriadas de 1:10 preparadas a partir de estoques concentrados de fagos (10^{10} a 10^{16} PFU/mL). Em seguida a suspensão de bactérias e fagos foi misturada com 7 mL de meio TSB contendo ágar 0,7% (top-ágar 0,7%) e vertida em uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio TSB ágar 1,5%. Após incubação por 18 horas a 37°C, o número de unidades formadoras de placa/mL (PFU/mL) foi determinado pela contagem das placas de lise (Abedon, 2018). A eficiência de plaqueamento (EOP) dos fagos em estudo foi calculada pela divisão dos respectivos títulos alcançados na infecção de cada isolado de *P. aeruginosa* em relação ao título alcançado na cepa de referência PA14.

3.3. Curva de crescimento em uma etapa (*one step growth curve*)

A curva de crescimento em uma etapa foi realizada como descrito por Pelzek *et al* (Pelzek *et al.*, 2013) com algumas adaptações. *P. aeruginosa* PA14 foi crescida a 37°C em meio TSB líquido até $DO_{600nm} = 1,0$ (correspondendo a 3×10^9 CFU/mL) e 5 mL desta suspensão foram misturados com 5 mL de uma suspensão do fago ZC01 (1×10^8 PFU/mL) em tampão SM (MOI = 0,1). Após incubação por 10 min a 37°C, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi recolhido e titulado, a fim de calcular o número de células infectadas, a partir da quantidade de fagos que não adsorveram nas bactérias. O precipitado foi ressuspensão em 20 mL de TSB e incubado a 37°C sem agitação. A cada 10 min, em um período de até 3 horas, foi coletada uma alíquota de 1 mL da amostra e utilizada para a preparação de diluições seriadas e plaqueamento com 100µL de PA14

($DO_{600nm} = 1,0$). Após 18 horas de incubação a 37°C, as placas de lise foram contadas e o número de PFU/mL em cada alíquota coletada foi calculado.

3.4. Propagação e purificação dos fagos ZC01 e ZC03

Os fagos ZC01 e ZC03 foram propagados em *P. aeruginosa* PA14 seguindo os protocolos descritos por Azeredo e Sillankorva (Azeredo & Sillankorva, 2018). A cultura bacteriana (500µL de cultura em meio TSB líquido com $DO_{600nm} = 1,0$ correspondendo a 3×10^9 CFU/mL) foi misturada com 50-90µL de uma suspensão de fagos (MOI= 0,01) seguindo-se incubação por 10 min a 37°C. A suspensão de bactérias e fagos foi misturada com 13 mL de meio TSB contendo ágar 0,7% (top-ágar 0,7%), vertida na placa de Petri (140 mm de diâmetro) contendo meio TSB ágar 1,5% e incubada por 18 horas a 37°C. Para obtenção de preparações de fagos em maior escala, foram preparadas várias placas de Petri. Após incubação, a cada uma foi adicionado 15 mL de tampão SM (NaCl 3%, MgSO₄ 10mM, CaCl₂ 10mM, Tris-HCl 30mM, pH 7,5), seguindo-se agitação por 1 hora à temperatura ambiente, incubação a 4°C sem agitação por uma noite e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. O lisado coletado de várias placas de Petri foi reunido e transferido para tubos cônicos de 50 mL, seguindo-se centrifugação a 10000 rpm por 20 min. Ao sobrenadante foi adicionado clorofórmio para concentração final de 10%, seguindo-se centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22µm e titulado para cálculo de PFU/mL.

A preparação de fagos foi purificada utilizando-se precipitação com PEG e ultracentrifugação em CsCl. A solução estoque de PEG-8000/NaCl 5x foi preparada pela dissolução de 100g de PEG-8000 (20% p/v) e 75g NaCl (2,5 M) em 400 mL de H₂O para volume final de 500 mL. Esta solução estoque foi adicionada à preparação de fagos obtida como descrito acima na proporção 1:4 (1 volume de PEG-8000/NaCl 5x para 4 volumes da preparação de fagos), seguindo o protocolo descrito em *Antibody Design Labs 2020*⁵. A mistura foi resfriada em gelo e o tubo agitado manualmente por pelo menos 5 min e incubado a 4°C por 24 horas. Após centrifugação por 20 min a 10000 rpm, o sobrenadante foi removido, seguindo-se nova centrifugação para total remoção de traços do sobrenadante. O precipitado totalmente drenado do sobrenadante foi suspenso em tampão SM a 4°C por uma noite e em seguida transferido para tubo de ultracentrífuga. Ao tubo foi adicionado 0,75g de CsCl para cada 1 mL de suspensão de fago, o peso foi ajustado com solução de SM e CsCl na mesma proporção (0,75g CsCl / 1 mL SM) e selado a quente. A ultracentrifugação foi feita em rotor TLA 110 (Optima™ MAX-XP *Benchtop Ultracentrifuge*)

⁵ <http://www.abdesignlabs.com/technical-resources/bacteriophage-preparation/>

a 55000 rpm por 24 horas a 4°C. Os fagos concentrados em uma faixa do gradiente de CsCl (banda esbranquiçada) foram recolhidos com agulha e seringa, em seguida, submetidos à diálise em filtro Amicon 30K ou 100K, através de lavagens com tampão SM (mínimo de 5x do volume coletado) por 2 vezes, centrifugados a 4000 rpm por 30 min. O filtrado foi titulado por plaqueamento como descrito acima. A suspensão de fagos purificados foi armazenada em 4°C. Alíquotas dessa suspensão foram também armazenadas a -80°C com adição de 10% de glicerol.

3.5. Efeito de pH, temperatura, UV e clorofórmio na estabilidade dos fagos

Para o estudo da estabilidade dos fagos seguimos os protocolos descritos por Wintachai *et al* e Danis-Wlodarczyk *et al* com algumas modificações (Danis-Wlodarczyk *et al.*, 2015; Wintachai *et al.*, 2019).

Para avaliação do efeito do pH, 100µL da suspensão de fagos (1×10^9 PFU/mL) foram misturados com 900µL de solução de tampão universal (KCl 150mM, KH₂PO₄ 10mM, citrato de sódio 10mM, H₃BO₃ 10mM) nos pHs 4; 7,5; 9 e 12, seguindo-se incubação por 60 min a 37°C. Como controle os fagos foram misturados em tampão SM pH 7.

Para avaliação do efeito da temperatura, 50µL da suspensão de fagos (1×10^8 PFU/mL) foram incubados a 16°C, 25°C, 37°C, 42°C, 60°C e 80°C em um termociclador. Alíquotas foram removidas nos tempos 0 min, 15 min, 30 min e 60 min.

A estabilidade à luz UV foi avaliada pela exposição de 100µL da suspensão de fagos (10^8 PFU/mL) por 24 horas na câmara de fluxo laminar com lâmpada UV (254nm) ligada. Para avaliação do efeito do clorofórmio, a suspensão de fagos (10^8 ou 10^9 PFU/mL) foi misturada com clorofórmio para concentração final de 10% (v/v) e 90% e incubada por 60 min à temperatura ambiente.

Após os tratamentos acima, foram preparadas diluições seriadas das amostras em meio SM (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) que foram plaqueadas com 100µL de PA14 (DO_{600nm} = 1,0). Após 18 horas de incubação a 37°C, o número de placas de lise foi contado e o número de PFU/mL foi calculado.

3.6. Análise proteômica dos vírions

3.6.1. Identificação de polipeptídios separados em SDS-PAGE

As preparações dos fagos ZC01 e ZC03 obtidas como descrito no item 3.2 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) para separação dos polipeptídios previamente a análise proteômica por espectrometria de massas (Dzieciatkowska *et al.*, 2014). As amostras (~100µg de proteína

total) foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris 50mM, pH 6,8; DTT 25mM, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v)], fervidas por 3 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200V e as proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie G250 0,1% (p/v), preparado em metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguindo-se de descoloração com ácido acético 7,5% (v/v) em metanol 25% (v/v). Após descoloração, o gel foi fotodocumentado no equipamento MiniBIS Pro (DNR Bio Imaging System). As regiões do gel foram recortadas, transferidas para microtubos e encaminhadas para o Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP)⁶ do ICB-USP. A digestão com tripsina diretamente dos fragmentos de gel (*in gel digestion*) e demais processamentos para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), no equipamento *nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD*, foram realizados segundo os protocolos do CEFAP. As proteínas nas bandas do gel foram identificadas pela correlação das massas dos peptídeos nos espectros de MS/MS com as sequências de aminoácidos das ORFs anotadas nos genomas dos fagos, segundo os parâmetros e programas utilizados no CEFAP⁷.

3.6.2. Proteômica *shotgun*

As preparações dos fagos ZC01 e ZC03 obtidas como descrito no item 3.2 foram analisadas através de proteômica *shotgun* (Zhang *et al.*, 2013) no laboratório do Prof. Giuseppe Palmisano no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), seguindo os protocolos disponibilizados⁸ no CEFAP do ICB-USP.

Resumidamente, a suspensão de fagos equivalente a 100µg foi seca por centrifugação à vácuo e reconstituída em 20µL de ureia 8M contendo ditioneitol (DTT) 10mM e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) e incubadas durante 30 min. As proteínas foram diluídas em água para 1 nmol/µL e reduzidas pela adição de iodoacetoamida 40mM (IAA), seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 30 min no escuro. Após neutralização da IAA com DTT 5mM por incubação durante 10 min, a tripsina (Promega) foi adicionada (1:50 enzima:proteína total) seguindo-se incubação a temperatura ambiente por 16 horas a 37°C. Os peptídeos digeridos foram submetidos a dessalinização com *Zip-Tip C18 Cartridge column* e então carregados em espectrômetro

⁶ <http://cefap.icb.usp.br/>

⁷ <http://cefap.icb.usp.br/biomass-easy-nlc-ltq-orbitrap-velos/biomass-definicao-de-parametros-para-identificacao-de-proteinas/>

⁸ <http://cefap.icb.usp.br/biomass-easy-nlc-ltq-orbitrap-velos/>

de massas *nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD*. As proteínas nos respectivos proteomas foram identificadas pela correlação das massas dos peptídeos nos espectros de MS/MS com as sequências de aminoácidos das ORFs anotadas nos genomas dos fagos, segundo os parâmetros e programas utilizados no CEFAP⁹.

3.7. Detecção da atividade despolimerases de vírions

A atividade de despolimerase associada aos vírions pode ser detectada empiricamente pela formação de um halo túrbido no entorno da placa de lise o qual aumenta de tamanho com o tempo de incubação (Pires *et al.*, 2016; Knecht *et al.*, 2020). Após plaqueamento dos fagos 10⁶ PFU/mL juntamente com cepa PA14 por 18 horas a 37°C, a formação de halos em torno das placas de lise foi observada após 18 horas e seu diâmetro foi medido. O aumento de tamanho foi acompanhado a cada 24 horas durante 3 dias nas placas incubadas a 37°C.

3.8. Ensaios de infecção com PA14 e fagos em *Galleria mellonella*

Os ensaios de infecção com *P. aeruginosa* PA14 e os fagos ZC01 e ZC03 em modelo animal de *Galleria mellonella* (traça da cera, *wax moth*) foram realizados no laboratório da Profa. Kelly Ishida no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

As lagartas foram selecionadas no último estágio larval, com tamanho variando de 2,0 a 2,5 cm de comprimento e peso corporal de 150 a 200 mg (Tsai *et al.*, 2016; Forti *et al.*, 2018). Previamente a infecção ou não com PA14 e fagos, as lagartas foram submetidas a assepsia com álcool 70% e separadas em grupos de 20 lagartas cada. As injeções (10µL) de tampão PBS (controle), suspensão de bactérias (5 x 10³ CFU/ml) e/ou fagos (1 x 10⁵ e 5 x 10⁵ PFU/mL) foram feitas na última *proleg* da larva com o auxílio de microseringa *Hamilton (Hamilton Company)*. A inoculação dos fagos foi realizada após 60 min da injeção de suspensão das bactérias. Após inoculação, as lagartas foram mantidas na estufa a 37°C em placa de Petri de poliestireno (140 mm de diâmetro) com adição de pólen e cera de abelha.

Os grupos de *G. mellonella* foram monitorados a cada 2 horas, após 12 horas de inoculação, durante 24 horas. A taxa de sobrevivência é avaliada através de uma pontuação total que considera o estado de saúde das larvas de acordo com mobilidade das larvas, formação de casulos, melanização e sobrevivência (Tabela 1) (Loh *et al.*, 2013).

⁹<http://cefap.icb.usp.br/biomass-easy-nlc-ltq-orbitrap-velos/biomass-definicao-de-parametros-para-identificacao-de-proteinas/>

Tabela 1. Características avaliadas e pontuação atribuída para determinação da morbidade de larvas de *G. mellonella* (Loh *et al.*, 2013).

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade	Sem movimento	0
	Mínimo movimento com estímulo	1
	Movimento quando estimulada	2
	Movimento sem estímulo	3
Formação de casulo	Sem formação	0
	Formação parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Larvas pretas	0
	Larva preta com pontos marrons	1
	≥3 pontos pretos em larva bege	2
	<3 pontos pretos em larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Viva	2
	Morta	0
Interpretação: larva saudável (sem infecção) pontuação = 9-10		

3.9. Análises bioinformáticas

Para pesquisa de identidade/similaridade de proteínas foi utilizado o programa BLASTp em bases públicas como GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)¹⁰. Para identificação de domínios proteicos foi utilizada a plataforma *HHpred Bioinformatics Toolkit*¹¹ (Zimmermann *et al.*, 2018). Predições de estrutura tridimensional da sequência proteica de interesse foram realizadas com as plataformas I-TASSER¹² (Yang & Zhang, 2015) e Phyre2¹³ (Kelley *et al.*, 2015).

3.10. Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios de estabilidade dos fagos foram analisados com ANOVA. As curvas de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisadas pelo método

¹⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

¹¹ <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>

¹² <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

¹³ <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>

Survival analysis Log-rank (Mantel-Cox) Test utilizando-se o programa *Graphpad Prism 7.0* (GraphPad). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (Jeon & Yong, 2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estabelecimento do protocolo para obtenção de preparação aprimorada de fagos

Muitos protocolos de propagação e purificação de fagos estão disponíveis na literatura, mas estes são genéricos e precisam ser ajustados dependendo do fago que se trabalha, do título a ser obtido e do objetivo de uso da preparação (Pajunen *et al.*, 2000; Green & Sambrook, 2012; Pelzek *et al.*, 2013; Kropinski, 2018). Esta etapa é crucial para que os fagos possam ser analisados por técnicas como Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), crio-microscopia eletrônica e proteômica *shotgun*, que requerem uma preparação com alto título, medido por PFU/mL, alta concentração de proteínas e alto grau de pureza.

Com o intuito de obter preparações aprimoradas dos fagos ZC01 e ZC03 testamos alguns protocolos (não mostrado) até estabelecermos o protocolo de propagação e purificação descrito no item 3.4. Em resumo, após a propagação dos fagos em *P. aeruginosa* PA14 em meio sólido com top-ágar, a purificação é realizada em duas etapas: precipitação por PEG seguida por ultracentrifugação em gradiente isopícnico de cloreto de céσιο. Este protocolo resultou em preparações com alto título (10^{11} a 10^{14} PFU/mL), livres de impurezas e com vírions íntegros. As imagens de MET apresentadas na Figura 2 revelam partículas virais intactas em um campo limpo.

ZC01 apresenta morfotipo de membros da família *Siphoviridae* (Figuras 2A e 2B) que apresentam cauda longa não contrátil com fibras da cauda, enquanto, ZC03 apresenta morfotipo de membros da família *Podoviridae* (Figuras 2C e 2D) que apresentam cauda curta com fibras. Estas imagens confirmam resultados anteriores (Amgarten *et al.*, 2017), nos quais, no entanto, foram avaliadas preparações de fagos com muitas impurezas, baixo título ($< 10^8$ PFU/mL) e insuficiente concentração de partículas íntegras.

O protocolo que estabelecemos foi aplicado para obtenção de preparações dos fagos ZC01 e ZC03 utilizadas para análise proteômica e para os ensaios de fagoterapia em modelo de *Galleria mellonella*, como será descrito adiante. Este protocolo já tem sido utilizado em nosso laboratório na purificação de fagos que infectam outras espécies bacterianas (Layla F. Martins, comunicação pessoal).

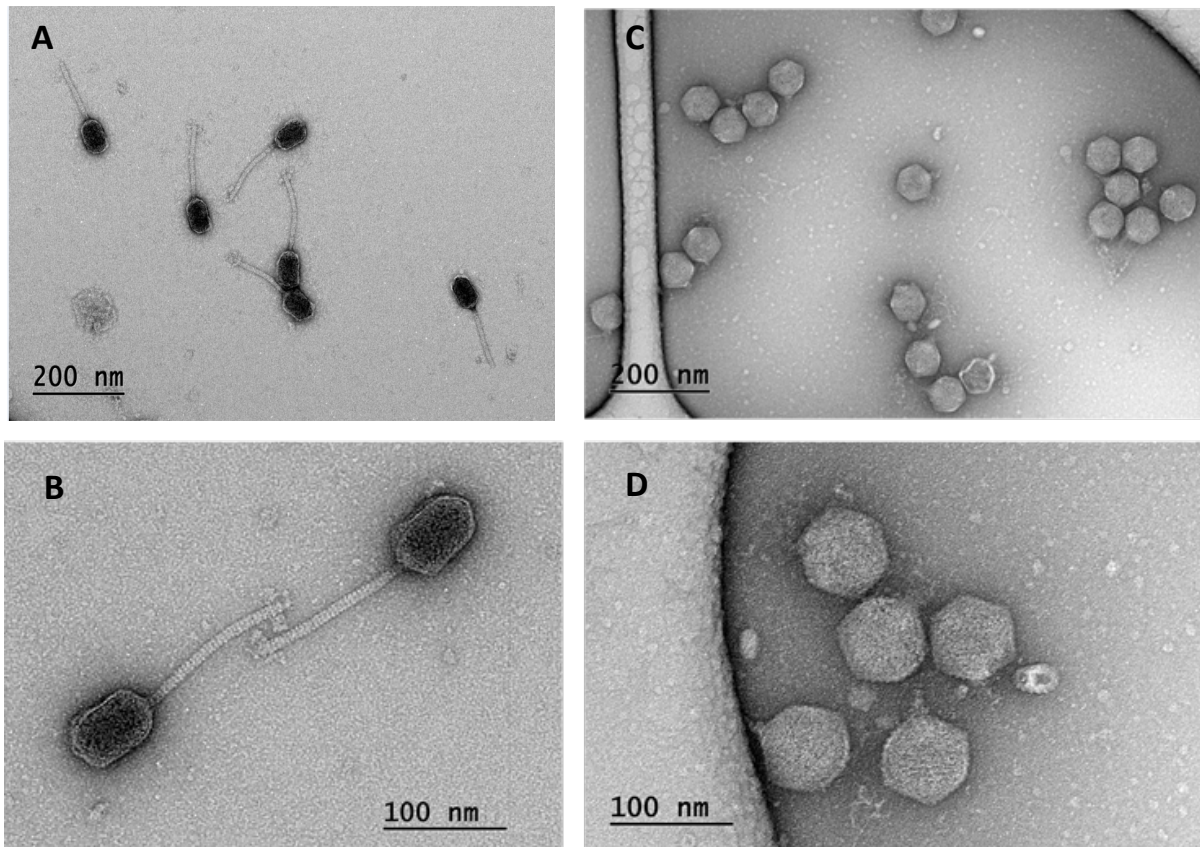


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos fagos ZC01 e ZC03 corados negativamente com acetato de uranila. Em **A** e **B**, fago ZC01 com morfologia típica de membros da família *Siphoviridae* e em **C** e **D**, fago ZC03 com morfologia típica da família *Podoviridae*. Imagens obtidas com auxílio dos Drs. Germán Sgro e Layla Martins no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 2100) no IQ-USP.

4.2. Curva de crescimento em uma etapa de ZC01 e comparação com ZC03

A dinâmica de infecção e o número de partículas produzidas por bactéria infectada estão entre os principais parâmetros que devem ser determinados para novos fagos, em particular aqueles candidatos a aplicação em fagoterapia. Para tal, realizamos a curva de crescimento em uma etapa (*one step growth curve*) de ZC01, que permite definir, em um hospedeiro específico, o período de latência (tempo em que o fago leva para se replicar e montar suas partículas) e o *burst size* (número de partículas liberadas/célula do hospedeiro na lise celular). Esta curva já havia sido realizada para ZC03 em trabalho anterior (Amgarten *et al.*, 2017).

A curva de crescimento apresentada na Figura 3, realizada por 190 min, mostra que ZC01 tem um período de latência de 100 minutos, e um *burst size* de ~87 partículas virais por célula infectada aos 120 minutos do início da infecção. O fago ZC03 possui um período latente de 50 minutos e *burst size* de aproximadamente 10 fagos por célula bacteriana

(Amgarten *et al.*, 2017). Estes dados são compatíveis com o tamanho das placas de lise produzidas por estes fagos, sendo que ZC01 apresenta placas de lise maiores do que as produzidas por ZC03 (Amgarten *et al.*, 2017).

Em comparação com a curva de crescimento em uma etapa de outros fagos da família *Siphoviridae*, ZC01 possui um período de latência longo (Ahamed *et al.*, 2019; Wintachai *et al.*, 2019; Jiang & Zheng, 2020; Peng *et al.*, 2020; Yazdi *et al.*, 2020), que pode estar relacionado a diversos fatores tais como características da bactéria hospedeira e meio de cultura utilizados (Moradali *et al.*, 2017). A condição nutricional e metabólica do hospedeiro é um fator crítico para infecção e proliferação viral, afetando adsorção, replicação, atividade lítica e sobrevivência de fagos. Ainda que para o crescimento de ZC01 utilizamos condições ideais de crescimento do hospedeiro (*P. aeruginosa* PA14), onde as maiores taxas de proliferação e produção de fagos são esperadas, essas podem ser afetadas pelo meio de cultura utilizado (Harada *et al.*, 2018).

Sabe-se que o período de latência e *burst size* podem variar bastante entre os fagos de uma mesma família (Hyman & Abedon, 2018), de 10 a 350 partículas virais por célula, com período de latência entre 20 e 100 minutos (Ahamed *et al.*, 2019; Wintachai *et al.*, 2019; Jiang & Zheng, 2020; Peng *et al.*, 2020; Yazdi *et al.*, 2020). Enquanto vários membros da família *Siphoviridae*, como o fago S1 de *Stenotrophomonas*, geram, em média, 75 partículas/bactéria (Garcia *et al.*, 2008), o fago λ de *E.coli* tem *burst size* de 153 fagos/bactéria (Shao & Wang, 2009).

O fago ZC03 também possui suas peculiaridades quando comparado aos membros da família a qual pertence (*Podoviridae*). Seu período de latência é bastante diferente do padrão frequentemente encontrado, como o fago RLP de *P. aeruginosa* que possui período de latência de 25 minutos e *burst size* de 154 fagos/bactéria (Alvi *et al.*, 2020). Já o fago vB_KpnP_IME337 de *Klebsiella pneumoniae* possui período de latência de 10 minutos com produção de 350 fagos por célula per infectada (Gao *et al.*, 2020). Com a diversidade de bacteriófagos existentes na natureza em que cada fago segue suas especificidades adaptativas, não é esperado encontrar padrões bem definidos (Morozova *et al.*, 2019; Shkoporov & Hill, 2019).

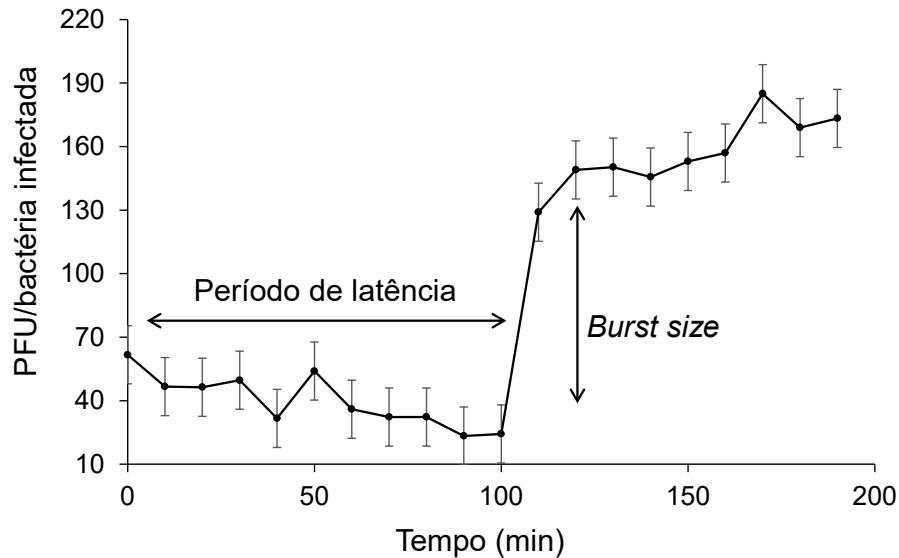


Figura 3. Curva de crescimento em uma etapa (*one-step growth curve*) de ZC01. Estão indicados o período de latência de 100 minutos e o *burst size* aos 120 minutos gerando 87 partículas virais por célula infectada. O gráfico mostra a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.3 Ensaios de estabilidade de ZC01 e ZC03

A determinação da estabilidade de fagos a diferentes condições físico-químicas, tais como temperatura e pH, é uma caracterização importante quando se deseja sua aplicação em fagoterapia. Os fagos ZC01 e ZC03 foram avaliados quanto a sua estabilidade em diferentes temperaturas e pHs e frente a exposição a clorofórmio e luz UV. Após estes tratamentos, a viabilidade das preparações de fago foi determinada pela eficiência de infecção de *P. aeruginosa* PA14 (medida em PFU/mL).

Como apresentado na Figura 4A, não houve variação importante da viabilidade de ZC01 nos tempos de incubação (0 a 60 min) a 25°C e 37°C, a qual se manteve em torno de 100%. Entretanto, aparentemente após 15 min da incubação a 37°C ocorreu um aumento de ~20% da viabilidade, um indicativo de que esta temperatura favoreça a capacidade de infecção do fago. Por outro lado, nas demais temperaturas testadas (16°C, 42°C, 60°C e 80°C) observamos redução da viabilidade para abaixo de 50% ao longo da incubação, sendo que a 80°C foi observada perda total da viabilidade após 15 min. O fago ZC03 apresenta uma viabilidade igual ou superior a 70% na incubação a 16°C, 25°C, 37°C e 42°C, e assim como ZC01 tem importante perda da viabilidade a 60°C e 80°C (Figura 4B). Em resumo, estes ensaios indicam que tanto ZC01 como ZC03 não são termoestáveis, como poderia ser esperado, visto que foram isolados de uma compostagem

termofílica. ZC01 e ZC03 não exibem perda de viabilidade na incubação por até 60 min a 25°C e 37°C, sendo que ZC03 também tem a viabilidade mantida na incubação a 16°C.

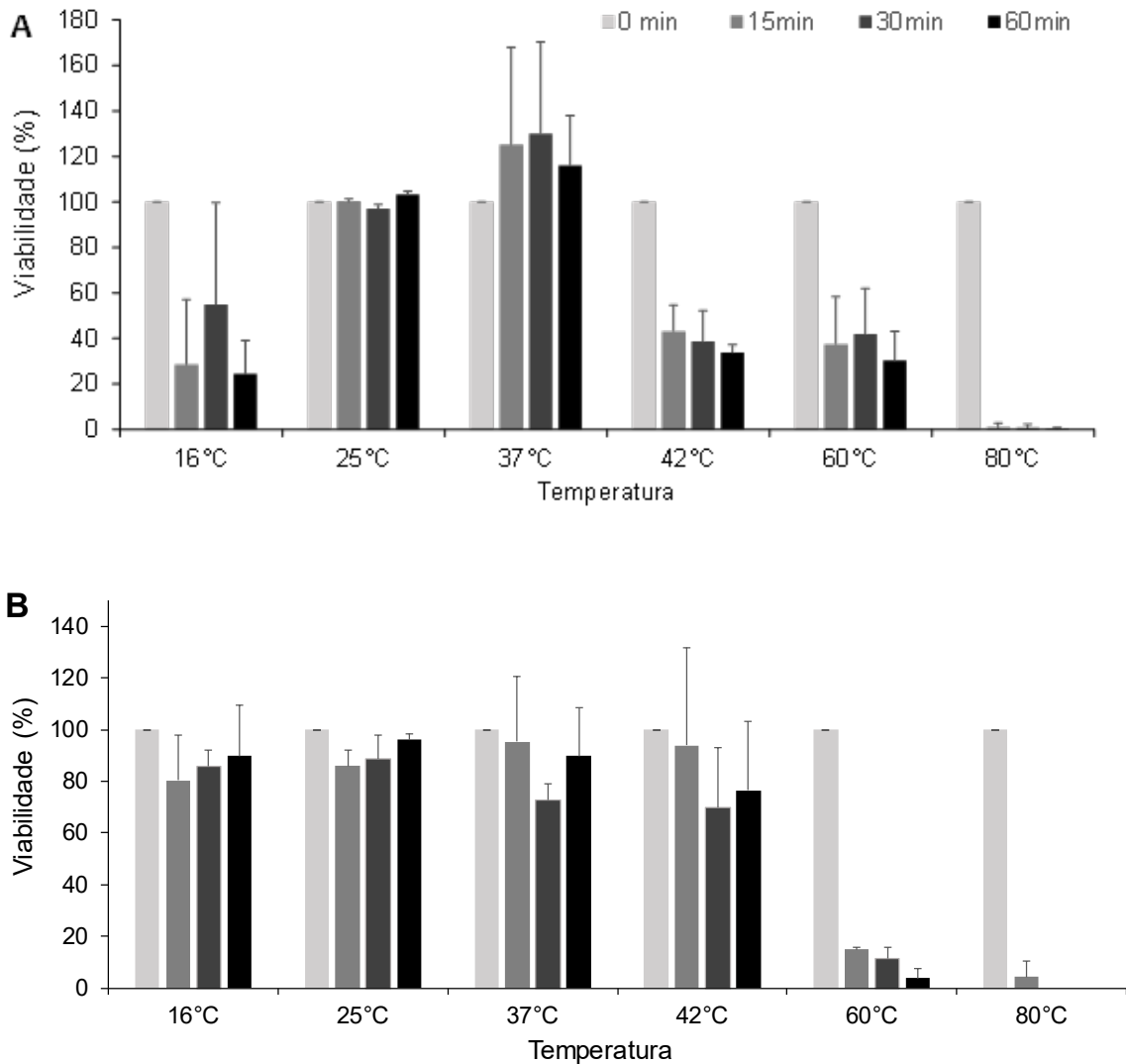


Figura 4. Viabilidade de ZC01 e ZC03 após incubação em diferentes temperaturas. A viabilidade dos fagos, após incubação de ZC01 (**A**) e ZC03 (**B**) pelos tempos e nas temperaturas indicados, foi calculada pela titulação (PFU/mL). A viabilidade no tempo 0 foi considerada como 100%. Os gráficos mostram a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Observamos que a incubação dos fagos ZC01 e ZC03 por 1 hora em pH 4, 9 e 12 resultou em perda de mais de 50% de viabilidade em relação ao pH 7,5 (Figura 5). Ensaios adicionais são necessários, estreitando-se as faixas de pH testadas, para determinarmos se estes fagos resistem a incubação em outros pHs distintos do pH 7,5.

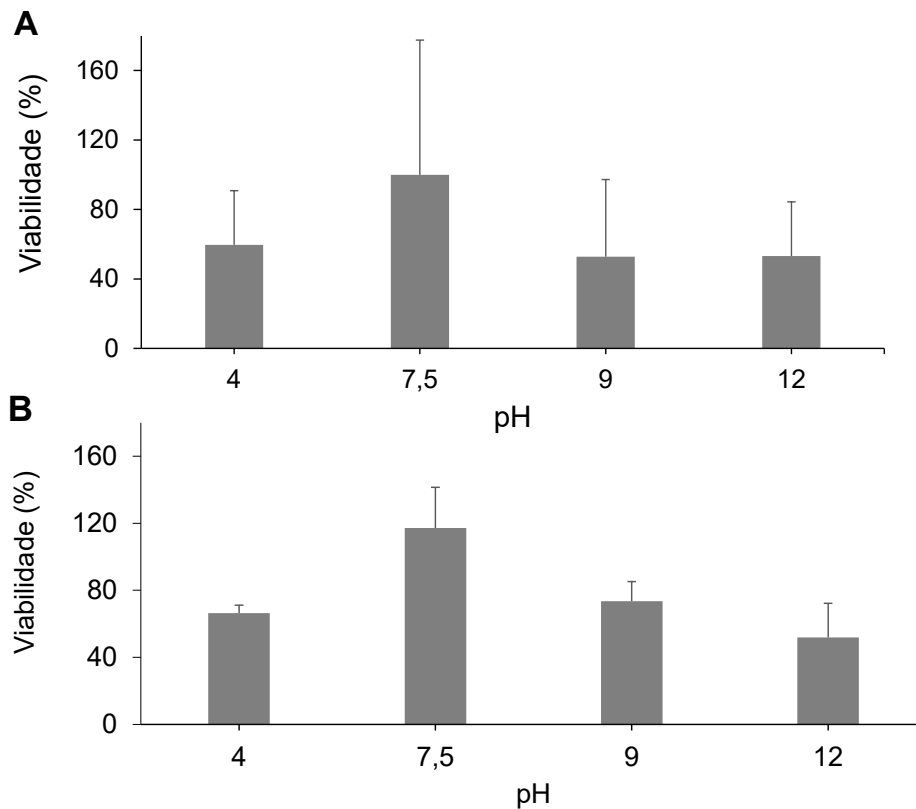


Figura 5. Viabilidade de ZC01 e ZC03 em diferentes pHs. Os fagos foram incubados em diferentes pHs por 1h e em seguida titulados. As porcentagens foram calculadas com relação ao título de ZC01 (A) e ZC03 (B) no pH 7,5 (100%). O gráfico mostra a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Como esperado, os fagos perdem quase que totalmente sua viabilidade quando expostos a luz UV por 24 horas (Figura 6), sendo que ZC01 parece ser mais resistente do que ZC03 (estabilidades de 16% e 2%, respectivamente).

O clorofórmio é comumente utilizado em protocolos de purificação e conservação de fagos como um agente bactericida. A figura 6 mostra que a exposição dos fagos a 90% de clorofórmio por 1 hora abole completamente a viabilidade tanto de ZC01 como de ZC03, ainda que estes fagos não apresentem um capsídeo composto por lipídeos. Embora o efeito seja menos dramático, observamos que incubação com 10% de clorofórmio por 1 hora reduz a viabilidade de ZC01 e ZC03 para 73% e 37%, respectivamente.

Estes resultados nos permitem definir estratégias que podem ser utilizadas para a assepsia dos fagos em estudo ou para manutenção da sua viabilidade.

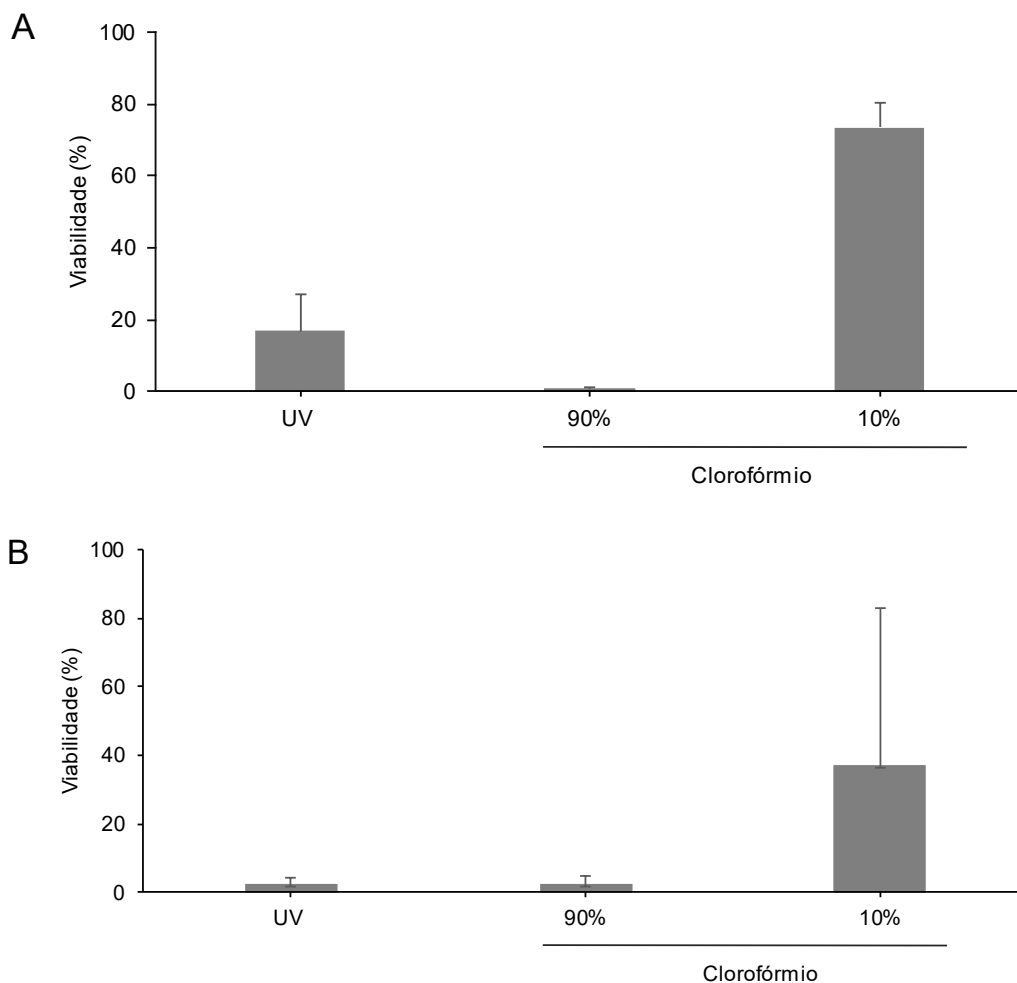


Figura 6. Viabilidade de ZC01 e ZC03 após exposição a UV ou clorofórmio. Os fagos foram expostos a UV por 24 horas (**A**) ou a clorofórmio 90% ou 10% (**B**), por 1 hora e em seguida titulados. As porcentagens foram calculadas com relação ao título de fagos antes da exposição. O gráfico representa a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.4. Identificação da composição proteica dos vírions de ZC01 e ZC03

A identificação das proteínas que são componentes da partícula viral é uma das primeiras etapas para compreensão dos mecanismos envolvidos na interação fago-bactéria e para a identificação de proteínas candidatas a despolimerases. Para tal, a composição de proteínas dos vírions de ZC01 e ZC03 foi investigada através de proteômica com duas abordagens distintas. Na primeira as proteínas dos vírions foram separadas por SDS-PAGE e as quatro regiões cortadas do gel (Figura 7) foram analisadas por LC-MS/MS (item 3.6.1). Na segunda abordagem, as mesmas preparações de fagos foram submetidas a proteômica *shotgun* (item 3.6.2).

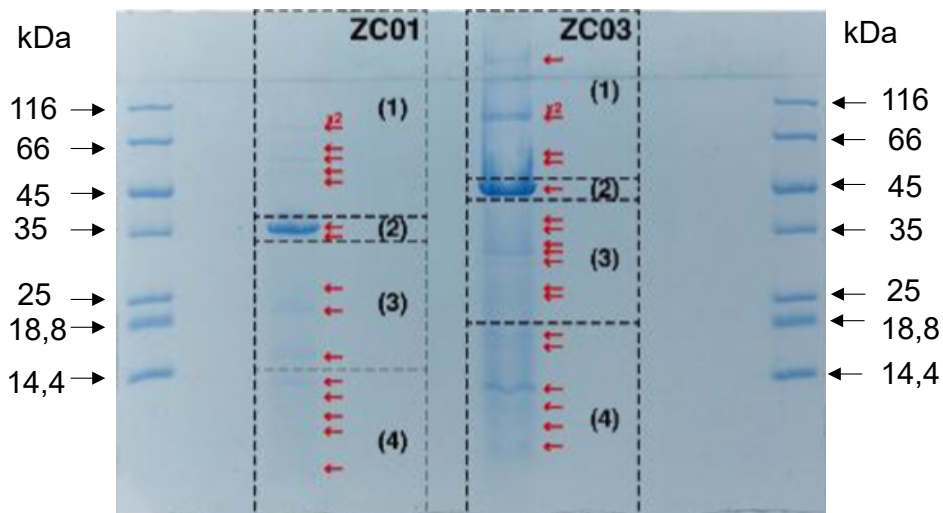


Figura 7. Imagem do gel de SDS-PAGE 15% dos vírions de ZC01 e ZC03 para proteômica. Amostras dos fagos ZC01 e ZC03 foram submetidas a SDS-PAGE 15% e o gel foi corado com Coomassie Blue G250. As regiões indicadas (1 a 4) foram recortadas e encaminhadas para análise proteômica. Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados.

4.4.1. Composição proteica dos vírions de ZC01

Segundo anotação previamente realizada (Amgarten *et al.*, 2017), 78 ORFs foram preditas no genoma de ZC01, que como já mencionado pertence à família *Siphoviridae* que são fagos com cauda longa não contrátil. Dentre as ORFs anotadas, 50 foram identificadas nas análises proteômicas. A análise proteômica das regiões do gel mostrado nas Figuras 7 e 8 identificou 48 proteínas (Tabela 2) enquanto a análise por proteômica *shotgun* identificou 23 proteínas (Tabela 3), com número de peptídeos e cobertura da sequência proteica variando, respectivamente de 1 a 47 e de 1,6 a 99,67%. Ainda que várias proteínas tenham apresentado apenas 1 peptídeo na análise de MS/MS e/ou cobertura muito baixa, o que torna a identificação menos precisa, optamos por apresentar todas as proteínas que foram identificadas. Conforme indicado nas Tabelas 2 e 3, 21 proteínas foram identificadas em ambas as abordagens, das quais 3 foram identificadas por apenas 1 peptídeo. Se considerarmos as proteínas que foram reveladas por 2 ou mais peptídeos, juntamente com as proteínas identificadas em ambas as abordagens, estimamos que o vírion de ZC01 seja constituído por no mínimo 27 proteínas.

Pelo menos 11 bandas, variando de 10 kDa a 110 kDa, foram distinguidas no gel de SDS-PAGE (Figura 8) conforme a identificação apresentada na Tabela 2. A banda predominante com massa molecular estimada de 32 kDa corresponde a proteína principal do capsídeo (ZC01_055). Outras proteínas estruturais típicas, tais como proteína *tape-measure* da cauda (ZC01_065), proteína portal (ZC01_047), proteína da fibra da cauda

(ZC01_066), proteína de montagem da fibra da cauda (ZC01_069) e uma provável endolisina (ZC01_075), foram também identificadas. Alguns dos polipeptídeos mais evidentes no gel (ex: ZC01_055 e ZC01_065) foram identificados com maior cobertura (>45%) e maior número de peptídeos (Figura 8 e Tabela 2). Cabe destacar, que dentre as proteínas listadas na Tabela 2, estão algumas enzimas relacionadas a replicação do fago (ex: DNA polímerase, DNA helicase, etc). Especulamos se estas são componentes dos vírions, porém em baixíssima abundância, visto que foram identificadas por apenas 1 ou 2 peptídeos na espectrometria de massas. A confirmação da presença dessas enzimas nos vírions maduros requer experimentação adicional.

Algumas proteínas hipotéticas (função desconhecida) preditas na anotação, como ZC01_003; ZC01_004; ZC01_013 e ZC01_056, ou foram identificadas por 2 ou mais peptídeos nos proteomas de ZC01 e/ou foram detectadas em ambos os proteomas, que é indicativo de que são proteínas que compõem o vírion e por isso poderiam ser reanotadas como proteínas estruturais.

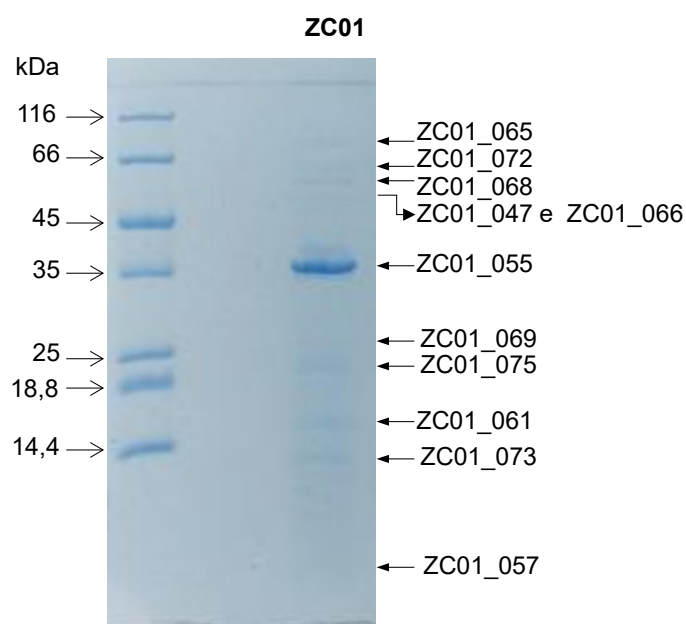


Figura 8. Proteínas identificadas por proteômica a partir do gel de SDS-PAGE do vírion de ZC01. Algumas das proteínas (ORFs) identificadas pela análise proteômica e listadas na Tabela 2 foram assinaladas no mesmo gel apresentado na Figura 7. Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados.

Tabela 2. Lista de proteínas identificadas em ZC01 pela proteômica de regiões do gel de SDS-PAGE.

ORF (Proteína)	Função predita	Número de aminoácidos	Cobertura %	Número de peptídeos	MW [kDa]
ZC01_002	Proteína hipotética	120	9,17	1	13,4
* ZC01_003	Proteína hipotética	183	12,02	1	20
* ZC01_004	Proteína hipotética	279	10,04	1	30,2
ZC01_005	DNA helicase	395	7,9	2	44,4
ZC01_006	Subunidade menor da ribonucleotídeo difosfato redutase	353	3,97	1	40,3
ZC01_007	Subunidade maior da ribonucleosídeo difosfato redutase	568	1,6	1	63,6
ZC01_008	Proteína hipotética	161	14,29	1	18,1
ZC01_010	Oxidoreductase dependente de FAD	287	2,4	1	30,9
ZC01_013	Proteína hipotética	296	8,45	2	34,6
ZC01_017	Proteína hipotética	184	4,89	1	20,8
ZC01_018	DNA polimerase I	646	4,95	2	71,9
ZC01_019	Desoxicitidilato desaminase	178	7,30	1	20
ZC01_022	Primase de fago e plasmídeo	791	4,05	1	90,3
ZC01_023	Proteína hipotética	68	23,53	1	7,4
ZC01_024	Proteína hipotética	149	11,41	1	16,6
ZC01_025	Nucleotídeo pirofosfohidrolase	228	6,14	1	25
ZC01_026	Proteína hipotética	126	10,32	1	14,2
ZC01_028	Proteína hipotética	189	12,70	1	21,2
ZC01_032	DNA ligase	301	7,4	1	34,2
ZC01_034	ATPase	363	3,6	1	40,8
ZC01_035	Protease aspártica	125	14,40	1	14,6
ZC01_041	Exodesoxirribonuclease	229	2,6	1	25,7
ZC01_042	Proteína hipotética	131	16,19	1	15
ZC01_044	Proteína NrdA	92	10,87	1	10,6
ZC01_045	Subunidade menor da terminase	171	8,77	2	19,5
ZC01_046	Subunidade maior da terminase	433	2,31	1	49,8
* ZC01_047	Proteína estrutural	496	38,31	16	55,6
* ZC01_048	Proteína de morfogênese de capsídeo	415	52,77	29	46,2
ZC01_049	Proteína do tipo PhoH	233	9,44	1	25,6
* ZC01_054	Proteína estrutural	262	58,2	15	28,3
* ZC01_055	Proteína principal do capsídeo	306	99,67	27	32,1
* ZC01_056	Proteína hipotética	147	35,37	4	16,3
* ZC01_057	Proteína estrutural	76	86,84	8	8
* ZC01_058	Proteína estrutural	176	73,30	11	18,7
* ZC01_059	Proteína estrutural	129	21,72	1	13,8
* ZC01_060	Componente da cauda	132	34,9	5	15,3
ZC01_061	Proteína terminadora de cauda	136	40,44	6	15
* ZC01_062	Proteína principal da cauda	312	51,92	15	33,4
ZC01_063	Proteína hipotética	147	12,93	1	16,6
* ZC01_065	Proteína métrica (<i>tape-measure</i>) da cauda	826	57,51	47	89,9
* ZC01_066	Proteína da fibra da cauda	504	46,23	17	55,2
* ZC01_067	Proteína estrutural	333	40,54	11	36,1
* ZC01_068	Proteína de montagem da cauda	558	38,35	19	62,6
* ZC01_069	Proteína de montagem da cauda	269	38,66	7	29,5
* ZC01_070	Proteína da cauda	77	10,39	1	8,5
* ZC01_072	Proteína da cauda	724	46,96	25	77,8
* ZC01_073	Proteína estrutural	118	38,98	3	12,4
ZC01_075	Endolisina	168	41,07	7	18,8

*Proteínas também listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de proteínas identificadas em ZC01 pela proteômica *shotgun*

	ORF (Proteína)	Função Predita	Número de aminoácidos	Cobertura %	Número de peptídeos	MW [kDa]
*	ZC01_003	Proteína hipotética	183	6,56	1	20,7
*	ZC01_004	Proteína hipotética	279	7,53	1	30,2
	ZC01_043	Proteína hipotética	89	20,22	1	10,3
*	ZC01_047	Proteína portal	496	24,60	9	55,6
*	ZC01_048	Proteína de capsídeo	415	24,58	10	46,2
	ZC01_052	Proteína hipotética	75	32	1	8,6
*	ZC01_054	Proteína estrutural	262	40,46	7	28,3
*	ZC01_055	Proteína de capsídeo	306	61,11	13	32,1
*	ZC01_056	Proteína hipotética	147	8,16	1	16,3
*	ZC01_057	Proteína estrutural	76	42,11	4	8,0
*	ZC01_058	Proteína estrutural	176	50	5	18,7
*	ZC01_059	Proteína estrutural	129	9,30	1	13,8
*	ZC01_060	Proteína da cauda	132	25,76	2	15,3
*	ZC01_062	Proteína da cauda	312	10,58	2	33,4
*	ZC01_065	Proteína da cauda	826	38,14	28	89,9
*	ZC01_066	Proteína da fibra da cauda	504	26,59	10	55,2
*	ZC01_067	Proteína estrutural	333	45,05	1	36,1
*	ZC01_068	Proteína da cauda	558	28,49	11	62,6
*	ZC01_069	Proteína da cauda	269	33,09	7	29,5
*	ZC01_070	Proteína estrutural	77	27,27	2	8,5
	ZC01_071	Proteína da cauda	69	56,52	2	7,8
*	ZC01_072	Proteína da cauda	742	19,34	8	77,8
*	ZC01_073	Proteína estrutural	118	23,73	1	12,4

* Proteínas também listadas na Tabela 2.

4.4.2. Composição proteica dos vírions de ZC03

A anotação do genoma de ZC03 (Amgarten *et al.*, 2017), o qual é um fago da família *Podoviridae* que são fagos com cauda curta com fibras e espícula, identificou 85 ORFs. A análise proteômica das regiões do gel mostrado nas Figuras 7 e 9 identificou 63 proteínas (Tabela 4) enquanto a análise por proteômica *shotgun* identificou 25 proteínas (Tabela 5), com número de peptídeos e cobertura da sequência proteica variando, respectivamente, de 1 a 293 e de 1,46 a 96,36%. De modo similar ao apresentado para ZC01, optamos por listar todas as proteínas que foram identificadas, ainda que várias proteínas tenham apresentado apenas 1 peptídeo na análise de MS/MS ou apresentado cobertura muito baixa, um resultado que é considerado não confiável. Vinte e uma proteínas foram identificadas em ambas as abordagens, conforme indicado nas Tabelas 4 e 5, destas 2 foram identificadas por apenas 1 peptídeo em ambas as abordagens. Se considerarmos as proteínas que foram reveladas por 2 ou mais peptídeos, juntamente com as proteínas identificadas em ambas as abordagens, estimamos que o vírion de ZC03 seja constituído de pelo menos 40 proteínas.

Como apresentado na Figura 9, pelo menos 10 bandas, variando de 12 kDa a 120 kDa, foram distinguidas no gel de SDS-PAGE da amostra de ZC03. Assim como verificado para ZC01, a banda predominante (ZC03_021), com massa molecular estimada de 43,9

kDa, corresponde a proteína principal do capsídeo (Tabela 4). Outras proteínas estruturais típicas, tais como proteína da cauda (ZC03_004, ZC03_022, ZC03_030, ZC03_044, ZC03_095), e proteína da fibra da cauda (ZC03_005, ZC03_006) foram também identificadas. Destacamos RNA polimerase do vírion (ZC03_015) e a peptoglicano hidrolase (ZC03_016) também componentes do vírion de ZC03. Novamente, alguns dos polipeptídios mais evidentes no gel (ex: ZC03_016 e ZC03_021, Figuras 7 e 9) foram identificados com maior cobertura (>75%) e maior número de peptídeos (Tabela 4).

Dentre as proteínas listadas na Tabela 4, estão algumas enzimas relacionadas a propagação do fago (ex: DNA polímerase, DNA helicase, RNA polimerase II, HNH endonuclease, etc), as quais, assim como sugerido para ZC01, podem ser contaminantes uma vez que se apresentam em baixa abundância. A confirmação da presença dessas enzimas nos vírions maduros requer experimentação adicional.

Algumas proteínas hipotéticas (função desconhecida) preditas na anotação, como ZC03_001 e ZC03_029, foram identificadas por 2 ou mais peptídeos nos proteomas de ZC03, sugerindo que estas são proteínas que compõem o vírion e por isso poderiam ser reanotadas como proteínas estruturais.

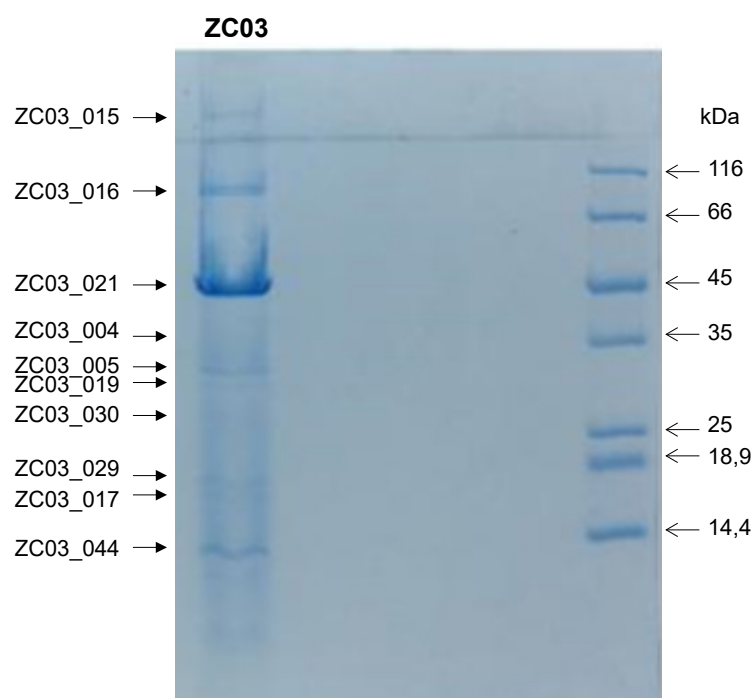


Figura 9. Proteínas identificadas por proteômica a partir do gel de SDS-PAGE do vírion de ZC03. Algumas das proteínas (ORFs) identificadas pela análise proteômica e listadas na Tabela 4 foram assinaladas no mesmo gel apresentado na Figura 7. Os marcadores de massa molecular em kDa estão indicados.

Tabela 4. Lista de proteínas identificadas em ZC03 pela proteômica de regiões do gel de SDS-PAGE.

ORF (Proteína)	Função predita	Número de aminoácidos	Cobertura %	Número de peptídeos	MW [kDa]
* ZC03_001	Proteína hipotética	684	50,44	37	78,4
* ZC03_002	Proteína de montagem da cauda	331	38,07	12	36,2
ZC03_003	Proteína da ponta central da cauda	506	36,96	21	55,1
* ZC03_004	Proteína da cauda	291	60,48	10	32,3
* ZC03_005	Proteína da fibra da cauda	320	38,44	8	35,7
ZC03_006	Proteína da fibra da cauda	216	37,50	6	25,6
ZC03_007	Proteína de capsídeo	94	52,13	2	10,7
ZC03_008	Proteína hipotética	79	32,91	3	9,2
ZC03_009	Exonuclease	323	16,72	3	37,2
ZC03_010	DNA primase	715	7,13	2	82,1
ZC03_011	Proteína conservada no domínio AAA	248	3,23	1	28,4
ZC03_012	Proteína de ligação ao DNA de fita simples	244	50,41	14	27,2
* ZC03_013	Proteína de junção de Holliday	280	3,57	1	32
ZC03_014	Proteína hipotética	60	38,33	6	6,9
* ZC03_015	RNA polimerase	3644	79,91	293	399,4
* ZC03_016	Peptidoglicano hidrolase	831	77,62	89	92,1
* ZC03_017	Proteína estrutural	150	40	10	17,1
* ZC03_018	Proteína de capsídeo	902	48,89	40	101,7
* ZC03_019	Proteína estrutural	270	63,33	20	30,3
ZC03_020	Proteína estrutural	197	17,77	2	22,4
* ZC03_021	Proteína principal do capsídeo	398	86,43	55	43,9
* ZC03_022	Proteína da cauda	375	35,47	10	43,2
ZC03_023	Proteína métrica (<i>tape-measure</i>) da cauda	111	18,92	1	12,8
* ZC03_024	Proteína portal	745	79,79	75	84
ZC03_026	Lipoproteína RZ	194	12,27	2	21,1
ZC03_027	N-acetilmuramidase	108	5,56	1	12,2
* ZC03_028	Holina classe II	56	25	2	6,6
* ZC03_029	Proteína hipotética	165	41,82	13	18,4
* ZC03_030	Proteína da cauda	233	63,52	13	26,6
ZC03_032	Terminase subunidade maior	277	7,05	1	25,3
* ZC03_044	Proteína da cauda	112	68,75	5	12,6
ZC03_046	PAPs redutase	96	19,79	1	10,9
* ZC03_048	PAPs redutase	102	22,55	1	11,4
ZC03_049	RNA polimerase I subunidade A	127	27,56	2	14,6
ZC03_053	Proteína mediadora da recombinação de DNA	166	22,29	1	18,2
ZC03_055	Proteína hipotética	37	16,22	1	4,4
ZC03_059	Regulador transcricional	62	40,32	1	6,9
ZC03_060	RNA polimerase II	397	4,53	1	45
ZC03_061	ATPase	66	13,64	1	7,6
ZC03_063	ATPase	250	28,80	2	27,7
ZC03_064	Metalopeptidase	385	5,19	2	44,2
ZC03_065	Proteína hipotética	63	12,70	1	7,2
ZC03_066	Proteína hipotética	87	6,9	1	9,8
* ZC03_068	Proteína hipotética	125	12	1	14
ZC03_070	Proteína hipotética	66	25,76	2	8,2

ZC03_071	Proteína hipotética	134	7,46	1	15,7
ZC03_075	Proteína hipotética	84	14,29	1	9,4
ZC03_076	Proteína hipotética	71	21,13	1	7,9
ZC03_078	Proteína hipotética	103	14,56	1	11,4
ZC03_079	Proteína hipotética	81	37,04	1	8,8
ZC03_080	Proteína hipotética	56	17,86	1	6,8
ZC03_083	Proteína hipotética	82	8,4	1	9,4
ZC03_084	HNH endonuclease	143	13,99	1	16
ZC03_085	dCTP desaminase	149	24,16	2	17,1
ZC03_086	Proteína hipotética	148	17,57	1	16,6
* ZC03_087	Timidilato sintase	270	28,89	6	30,9
ZC03_088	Proteína tipo rIIA	724	1,52	1	83
ZC03_089	Proteína tipo rIIB	359	24,54	9	43,5
ZC03_090	NTP- PPase	155	19,21	2	17,1
ZC03_091	DNA helicase	405	3,43	1	45,8
ZC03_093	DNA polimerase	837	8,12	4	95,3
* ZC03_094	Proteína fibritina	102	46,08	4	11,1
ZC03_095	Proteína da cauda	55	38,18	1	6,3

*Proteínas também listadas na Tabela 5.

Tabela 5. Lista de proteínas identificadas em ZC03 pela proteômica *shotgun*

	ORF (Proteína)	Função predita	Número de aminoácidos	Cobertura %	Número de peptídeos	MW [kDa]
*	ZC03_001	Proteína hipotética	684	1,46	1	78,4
*	ZC03_002	Proteína de montagem da cauda	331	3,02	1	36,2
*	ZC03_004	Proteína da cauda	291	10,31	1	32,3
*	ZC03_005	Proteína da fibra da cauda	320	15,63	3	35,7
*	ZC03_013	Proteína de junção de Holliday	280	3,57	1	32
*	ZC03_015	RNA polimerase	3644	17,62	47	399,4
*	ZC03_016	Peptoglicano hidrolase	831	36,22	24	92,1
*	ZC03_017	Proteína estrutural	150	16,67	3	17,1
*	ZC03_018	Proteína de capsídeo	902	1	1	101,7
*	ZC03_019	Proteína estrutural	270	30,37	8	30,3
*	ZC03_021	Proteína principal do capsídeo	398	17,09	6	43,9
*	ZC03_022	Proteína da cauda	375	3,73	1	43,2
*	ZC03_024	Proteína portal	745	22,42	12	84
	ZC03_025	Lipoproteína Rz	164	6,71	1	19,4
*	ZC03_028	Holina classe II	56	89,29	3	6,6
*	ZC03_029	Proteína hipotética	165	18,18	2	18,4
*	ZC03_030	Proteína da cauda	233	12,88	2	26,6
*	ZC03_044	Proteína da cauda	112	38,39	3	12,6
*	ZC03_048	PAPs redutase	102	22,55	2	11,4
*	ZC03_068	Proteína hipotética	125	5,6	1	14
*	ZC03_087	Timidilato sintase	270	8,52	2	30,9
	ZC03_092	Proteína hipotética	153	5,88	1	18,3
*	ZC03_094	Proteína fibritina	102	15,69	1	11,1
*	ZC03_095	Proteína da cauda	55	96,36	2	6,3

*Proteínas também listadas na Tabela 4.

4.5 Avaliação da possível despolimerase de ZC01

Observamos que o fago ZC01 apresentava formação de um halo túrbido ao redor das placas de lise após 18 horas do plaqueamento com a PA14, os quais apresentavam aumento de tamanho após 24 e 72 horas, atingindo em média 3,6 mm de largura (Figura 10). Esse fenômeno é indicativo da ação de despolimerases que degradam exopolissacarídeos bacterianos quando não há mais propagação do fago (Pires *et al.*, 2016; Knecht *et al.*, 2020), e foi observado apenas para ZC01 mas não para ZC03.

Essa evidência empírica de uma possível atividade de despolimerase em ZC01 nos motivou a buscar pela ORF que poderia codificar tal atividade. A partir de análises de domínios proteicos em algumas das ORFs anotadas no genoma utilizando a plataforma *HHpred Bioinformatics Toolkit* (Zimmermann *et al.*, 2018) e predições de estrutura tridimensional, identificamos um provável (*E-value* = 0,00054, probabilidade de 97,6%) domínio de endo-beta-N-acetilglicosaminidase na porção N-terminal da ORF ZC01_066 (resíduo 54 a 194 da proteína de 504 aminoácidos), a qual está anotada como proteína da fibra da cauda. Essa proteína foi detectada nas análises proteômicas (Tabelas 2 e 3) confirmando que é uma proteína estrutural do vírion.

As despolimerases podem ser encontradas associadas aos vírions e como domínios catalíticos de proteínas estruturais, tais como a proteína da fibra da cauda (Guo *et al.*, 2017; Hsieh *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017; Olszak *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018). Para verificar se o domínio N-terminal ORF ZC01_066 exibe atividade de endo-beta-N-acetilglicosaminidase, planejamos futuramente avaliar a atividade desse domínio recombinante produzido em *E. coli*. As despolimerases recombinantes poderiam ser utilizadas diretamente como antibacterianos ou como adjuvantes da fagoterapia ou da antibioticoterapia convencional (Maciejewska *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Knecht *et al.*, 2020).

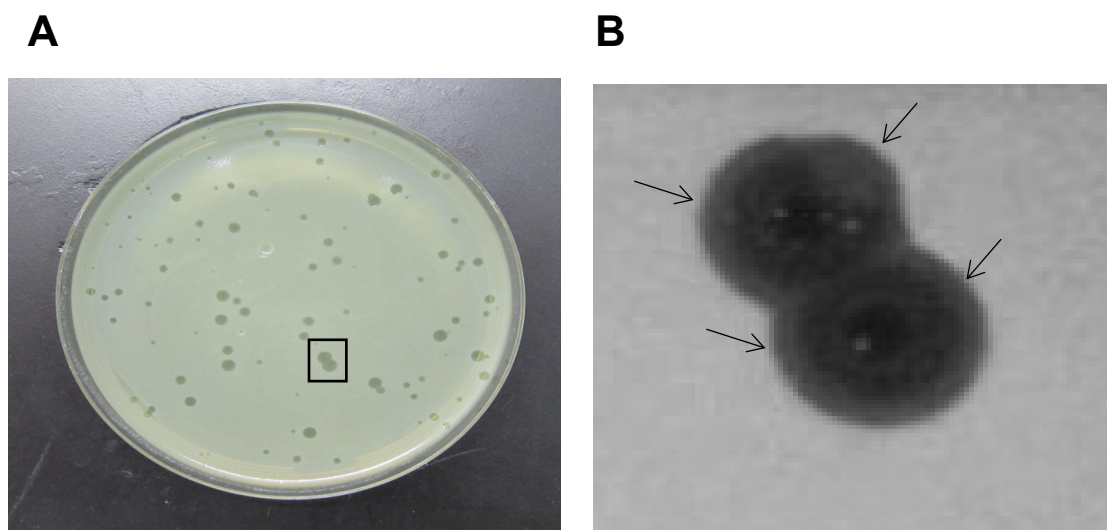


Figura 10. Evidência da atividade de despolimerase no fago ZC01. Após aparecimento das placas de lise, seguindo-se incubação a 37°C por mais 72 horas observamos o aparecimento de halo túrbido ao redor das placas de lise (A). As setas na imagem aumentada em (B) apontam o halo túrbido ao redor de duas placas de lise selecionadas da imagem mostrada em (A).

4.6. Avaliação da suscetibilidade de um conjunto previamente selecionado de isolados clínicos de *P. aeruginosa* à infecção por ZC01 e ZC03

Os fagos ZC01 e ZC03 já foram testados contra espécies bacterianas diferentes, de gêneros bem estudados como *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus* assim como vários isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* além das cepas de referência PA14 e PAO1 (Amgarten *et al.*, 2017). Os resultados mostraram tanto ZC01 como ZC03 possui uma abrangência restrita de hospedeiros, infectando apenas algumas cepas/isolados de *P. aeruginosa*. A melhor eficiência de infecção foi verificada com a PA14, a hospedeira utilizada no isolamento desses fagos, sendo que a cepa PAO1 é totalmente resistente à infecção (Amgarten *et al.*, 2017). A partir desses estudos, um conjunto de 16 isolados, além da PA14 e de PAO1, foi selecionado. Os seus genomas foram sequenciados e estão sendo analisados para busca de determinantes potencialmente associados à suscetibilidade ou à resistência à infecção por esses fagos (Rossi, 2019).

Com o intuito de confirmar (ou não) a suscetibilidade desse conjunto selecionado de 18 cepas/isolados a ZC01 e ZC03, fizemos a determinação da eficiência de plaqueamento (EOP) que corresponde ao título (PFU/mL) que o fago pode alcançar em uma determinada linhagem bacteriana em relação ao encontrado na cepa de referência (Clokier *et al.*, 2018; Letarov & Kulikov, 2018). Os testes anteriores de suscetibilidade a

estes fagos (Amgarten *et al.*, 2017) foram feitos com o teste do pingo (*drop test*), que é mais simples e rápido, porém menos preciso do que a determinação da EOP.

Os resultados da EOP estão apresentados na Tabela 6. Verificamos que 11 e 10 isolados mostraram suscetibilidade moderada a fraca a ZC01 ou a ZC03, respectivamente. Em nenhum caso, foi alcançado o valor de PFU/mL equivalente à cepa referência PA14, sendo observado valores que variaram de 1 a 4 log menores do que da cepa de referência. Algumas discrepâncias com os resultados anteriores do laboratório obtidos com o teste do pingo também foram verificadas (Tabela 7). Por exemplo, os isolados Fc79aM e 395 IMP-18 que se mostram resistentes a ZC03 no teste do pingo, apresentaram moderada suscetibilidade a este fago no ensaio de EOP. Por outro lado, o ensaio de EOP confirmou que a cepa PAO1 e os isolados SC-84 e SC-116 são resistentes a infecção por ambos os fagos.

De modo geral, estes resultados confirmam que ZC01 e ZC03 tem uma abrangência restrita e relativamente distinta de isolados clínicos que infectam. Alguns dos isolados resistentes à infecção por ZC01 e ZC03 poderão ser úteis para prospecção de novos fagos líticos em ambientes variados. Além disso, os isolados com moderada sensibilidade aos fagos poderão ser avaliados em modelo animal quanto à virulência e em ensaios de fagoterapia, como realizado com a cepa PA14.

Tabela 6. Eficiência de plaqueamento (EOP) dos fagos ZC01 e ZC03 em isolados de *P. aeruginosa*

Isolado ou cepa	EOP		Origem/Descrição	Fonte
	ZC01	ZC03		
PA14	1	1	Isolado clínico de paciente – altamente virulento – cepa de referência	R. L. Baldini (IQ-USP)
<i>Fc79aM</i>	2×10^{-2}	$4,9 \times 10^{-1}$	Secreção pulmonar de paciente com fibrose cística	A. L. C. Darini (FCFRP-USP)
<i>Fc79a PAB NM</i>	8×10^{-2}	$5,1 \times 10^{-1}$	Secreção pulmonar de paciente com fibrose cística	A. L. C. Darini (FCFRP-USP)
<i>395 IMP-18</i>	5×10^{-2}	9×10^{-2}	Ambiente hospitalar	A. C. Gales (EPM-UNIFESP)
<i>Fc7f NM</i>	2×10^{-2}	0	Secreção pulmonar de paciente com fibrose cística	A. L. C. Darini (FCFRP-USP)
<i>MT222</i>	$1,4 \times 10^{-1}$	1×10^{-4}	Aspirado traqueal de paciente em UTI	A. L. C. Darini (FCFRP-USP)
<i>H6086</i>	$1,4 \times 10^{-1}$	0	Cultura de sangue de paciente hospitalar	N. E. L. Huenuman (ICB-USP)
<i>5757</i>	$9,8 \times 10^{-2}$	$4,5 \times 10^{-4}$	Cultura de sangue/urina de paciente hospitalar	N. E. L. Huenuman (ICB-USP)
SC-61	8×10^{-2}	2×10^{-2}	Secreção nasal humana	C. O. Souza & K. Lima (Instituto Evandro Chagas)
3845/GSP-3	$3,4 \times 10^{-2}$	2×10^{-4}	Fezes de paciente com HIV	C. O. Souza & K. Lima (Instituto Evandro Chagas)
<i>H6044</i>	6×10^{-3}	0	Cultura de sangue de paciente hospitalar	N. E. L. Huenuman (ICB-USP)
<i>P13.612</i>	2×10^{-1}	3×10^{-4}	Ambiente hospitalar	A. C. Gales (EPM-UNIFESP)
PAO1	0	0	Mutante espontâneo da cepa PAO isolada de ferida – cepa de referência	R. L. Baldini (IQ-USP)
<i>275/VIM-7</i>	0	5×10^{-4}	Ambiente hospitalar	A. C. Gales (EPM-UNIFESP)
SC-84	0	0	Secreção ocular humana	C. O. Souza & K. Lima (Instituto Evandro Chagas)
SC-116	0	0	Secreção traqueal humana	C. O. Souza & K. Lima (Instituto Evandro Chagas)
<i>226/GES-5</i>	0	6×10^{-4}	Ambiente hospitalar	A. C. Gales (EPM-UNIFESP)
<i>MT138</i>	nd	nd	Aspirado traqueal de paciente em UTI	A. C. Gales (EPM-UNIFESP)

A EOP foi calculada pela divisão do número de PFU/mL dos fagos nos isolados pelo valor determinado na cepa de referência PA14.

nd: cepa apresentou prófago lítico

Tabela 7. Comparação dos resultados de EOP e teste do pingo dos fagos ZC01 e ZC03 em isolados e cepas de *P. aeruginosa*

Isolado ou cepa	EOP*		drop test**	
	ZC01	ZC03	ZC01	ZC03
PA14	++++	++++	+	+
<i>Fc79aM</i>	++	+++	+	-
<i>Fc79a PAB NM</i>	++	+++	+	+
395 IMP-18	++	+++	+	-
<i>Fc7f NM</i>	++	-	+	+
MT222	+++	+	+	-
H6086	+++	-	+	-/+
5757	++	+	-/+	-/+
SC-61	++	++	+	-/+
3845/GSP-3	++	+	+	-
H6044	+	-	+	+
P13.612	+++	+	+	-
PAO1	-	-	-	-
275/VIM-7	-	+	-/+	-/+
SC-84	-	-	-	-
SC-116	-	-	-	-
226/GES-5	-	+	-/+	-/+
MT138	nd	nd	+	-

*EOP: +++++ 1; +++10⁻¹; ++ 10⁻²; + 10⁻³/10⁻⁴; - resistente à infecção

**Drop test: Lise total +, Lise parcial +/- ; - lise não foi observada (resultados anteriores do laboratório obtidos por L.F. Martins).

nd: cepa apresentou prófago lítico

4.7. Avaliação da eficácia de ZC01 e ZC03 no tratamento de larvas de *Galleria mellonella* submetidas à infecção por PA14

Realizamos ensaios para avaliar a eficácia de *Galleria mellonella* (Loh *et al.*, 2013; Beeton *et al.*, 2015; Jeon & Yong, 2019) como modelo para experimentos de fagoterapia utilizando *P. aeruginosa* PA14 e os fagos ZC01 e ZC03. Os resultados dos ensaios estão apresentados nas Figuras 11 e 12. O estado das larvas foi avaliado segundo os parâmetros listados na Tabela 1.

Os resultados mostraram que injeção das preparações dos fagos ZC01 e ZC03 isoladamente (5 x 10³ fagos/larva) ou apenas de tampão PBS não alterou a viabilidade das larvas indicando que os fagos e o PBS não eram tóxicos para este animal nos volumes

utilizados (10uL) até 24 horas de observação (Figuras 11A e 12A). Por outro lado, a injeção de PA14 (50 bactérias/larva) resultou na morte de 100% das larvas após 24 horas de infecção (Figuras 11A e 12A).

Os tratamentos com ZC01 após 1 hora da injeção da PA14 com MOI de 20 e 100 fagos/célula bacteriana resultaram, respectivamente, em 53% e 68% de sobrevivência das larvas, após 20 horas (Figura 11B) e ~ 21%, após 24 horas. A taxa de sobrevivência para as larvas inoculadas apenas com PA14 foi de 25% após 20 horas, sendo que após 22 horas a mortalidade foi de 100%. Nas larvas em que ZC01 foi injetado 1 hora antes da infecção com PA14, simulando um tratamento profilático, observamos que 39% e 32% das larvas estavam vivas após 20 horas e 24 horas, respectivamente (Figura 11A e B). Os ensaios foram repetidos por 3 vezes, sendo que os dados obtidos mostraram significância estatística ($p < 0,0001$) segundo o teste log-rank (Mantel-Cox) (Jeon & Yong, 2019). Assim, os resultados obtidos até o momento nos permitem sugerir que o fago ZC01 é capaz de combater, ainda que parcialmente, a infecção por *P. aeruginosa* no modelo de *G. mellonella*.

Para o fago ZC03 utilizamos o mesmo protocolo utilizado para ZC01 (Figura 12A). Entretanto, até o momento, foi possível realizar apenas um experimento com 20 larvas por grupo, o qual será repetido assim que possível. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 12, indicam que os tratamentos com ZC03 após 1 hora da injeção da PA14 com MOI de 20 e 100 fagos/célula bacteriana resultaram em ~11% de sobrevivência das larvas, após 20 horas (Figura 12B). Por outro lado, ZC03 com MOI=100 parece ter sido mais eficaz do que MOI=20 até 16 horas e 18 horas do início do ensaio, com evidente redução da eficácia nos tempos seguintes (Figura 12A). Nas larvas em que ZC03 foi injetado 1 hora antes da infecção com PA14, simulando um tratamento profilático, observamos que 30% e 25% das larvas estavam vivas após 18 e 20 horas, respectivamente (Figura 12). Embora realizado apenas uma vez, os resultados já deixam pistas que ZC03 parece ser capaz de combater a infecção por *P. aeruginosa* no modelo de *G. mellonella*, ainda que com menor eficácia que ZC01. A mistura de ZC01 e ZC03 poderá ser investigada como estratégia para um combate mais eficiente da infecção por PA14 nesse modelo animal.

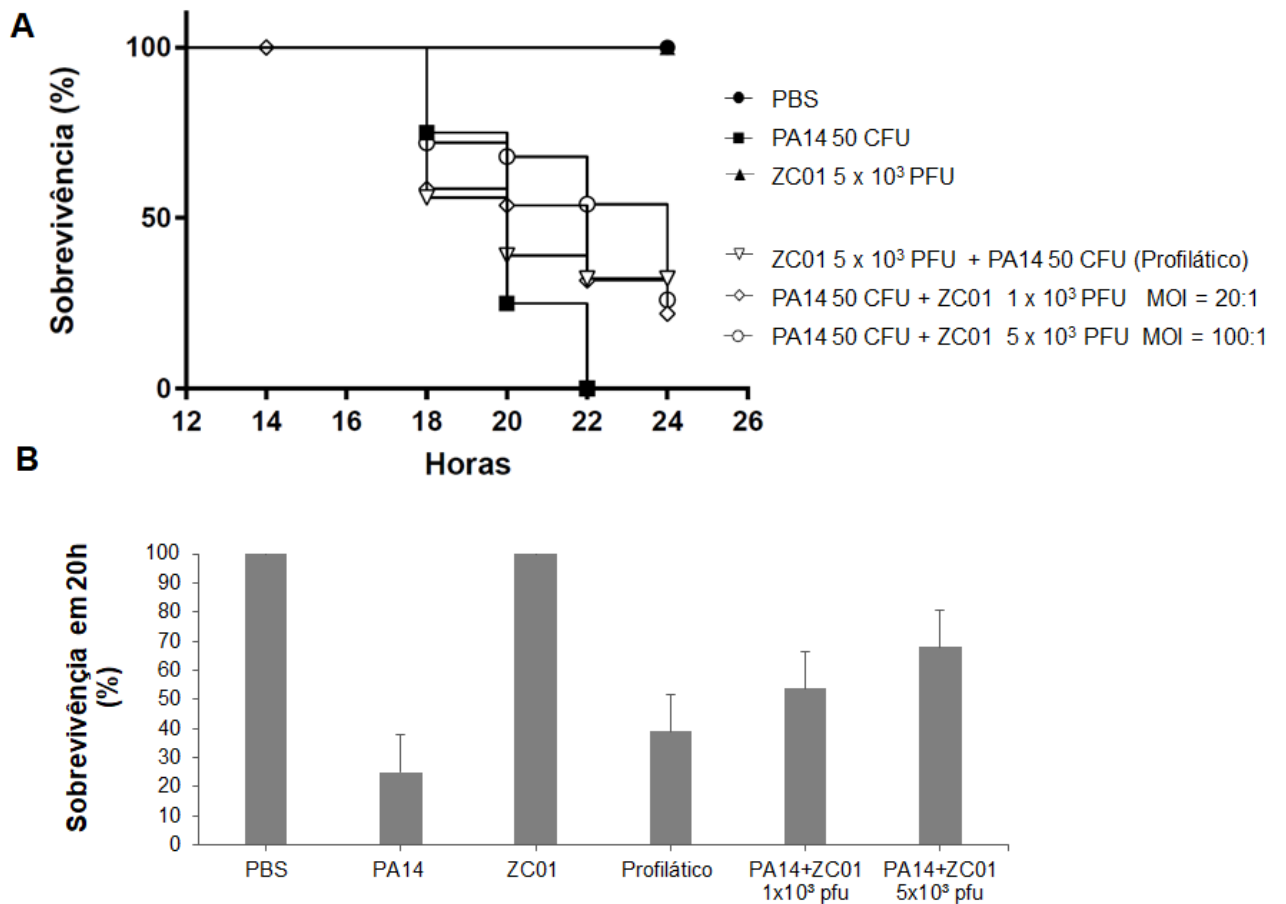


Figura 11. Eficácia *in vivo* do fago ZC01 contra PA14 em modelo de infecção animal *Galleria melonella*. **(A)** Gráfico da porcentagem de sobrevivência nos grupos controles (PBS, PA14 e ZC01) e nos grupos infectados com PA14 e com ZC01 1 hora após injeção da bactéria observando-se a MOI (Multiplicidade de infecção) indicada. No grupo profilático, o fago foi injetado 1 hora antes da injeção com a bactéria. **(B)** Representação da sobrevivência apenas no tempo de 20 horas. O resultado representa a média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas independentes com 20 larvas por grupo. As barras do desvio padrão foram omitidas em A, para clareza da imagem. As diferenças observadas apresentam significância estatística ($p < 0,0001$) segundo o teste log-rank (Mantel-Cox) (Jeon & Yong, 2019).

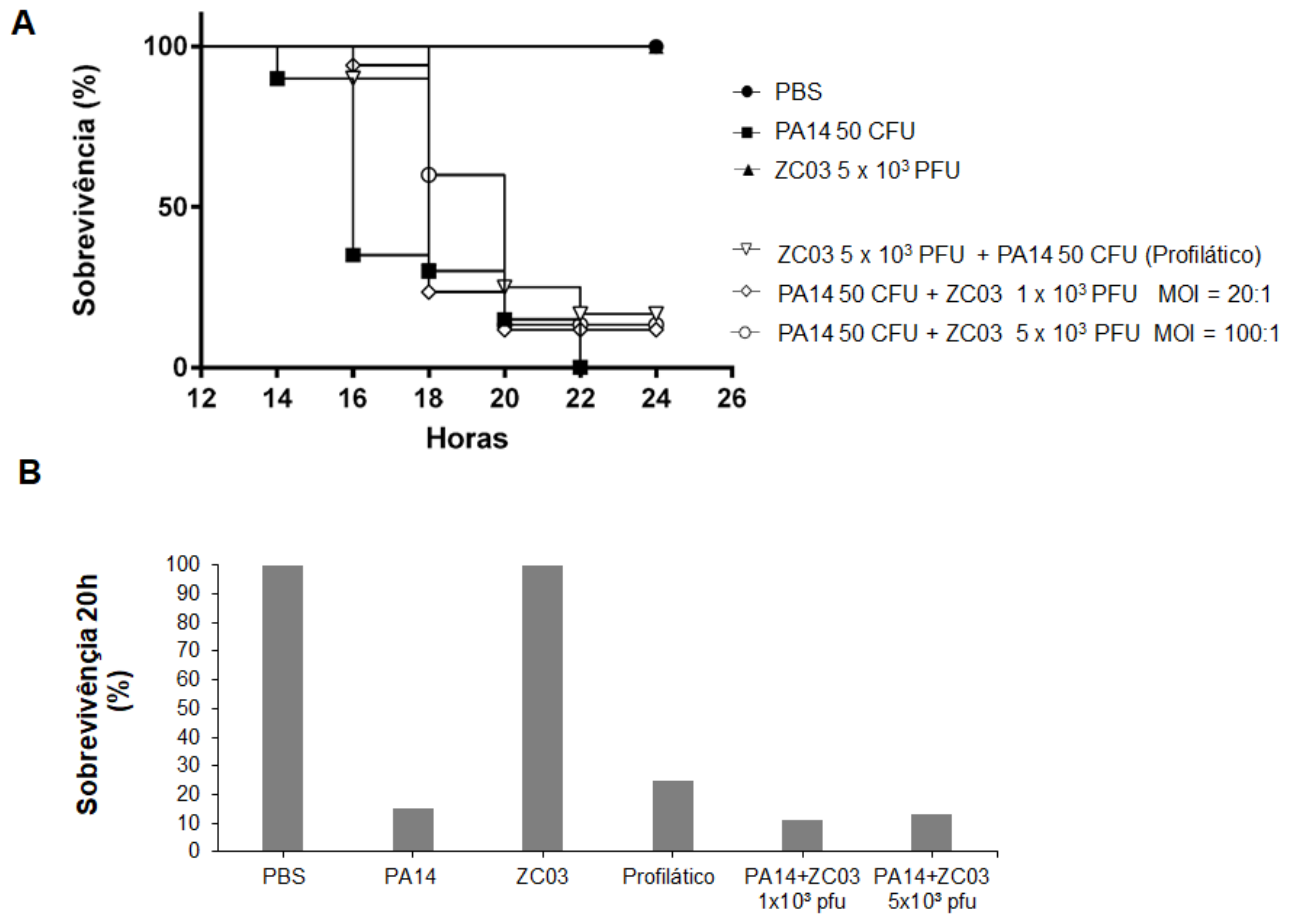


Figura 12. Eficácia *in vivo* do fago ZC03 contra PA14 em modelo de infecção animal *Galleria melonella*. **(A)** Gráfico da porcentagem de sobrevivência nos grupos controles (PBS, PA14 e ZC03) e nos grupos infectados com PA14 e com ZC03 1 hora após injeção da bactéria observando-se a MOI (Multiplicidade de infecção) indicada. No grupo profilático, o fago foi injetado 1 hora antes da injeção com a bactéria. **(B)** Representação da sobrevivência apenas no tempo de 20 horas. O resultado representa um único ensaio com 20 larvas por grupo.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento desse trabalho possibilitou o estabelecimento de um protocolo de propagação e purificação de fagos com características adequadas (altos títulos e pureza) para várias técnicas analíticas, tais como microscopia eletrônica de transmissão, crio-microscopia eletrônica e proteômica *shotgun*, e para ensaios de fagoterapia em modelo animal. Os protocolos foram estabelecidos para os fagos ZC01 (*Siphoviridae*) e ZC03 (*Podoviridae*) (Amgarten *et al.*, 2017) mas são adequados também para outros fagos.

Determinamos que o fago ZC01 tem um período de latência de 100 minutos e produz de ~87 partículas virais por célula infectada (*burst size*) aos 120 minutos do início da infecção. Estes parâmetros são distintos do relatado para o fago ZC03 que possui um período latente de 50 minutos e *burst size* de aproximadamente 10 fagos (Amgarten *et al.*, 2017).

Nossos resultados mostraram que os fagos ZC01 e ZC03 são mais estáveis em temperaturas e pHs compatíveis com os fisiológicos (25°C e 37°C, pH 7,5) sendo que apresentam importante redução da estabilidade em pHs ácidos e alcalinos ou temperaturas acima de 60°C. Os fagos são inativados pela exposição a luz UV e a clorofórmio 90%.

A composição de proteínas dos vírions de ZC01 e ZC03 foi investigada através de proteômica com duas abordagens distintas. Estimamos que os vírions de ZC01 e ZC03 sejam constituídos por, no mínimo, 27 e 40 proteínas, respectivamente, as quais incluem, além de proteínas estruturais típicas, como proteínas do capsídeo, cauda e fibras da cauda, enzimas relacionadas a interação do fago e seu hospedeiro e proteínas com função ainda desconhecida.

Apresentamos evidência empírica de que o fago ZC01 apresenta atividade de despolimerase possivelmente codificada por um domínio da ORF ZC01_066, anotada como proteína da fibra da cauda.

Utilizando ensaios de eficiência de plaqueamento, reavaliamos a suscetibilidade de um conjunto selecionado de 16 isolados clínicos de *P. aeruginosa* a ZC01 e ZC03, confirmando que estes dois fagos têm uma abrangência restrita e relativamente distinta de isolados clínicos que infectam.

Finalmente, utilizando o modelo animal de *G. mellonella*, demonstramos que o fago ZC01 é capaz de combater, ainda que parcialmente, a infecção por *P. aeruginosa* PA14 no modelo de *G. mellonella*. ZC03 também parece ser capaz de combater a infecção por PA14 nesse modelo, ainda que com menor eficácia que ZC01.

Diversas questões não exploradas nesse trabalho poderão ser futuramente investigadas. Dentre essas, qual o mecanismo de interação dos fagos ZC01 e ZC03 com a *P. aeruginosa* PA14? Estes fagos reconhecem um ou mais receptores na superfície da

bactéria? Qual a natureza desses receptores? Será a ORF ZC01_066 a proteína do fago com atividade despolimerase importante na dissolução do biofilme? Qual a função da RNA polimerase do vírion de ZC03? Será que o coquetel usando os fagos ZC01 e ZC03 é mais eficaz na fagoterapia no modelo de *G. mellonella*? A eficácia dos fagos seria aumentada se aplicados em associação com antibióticos ou despolimerases? Dessa forma, este trabalho abriu várias perspectivas para futuros estudos para o melhor entendimento de mecanismos de interação fago-bactéria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abedon, S. T.** 2018. Basic Phage Mathematics, p. 3-30. *In* M. R. J. Clokie, A. Kropinski & R. Lavigne (ed.), *Bacteriophages Methods and Protocols*, vol. 3. Humana Press, New York, NY.
2. **Ackermann, H. W.** 2012. Bacteriophage Electron Microscopy. *Advances in Virus Research* 82:1-32.
3. **Ahamed, S. T., Roy, B., Basu, U., Dutta, S., Ghosh, A. N., Bandyopadhyay, B. & Giri, N.** 2019. Genomic and Proteomic Characterizations of Sfin-1, a Novel Lytic Phage Infecting Multidrug-Resistant *Shigella* spp. and *Escherichia coli* C. *Front Microbiol* 10:1876.
4. **Almeida, G. M. F. & Sundberg, L. R.** 2020. The forgotten tale of Brazilian phage therapy. *Lancet Infect Dis* 20:e90-e101.
5. **Alvi, I. A., Asif, M., Tabassum, R., Aslam, R., Abbas, Z. & Rehman, S. U.** 2020. RLP, a bacteriophage of the family Podoviridae, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Virol* 165:1289-1297.
6. **Amgarten, D., Martins, L. F., Lombardi, K. C., Antunes, L. P., de Souza, A. P. S., Nicastro, G. G., Kitajima, E. W., Quaggio, R. B., Upton, C., Setubal, J. C. & da Silva, A. M.** 2017. Three novel *Pseudomonas* phages isolated from composting provide insights into the evolution and diversity of tailed phages. *BMC Genomics* 18:ARTN 346.
7. **Anderson, B., Rashid, M. H., Carter, C., Pasternack, G., Rajanna, C., Revazishvili, T., Dean, T., Senecal, A. & Sulakvelidze, A.** 2011. Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR- and nanosight-based assays. *Bacteriophage* 1:86-93.
8. **Azeredo, J. & Sillankorva, S.** 2018. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*. Humana Press, New York, NY.
9. **Bae, H. W. & Cho, Y. H.** 2013. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Podophage MPK7, Which Requires Type IV Pili for Infection. *Genome Announcements* 1:e00744-13.
10. **Barrow, P., Lovell, M. & Berchieri, A.** 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5:294-298.
11. **Beaume, M., Kohler, T., Greub, G., Manuel, O., Aubert, J. D., Baerlocher, L., Farinelli, L., Buckling, A., van Delden, C. & Swiss Transplant Cohort, S.** 2017. Rapid adaptation drives invasion of airway donor microbiota by *Pseudomonas* after lung transplantation. *Scientific Reports* 7:ARTN 40309.
12. **Beeton, M. L., Alves, D. R., Enright, M. C. & Jenkins, A. T. A.** 2015. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *International Journal of Antimicrobial Agents* 46:196-200.

13. **Bobay, L.-M. & Ochman, H.** 2018. Biological species in the viral world. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115:6040.
14. **Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L.** 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates* 44:26-47.
15. **Braga, L. P. P., Soucy, S. M., Amgarten, D. E., da Silva, A. M. & Setubal, J. C.** 2018. Bacterial Diversification in the Light of the Interactions with Phages: The Genetic Symbionts and Their Role in Ecological Speciation. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6:ARTN 6.
16. **Brives, C. & Pourraz, J.** 2020. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Communications* 6:ARTN 100.
17. **Brussow, H.** 2012. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* 434:138-142.
18. **Brussow, H.** 2017. Phage therapy for the treatment of human intestinal bacterial infections: soon to be a reality? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11:785-788.
19. **Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W. D.** 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:560-602.
20. **Budzik, J. M., Rosche, W. A., Rietsch, A. & O'Toole, G. A.** 2004. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14. *J Bacteriol* 186:3270-3.
21. **Burrows, L. L.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology*, Vol 66 66:493-520.
22. **Cafora, M., Deflorian, G., Forti, F., Ferrari, L., Binelli, G., Briani, F., Ghisotti, D. & Pistocchi, A.** 2019. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. *Scientific Reports* 9:ARTN 1527.
23. **Ceyssens, P. J. & Lavigne, R.** 2010. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future Microbiol* 5:1041-55.
24. **Chandler, C. E., Horspool, A. M., Hill, P. J., Wozniak, D. J., Schertzer, J. W., Rasko, D. A. & Ernst, R. K.** 2019. Genomic and Phenotypic Diversity among Ten Laboratory Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 201:e00595-18.
25. **Chang, R. Y. K., Chen, K., Wang, J., Wallin, M., Britton, W., Morales, S., Kutter, E., Li, J. & Chan, H.-K.** 2018. Proof-of-Principle Study in a Murine Lung Infection Model of Antipseudomonal Activity of Phage PEV20 in a Dry-Powder Formulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62:e01714-17.
26. **Chibeu, A., Ceyssens, P. J., Hertveldt, K., Volckaert, G., Cornelis, P., Matthijs, S. & Lavigne, R.** 2009. The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage

- phiKMV is dependent on expression regulation of type IV pili genes. *FEMS Microbiol Lett* 296:210-8.
27. **Clokic, M. R. J., Kropinski, A. & Lavigne, R.** 2018. *Bacteriophages Methods and Protocols*, vol. 3. Humana Press, New York, NY.
 28. **Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L. et al.** 2020. Eradication of a Multidrug-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolate Following Oral and Intra-rectal Therapy With a Custom Made, Lytic Bacteriophage Preparation. *Clinical Infectious Diseases* 70:1998-2001.
 29. **Craig, L., Forest, K. T. & Maier, B.** 2019. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology* 17:429-440.
 30. **Danis-Wlodarczyk, K., Olszak, T., Arabski, M., Wasik, S., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., Gula, G., Briers, Y., Jang, H. B., Vandenheuvel, D., Duda, K. A., Lavigne, R. & Drulis-Kawa, Z.** 2015. Characterization of the Newly Isolated Lytic Bacteriophages KTN6 and KT28 and Their Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Plos One* 10.
 31. **Danis-Wlodarczyk, K., Vandenheuvel, D., Jang, H. B., Briers, Y., Olszak, T., Arabski, M., Wasik, S., Drabik, M., Higgins, G., Tyrrell, J., Harvey, B. J., Noben, J.-P., Lavigne, R. & Drulis-Kawa, Z.** 2016. A proposed integrated approach for the preclinical evaluation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. *Scientific Reports* 6:28115.
 32. **Davies, J. & Davies, D.** 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74:417.
 33. **de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J. & Dutilh, B. E.** 2019. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends Microbiol* 27:51-63.
 34. **De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B. G., Danis-Wlodarczyk, K. & Lavigne, R.** 2017. *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage-host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 15:517-530.
 35. **Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garland, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K. C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R. T., Hatfull, G. F. & Spencer, H.** 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine* 25:730-733.
 36. **Demain, A. L. & Sanchez, S.** 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* 62:5-16.
 37. **Dias, R. S., Eller, M. R., Duarte, V. S., Pereira, A. L., Silva, C. C., Mantovani, H. C., Oliveira, L. L., Silva, E. D. M. & De Paula, S. O.** 2013. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of Animal Science* 91:3930-3939.

38. **Dion, M. B., Oechslin, F. & Moineau, S.** 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology* 18:125-138.
39. **Dublanchet, A. & Bourne, S.** 2007. The epic of phage therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 18:15-8.
40. **Duplessis, C., Biswas, B., Hanisch, B., Perkins, M., Henry, M., Quinones, J., Wolfe, D., Estrella, L. & Hamilton, T.** 2017. Refractory *Pseudomonas* Bacteremia in a 2-Year-Old Sterilized by Bacteriophage Therapy. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 7:253-256.
41. **Dzieciatkowska, M., Hill, R. & Hansen, K. C.** 2014. GeLC-MS/MS analysis of complex protein mixtures. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1156:53-66.
42. **Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I. & Herskovits, A. A.** 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 13:641-650.
43. **Fernandez, L., Rodriguez, A. & Garcia, P.** 2018. Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities. *Isme Journal* 12:1171-1179.
44. **Fiorentin, L., Vieira, N. D. & Barioni, W.** 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology* 34:258-263.
45. **Forti, F., Roach, D. R., Cafora, M., Pasini, M. E., Horner, D. S., Fiscarelli, E. V., Rossitto, M., Cariani, L., Briani, F., Debarbieux, L. & Ghisotti, D.** 2018. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62:e02573-17.
46. **Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., Charette, S. J., Boyle, B. & Levesque, R. C.** 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biology and Evolution* 11:109-120.
47. **Gandon, S.** 2016. Why Be Temperate: Lessons from Bacteriophage lambda. *Trends in Microbiology* 24:356-365.
48. **Gao, M., Wang, C., Qiang, X., Liu, H., Li, P., Pei, G., Zhang, X., Mi, Z., Huang, Y., Tong, Y. & Bai, C.** 2020. Isolation and Characterization of a Novel Bacteriophage Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol* 77:722-729.
49. **Garcia, P., Monjardin, C., Martin, R., Madera, C., Soberon, N., Garcia, E., Meana, A. & Suarez, J. E.** 2008. Isolation of New *Stenotrophomonas* Bacteriophages and Genomic Characterization of Temperate Phage S1. *Applied and Environmental Microbiology* 74:7552-7560.
50. **Gilbey, T., Ho, J., Cooley, L. A., Petrovic Fabijan, A. & Iredell, J. R.** 2019. Adjunctive bacteriophage therapy for prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal of Australia* 211:142-143.

51. **Gorbalenya, A. E., Krupovic, M., Mushegian, A., Kropinski, A. M., Siddell, S. G. et al.** 2020. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nature Microbiology* 5:668-674.
52. **Gordillo Altamirano, F. L. & Barr, J. J.** 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews* 32:e00066-18.
53. **Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Lobočka, M., Glowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., Jonczyk-Matysiak, E., Lusiak-Szelachowska, M., Weber-Dabrowska, B., Baginska, N., Letkiewicz, S., Dabrowska, K. & Scheres, J.** 2018. Phage Therapy: What Have We Learned? *Viruses-Basel* 10:ARTN 288.
54. **Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Wegrzyn, G., Jonczyk-Matysiak, E., Borysowski, J. & Weber-Dabrowska, B.** 2020. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med Res Rev* 40:459-463.
55. **Green, M. R. & Sambrook, J.** 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
56. **Guo, Z., Huang, J., Yan, G., Lei, L., Wang, S., Yu, L., Zhou, L., Gao, A., Feng, X., Han, W., Gu, J. & Yang, J.** 2017. Identification and Characterization of Dpo42, a Novel Depolymerase Derived from the Escherichia coli Phage vB_EcoM_ECOO78. *Frontiers in Microbiology* 8:1460.
57. **Guttman, B., Raya, R. & Kutter, E.** 2005. Basic Phage Biology, p. 42-79. *In* E. Kutter & A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages. Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
58. **Ha, A. D. & Denver, D. R.** 2018. Comparative Genomic Analysis of 130 Bacteriophages Infecting Bacteria in the Genus Pseudomonas. *Front Microbiol* 9:1456.
59. **Hampton, H. G., Watson, B. N. J. & Fineran, P. C.** 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* 577:327-336.
60. **Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S. & Qadri, I.** 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology Journal* 9:ARTN 9.
61. **Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dabrowska, K., Krylov, V. N. & Balcao, V. M.** 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research* 212:38-58.
62. **Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K. M., Davidson, A. R. & Burrows, L. L.** 2018. Pseudomonas aeruginosa defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nature Microbiology* 3:47-52.
63. **Hatfull, G. F.** 2015. Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. *Journal of Virology* 89:8107-8110.
64. **He, J. X., Baldini, R. L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q. H., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M. & Rahme, L. G.** 2004. The broad host range pathogen Pseudomonas aeruginosa strain PA14 carries two pathogenicity islands

- harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:2530-2535.
65. **Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N. & Grau, S.** 2019. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 32:e00031-19.
 66. **Hsieh, P. F., Lin, H. H., Lin, T. L., Chen, Y. Y. & Wang, J. T.** 2017. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Scientific Reports* 7:ARTN 4624.
 67. **Hyman, P. & Abedon, S. T.** 2018. *Viruses of Microorganisms* Caister Academic Press, UK.
 68. **James, C. E., Fothergill, J. L., Kalwij, H., Hall, A. J., Cottell, J., Brockhurst, M. A. & Winstanley, C.** 2012. Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 12:216.
 69. **Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., Rousseau, A. F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., Schaal, J. V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L. & Gabard, J.** 2019. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infectious Diseases* 19:35-45.
 70. **Jennes, S., Merabishvili, M., Soentjens, P., Pang, K. W., Rose, T., Keersebilck, E., Soete, O., François, P.-M., Teodorescu, S., Verween, G., Verbeken, G., De Vos, D. & Pirnay, J.-P.** 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Critical Care* 21:129.
 71. **Jeon, J. & Yong, D.** 2019. Two Novel Bacteriophages Improve Survival in *Galleria mellonella* Infection and Mouse Acute Pneumonia Models Infected with Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 85:e02900-18.
 72. **Jiang, L. & Zheng, R.** 2020. Isolation and Characterization of a Lytic *Salmonella paratyphi* Phage and Its Antibiofilm Activity Individually or Collaborative with Kanamycin Sulfate. *Viral Immunol.*
 73. **Juan, C., Peña, C. & Oliver, A.** 2017. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 215:S44-S51.
 74. **Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E.** 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10:845-858.
 75. **Khawaldeh, A., Morales, S., Dillon, B., Alavidze, Z., Ginn, A. N., Thomas, L., Chapman, S. J., Dublanche, A., Smithyman, A. & Iredell, J. R.** 2011.

- Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J Med Microbiol* 60:1697-1700.
76. **Kim, E. S., Bae, H. W. & Cho, Y. H.** 2018. A Pilin Region Affecting Host Range of the *Pseudomonas aeruginosa* RNA Phage, PP7. *Frontiers in Microbiology* 9:ARTN 247.
 77. **Knecht, L. E., Veljkovic, M. & Fieseler, L.** 2020. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Frontiers in Microbiology* 10:ARTN 2949.
 78. **Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., Yutin, N., Zerbini, F. M. & Kuhn, J. H.** 2020. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol Mol Biol Rev* 84:e00061-19.
 79. **Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E.** 2019. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 25:219-232.
 80. **Kropinski, A. M.** 2006. Phage Therapy -- Everything Old Is New again. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 17:329465.
 81. **Kropinski, A. M.** 2018. Practical Advice on the One-Step Growth Curve, p. 41-47. *In* M. R. J. Clokie, A. Kropinski & R. Lavigne (ed.), *Bacteriophages Methods and Protocols*, vol. 3. Humana Press, New York, NY.
 82. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
 83. **Lam, J. S., Taylor, V. L., Islam, S. T., Hao, Y. A. & Kocincova, D.** 2011. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in Microbiology* 2:ARTN 118.
 84. **Latino, L., Caroff, M. & Pourcel, C.** 2017. Fine structure analysis of lipopolysaccharides in bacteriophage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PA01 mutants. *Microbiology-Sgm* 163:848-855.
 85. **Latino, L., Midoux, C., Vergnaud, G. & Pourcel, C.** 2019. Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* strain Pcyll-10 variants resisting infection by N4-like phage Ab09 in search for genes involved in phage adsorption. *Plos One* 14:e0215456.
 86. **Latka, A., Maciejewska, B., Majkowska-Skrobek, G., Briers, Y. & Drulis-Kawa, Z.** 2017. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3103-3119.
 87. **Le, S., He, X., Tan, Y., Huang, G., Zhang, L., Lux, R., Shi, W. & Hu, F.** 2013. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One* 8:e68562.
 88. **Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J. X., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M.** 2006.

- Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology* 7:ARTN R90.
89. **Lee, I. M., Tu, I. F., Yang, F.-L., Ko, T.-P., Liao, J.-H., Lin, N.-T., Wu, C.-Y., Ren, C.-T., Wang, A. H. J., Chang, C.-M., Huang, K.-F. & Wu, S.-H.** 2017. Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage Φ AB6 tailspike protein. *Scientific Reports* 7:42711.
 90. **Letarov, A. V. & Kulikov, E. E.** 2018. Determination of the Bacteriophage Host Range: Culture-Based Approach, p. 75-84. *In* J. Azeredo & S. Sillankova (ed.), *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*. Humana Press, New York, NY.
 91. **Levy, S. B. & Marshall, B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10:S122-S129.
 92. **Li, G., Shen, M., Yang, Y., Le, S., Li, M., Wang, J., Zhao, Y., Tan, Y., Hu, F. & Lu, S.** 2018. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Phage PaP1 Predation via O-Antigen Polymerase Mutation. *Frontiers in Microbiology* 9:e01170.
 93. **Loh, B., Kuhn, A. & Leptihn, S.** 2019. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology* 111:1132-1138.
 94. **Loh, J. M. S., Adenwalla, N., Wiles, S. & Proft, T.** 2013. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 4:419-428.
 95. **Maciejewska, B., Olszak, T. & Drulis-Kawa, Z.** 2018. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:2563-2581.
 96. **Mathee, K.** 2018. Forensic investigation into the origin of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 - old but not lost. *J Med Microbiol* 67:1019-1021.
 97. **Moghadam, M. T., Khoshbayan, A., Chegini, Z., Farahani, I. & Shariati, A.** 2020. Bacteriophages, a New Therapeutic Solution for Inhibiting Multidrug-Resistant Bacteria Causing Wound Infection: Lesson from Animal Models and Clinical Trials. *Drug Design Development and Therapy* 14:1867-1883.
 98. **Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A.** 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:e00039.
 99. **Moreira, D. & López-García, P.** 2009. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nature Reviews Microbiology* 7:306-311.
 100. **Morozova, V., Bokovaya, O., Kozlova, Y., Kurilshikov, A., Babkin, I., Tupikin, A., Bondar, A., Ryabchikova, E., Brayanskaya, A., Peltek, S. & Tikunova, N.** 2019. A novel thermophilic *Aeribacillus* bacteriophage AP45 isolated from the Valley of Geysers, Kamchatka: genome analysis suggests the existence of a new genus within the Siphoviridae family. *Extremophiles* 23:599-612.

101. **Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R.** 2019. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology* 10:539-539.
102. **Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E. & Brouns, S. J. J.** 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology* 16:760-773.
103. **Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J. M., Resch, G. & Que, Y.-A.** 2016. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 215:703-712.
104. **Oliveira, H., Sao-Jose, C. & Azeredo, J.** 2018. Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy. *Viruses-Basel* 10:292.
105. **Olszak, T., Shneider, M. M., Latka, A., Maciejewska, B., Browning, C., Sycheva, L. V., Cornelissen, A., Danis-Wlodarczyk, K., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Gula, G., Arabski, M., Wasik, S., Miroshnikov, K. A., Lavigne, R., Leiman, P. G., Knirel, Y. A. & Drulis-Kawa, Z.** 2017. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence. *Scientific Reports* 7:16302.
106. **Pacheco, G.** 1941. José da Costa Cruz: 1894-1940. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 36:25-31.
107. **Paisano, A. F., Spira, B., Cai, S. & Bombana, A. C.** 2004. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiology and Immunology* 19:327-330.
108. **Pajunen, M., Kiljunen, S. & Skurnik, M.** 2000. Bacteriophage phiYeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *J Bacteriol.*
109. **Pelzek, A. J., Schuch, R., Schmitz, J. E. & Fischetti, V. A.** 2013. Isolation, Culture, and Characterization of Bacteriophages, p. 1-28. *In I. John Wiley & Sons (ed.), Current Protocols in Essential Laboratory Techniques vol. 7, New York, NY.*
110. **Peng, S. Y., Chen, L. K., Wu, W. J., Paramita, P., Yang, P. W., Li, Y. Z., Lai, M. J. & Chang, K. C.** 2020. Isolation and Characterization of a New Phage Infecting *Elizabethkingia anophelis* and Evaluation of Its Therapeutic Efficacy in vitro and in vivo. *Front Microbiol* 11:728.
111. **Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S. & Azeredo, J.** 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:2141-2151.
112. **Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceysens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C. & Fauconnier, A.** 2018. The Magistral Phage. *Viruses-Basel* 10:64.
113. **Poole, K.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2:65.

114. **Rice, L. B.** 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 197:1079-81.
115. **Rohwer, F. & Segall, A. M.** 2015. In retrospect A century of phage lessons. *Nature* 528:46-48.
116. **Rohwer, F., Youle, M., Maughan, H. & Hisakawa, N.** 2014. Life in our phage world: a centennial field guide to the Earth's most diverse inhabitants, 1st ed ed, vol. 1. Wholon, San Diego, CA.
117. **Rossi, F. P. N.** 2019. Análise comparativa do genoma de bacteriófagos isolados da compostagem e estudo dos determinantes de sua interação com *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado. Programa Interunidades em Bioinformática, Universidade de São Paulo, São Paulo. 65pp.
118. **Santos, S. B., Costa, A. R., Carvalho, C., Nobrega, F. L. & Azeredo, J.** 2018. Exploiting Bacteriophage Proteomes: The Hidden Biotechnological Potential. *Trends in Biotechnology* 36:966-984.
119. **Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J. et al.** 2018. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62:ARTN e02221-18.
120. **Shao, Y. & Wang, I. N.** 2009. Effect of late promoter activity on bacteriophage lambda fitness. *Genetics* 181:1467-75.
121. **Shkoporov, A. N. & Hill, C.** 2019. Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome. *Cell Host Microbe* 25:195-209.
122. **Silva, J. B., Storms, Z. & Sauvageau, D.** 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters* 363:UNSP fnw002.
123. **Stone, R.** 2002. Stalin's Forgotten Cure. *Science* 298:728-731.
124. **Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:649-659.
125. **Sulakvelidze, A. & Kutter, E.** 2005. Bacteriophage Therapy in Humans, p. 372-427. *In* E. Kutter & A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages. Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
126. **Summers, W. C.** 2005. Bacteriophage Research: Early History, p. 19-41. *In* E. Kutter & A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages. Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
127. **Summers, W. C.** 2012. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* 2:130-133.
128. **Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M. et al.** 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318-327.
129. **Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S. & Proft, T.** 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7:214-229.

130. **Turner, D., Ackermann, H. W., Kropinski, A. M., Lavigne, R., Sutton, J. M. & Reynolds, D. M.** 2018. Comparative Analysis of 37 Acinetobacter Bacteriophages. *Viruses-Basel* 10:ARTN 5.
131. **Vaz, C. S. L., Voss-Rech, D., Alves, L., Coldebella, A., Brentano, L. & Trevisol, I. M.** 2020. Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of Salmonella Enteritidis in broiler chickens. *Veterinary Microbiology* 240:108527.
132. **Vila, J., Moreno-Morales, J. & Balleste-Delpierre, C.** 2020. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. *Clinical Microbiology and Infection* 26:596-603.
133. **Voelker, R.** 2019. FDA Approves Bacteriophage Trial. *JAMA* 321:638.
134. **Waters, E. M., Neill, D. R., Kaman, B., Sahota, J. S., Clokie, M. R. J., Winstanley, C. & Kadioglu, A.** 2017. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* 72:666-667.
135. **Weber-Dabrowska, B., Jonczyk-Matysiak, E., Zaczek, M., Lobočka, M. B., Lusiak-Szelachowska, M. & Gorski, A.** 2016. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in Microbiology* 7:ARTN 1813.
136. **Wintachai, P., Naknaen, A., Pomwised, R., Voravuthikunchai, S. P. & Smith, D. R.** 2019. Isolation and characterization of Siphoviridae phage infecting extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and evaluation of therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *J Med Microbiol* 68:1096-1108.
137. **Yang, J. Y. & Zhang, Y.** 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* 43:W174-W181.
138. **Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A. & Shahin, K.** 2020. Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage VB_EcoS-Golestan Infecting Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. *Sci Rep* 10:7690.
139. **Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., Międzybrodzki, R., Łusiak-Szelachowska, M. & Górski, A.** 2020. Phage Therapy in Poland – a Centennial Journey to the First Ethically Approved Treatment Facility in Europe. *Frontiers in Microbiology* 11:ARTN 01056.
140. **Zhang, F., Huang, K., Yang, X., Sun, L., You, J., Pan, X., Cui, X. & Yang, H.** 2018. Characterization of a novel lytic podovirus O4 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Virology* 163:2377-2383.
141. **Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C. & Yates, J. R.** 2013. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* 113:2343-2394.
142. **Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S. Z., Rau, D., Kubler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Soding, J., Lupas, A. N. & Alva, V.** 2018. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *Journal of Molecular Biology* 430:2237-2243.