

ESTRATÉGIA PARA PROMOVER A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE FAGOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Laís Stephano Féba e José Luiz Caldas Wolff

Apoio: PIBIC Mackpesquisa

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma espécie bacteriana composta por organismos gram-negativos, capazes de subsistir nos mais diversos ambientes, sendo causadores de infecções em indivíduos imunocomprometidos, portadores de fibrose cística e em queimaduras. A *P. aeruginosa* é considerada uma ameaça à saúde pública devido à sua resistência a diversas classes de antibióticos, sendo crucial o desenvolvimento de tratamentos alternativos, como a fagoterapia, que consiste no uso terapêutico de bacteriófagos de ciclo lítico visando o controle de bactérias patogênicas. Uma das maiores limitações dessa técnica é, porém, a alta especificidade de hospedeiros geralmente apresentada pelos fagos, já que um mesmo tipo de fago que é altamente virulento contra uma determinada cepa bacteriana pode ser totalmente inócuo ou apresentar baixa virulência a outras cepas da mesma espécie - nesse último caso, a cepa bacteriana é considerada parcialmente sensível. Essa característica torna necessário o desenvolvimento de métodos de melhoramento genético dos fagos visando o aumento da amplitude de hospedeiros assim como o aumento da virulência. Sendo assim, este projeto teve como objetivo analisar a viabilidade de promover a recombinação homóloga através da inserção de DNA viral em bactérias por meio da transformação e investigar a possibilidade de aumento da virulência dos fagos BrSP1 e BrSP7 através da recombinação homóloga promovida pela transformação de células competentes nas cepas ATCC® 27853 e SWSM04 de *P. aeruginosa* com o DNA dos dois fagos previamente citados. Embora os resultados dos experimentos realizados indiquem que não houve recombinação entre os DNAs dos fagos BrSP1 e BrSP7, todas as demais etapas, como extração do material genético, preparo das células competentes e transformação, se mostraram bem-sucedidas, sendo essencial a realização de novos estudos com a adaptação de técnicas e diferentes combinações de bacteriófagos, uma vez que tais métodos podem se mostrar uma ferramenta promissora para a viabilização da fagoterapia.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriófago, transformação

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a bacterial species composed of gram-negative organisms, capable of subsistence in the most diverse environments, causing infections in immunocompromised individuals, cystic fibrosis patients and in burns. *P. aeruginosa* is

considered a threat to public health due to its resistance to several classes of antibiotics, and the development of alternative treatments, such as phagotherapy, which consists of the therapeutic use of lytic cycle bacteriophages aiming at the control of pathogenic bacteria, is crucial. One of the biggest limitations of this technique is, however, the high host specificity generally presented by phages, since the same type of phage that is highly virulent against a given bacterial strain can be totally innocuous or show low virulence to other strains of the same species. - in the latter case, the bacterial strain is considered partially susceptible. This characteristic makes it necessary to develop methods of genetic improvement of phages aiming at increasing the range of hosts as well as increasing their virulence. Therefore, this project aimed to analyze the feasibility of promoting homologous recombination through the insertion of viral DNA in bacteria through transformation and to investigate the possibility of increasing the virulence of the phages BrSP1 and BrSP7 through homologous recombination promoted by the transformation of competent cells in *P. aeruginosa* strains ATCC® 27853 and SWSM04 with the DNA of the two previously mentioned phages. Although the results of the experiments indicate that there was no recombination between the BrSP1 and BrSP7 phage DNAs, all other steps, such as DNA extraction, preparation of competent cells and transformation, proved to be successful, making it essential to carry out new studies with the adaptation of techniques and different combinations of bacteriophages, since such methods may prove to be a promising tool for the viability of phage therapy.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophage, transformation

1. INTRODUÇÃO

A espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* é composta por microrganismos capazes de subsistir nos mais diversos ambientes, sendo conhecida, principalmente, como um patógeno oportunista causador de diversas infecções em humanos. Estes organismos são um dos maiores causadores de infecções hospitalares, infecções respiratórias crônicas e em queimaduras, além de serem os responsáveis por uma grande parcela das mortes de pacientes com fibrose cística (Maciá et al., 2005).

A onipresença da *P. aeruginosa* somada à sua resistência natural à antibióticos – resistência esta derivada da baixa permeabilidade de sua membrana externa, da produção de β -lactamase AmpC e da existência de genes que codificam bombas de efluxo para diversas drogas – fazem com que essa espécie bacteriana seja difícil de tratar (Henrichfreise et al., 2007). Os tratamentos atualmente disponíveis para as infecções causadas por *P. aeruginosa* consistem na sua prevenção através do cumprimento dos protocolos de higiene existentes, especialmente em hospitais, e no uso de antibióticos que não são comumente usados (Driscoll et al., 2007).

Sendo assim, buscando resolver essa situação, iniciaram-se estudos acerca do uso de bacteriófagos como agentes antimicrobianos, uma vez que esta alternativa já havia sido proposta em 1917 por Félix d'Hérelle, cujas tentativas iniciais haviam apresentado resultados positivos. Até janeiro de 2015, 137 bacteriófagos específicos para o gênero *Pseudomonas* possuíam seu genoma viral sequenciado e 85% desses vírus são pertencentes à ordem Caudovirales (Pires et al., 2015).

1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

A espécie bacteriana *P. aeruginosa* possui multirresistência a drogas, de modo que a fagoterapia se mostrou necessária, embora ainda precise ser muito estudada. A problemática tratada nesse projeto, no entanto, está relacionada à alta especificidade de hospedeiros que os fagos possuem, o que faz com que, mesmo tendo a capacidade de infectar uma dada cepa bacteriana, eles não apresentem grande eficiência no combate a esses organismos.

Sendo assim, buscando por uma maneira de aumentar a virulência de tais fagos, encontramos nos conhecimentos existentes acerca da recombinação homóloga uma alternativa a ser estudada, uma vez que nesse processo há a possibilidade de permuta entre unidades semelhantes do cromossomo de diferentes indivíduos, fato que permite que

alterações prejudiciais possam ser separadas daquelas que são benéficas, o que faz com que a recombinação homóloga tenha grandes probabilidades de gerar mudanças positivas.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Geral

O objetivo deste projeto foi analisar a viabilidade de promover a recombinação homóloga através da inserção de DNA viral em bactérias através da transformação, bem como investigar a possibilidade de aumento da virulência dos fagos BrSP1 e BrSP7 através da recombinação homóloga promovida pela transformação de células competentes das cepas ATCC® 27853 e SWSM04 de *P. aeruginosa* com o DNA dos dois fagos previamente citados.

1.2.2 Específico

1. Extrair DNA do fago BrSP1, o qual produz placas opacas na SWSM04 de *P. aeruginosa*;
2. Extrair DNA do fago BrSP7, o qual produz placas opacas na ATCC® 27853 de *P. aeruginosa*;
3. Realizar o preparo de células competentes das cepas SWSM04 e ATCC® 27853 de *P. aeruginosa*;
3. Realizar a transformação das células de *P. aeruginosa* com os DNAs extraídos;
4. Confirmar a efetividade da transformação através da observação de placas de lise em ambas as cepas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* é caracterizada por seus organismos gram-negativos, aeróbicos, não-fermentadores e flagelados, os quais se dispõem de forma isolada ou em pares. Esses organismos podem ser encontrados no solo, na água e em vegetais e fazem parte, inclusive, da microbiota normal do ser humano (Mata, Abegg, 2013), sendo os causadores de infecções em indivíduos com o sistema imunológico comprometido,

em queimaduras e feridas crônicas, além de atuarem como agravante em pacientes com fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica (Mulcahy, Isabella, 2013).

Em 2013, a *P. aeruginosa* foi classificada pelo *Centers for Disease Control* como uma séria ameaça à população devido à sua múltipla resistência a drogas (Mapes et al., 2016) que é fruto de mecanismos como a produção de certos polissacarídeos extracelulares por algumas linhagens dessa bactéria que as tornam capazes de impedir a fagocitose, prejudicando a difusão de antibióticos, ou então a produção de β -lactamase AmpC que confere resistência à antibióticos beta-lactâmicos, ou até mesmo a produção de pigmentos, como a piocianina, que retardam o crescimento de outras bactérias, facilitando sua colonização (Mata, Abegg, 2013; Henrichfreise et al., 2007).

Sendo assim, métodos alternativos se fizeram necessários para o tratamento das enfermidades causadas pela *P. aeruginosa* e, uma vez que a terapia bacteriofágica já havia sido utilizada há mais de cem anos atrás, tendo apresentado resultados positivos, novamente a ciência voltou seu olhar a ela, a qual não apenas é uma alternativa mais barata que a antibioticoterapia, mas também apresenta baixo risco de efeitos colaterais (Marchiotti et al., 2016).

A terapia bacteriofágica, ou fagoterapia, consiste no uso de bacteriófagos de ciclo lítico, pertencentes à ordem Caudovirales e às famílias Myoviridae, Shipoviridae e Podoviridae, os quais afetam apenas bactérias alvo (Marchiotti et al., 2016; Pires et al., 2015). A determinação da especificidade do fago pode se dar em várias etapas do ciclo infectivo, sendo a primeira e principal delas no estágio inicial de seu ciclo de vida, uma vez que é nessa etapa que ocorre a ligação das proteínas presentes na camada externa do vírus com os receptores da superfície da bactéria. Obtendo sucesso nesse reconhecimento, as mudanças que ocorrerão tanto no fago quanto na superfície da célula bacteriana permitirão a penetração do capsídeo no interior da bactéria, de modo que, havendo condições propícias para a decodificação do genoma viral, estes organismos irão se reproduzir até lisarem a célula patogênica (Madigan et al., 2016).

É, no entanto, na especificidade da gama de hospedeiros dos fagos que reside a maior limitação da fagoterapia, sendo necessário o desenvolvimento de métodos capazes de otimizá-la, visando o aumento do número de hospedeiros que um fago é capaz de infectar (Mapes et al., 2016), o que foi a abordagem desse projeto.

Foram utilizadas as cepas SWSM04 e ATCC® 27853 de *P. aeruginosa*, as quais possuem um grau de resistência que varia entre sensível e elevado para os fagos BrSP1 e BrSP7 do estoque do laboratório do professor orientador. De acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), um microrganismo com um grau de resistência sensível é classificado como “Sensível, dosagem padrão”, o que significa que há uma elevada

probabilidade de sucesso terapêutico quando o patógeno é exposto à dosagem padrão do agente; um microrganismo com um alto grau de resistência, por sua vez, é assim caracterizado quando as chances de sucesso terapêutico são baixas, mesmo havendo um aumento da exposição do patógeno ao tratamento (Kahlmeter, Eucast, 2019).

O grau de resistência que a cepa bacteriana apresenta a determinados bacteriófagos pode ser minimizado fazendo o uso de coquetéis de fagos selecionados que, através das mutações naturais somadas às recombinações que ocorrerão durante a co-infecção da mesma célula bacteriana pelas duas ou mais espécies de fagos, poderão gerar indivíduos com uma maior virulência (Prada-Peñaranda et al., 2014).

Nesse projeto, propusemos o desenvolvimento de um método que facilitasse a recombinação homóloga entre fagos tendo como objetivo a geração de fagos com potencial de serem usados na fagoterapia, uma vez que os organismos e as proteínas recombinantes podem adquirir a capacidade de produzir substâncias e catalisar reações para as quais eles não eram naturalmente programados (Oliveira, Mantovani, 2009). Foi por meio da transformação genética, porém, que o material genético dos dois fagos foi introduzido nas cepas bacterianas, já que esse procedimento se fundamenta na inserção de DNAs específicos na célula receptora, seguido da expressão gênica destes, abrindo espaço para a possibilidade de melhoramento genético dos fagos (Calvete et al., 2015).

3. METODOLOGIA

3.1 Material biológico

Os dois bacteriófagos utilizados para o desenvolvimento do projeto estão listados no quadro 1 e são provenientes do laboratório de Biologia Molecular e Virologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, tendo sido selecionados em projetos de pesquisa anteriores, além disso estudos prévios mostraram que todos os fagos da coleção do laboratório são fagos de DNA. As duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, por sua vez, também estão listadas no quadro 1.

QUADRO 1 – Bacteriófagos e cepas bacterianas utilizadas para sua multiplicação

Bacteriófago	Cepa bacteriana
BrSP1	ATCC® 27853
BrSP7	SWSM04

QUADRO 2 – Locais de origem dos materiais biológicos

Material Biológico	Origem
BrSP1	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP)
BrSP7	Lagoa da Praça da República - SP
ATCC® 27853	-
SWSM04	Isolada de suíno

3.2 Preparo de estoque viral

Para o preparo do estoque viral, foram realizados os procedimentos de multiplicação e purificação dos fagos BrSP1 e BrSP7.

Para a multiplicação, foram inoculados 100 µL dos bacteriófagos em 6 mL de meio TSB (Caldo Triptona de Soja, Fluka Analytica®) contendo suas respectivas cepas de *P. aeruginosa* – ATCC® 27853 para o BrSP1 e SWSM04 para o BrSP7 – em crescimento exponencial. Em seguida, a amostra foi transferida à incubadora shaker (New Brunswick) por cerca de 24 horas, sob agitação de 100 rpm e a 32°C.

Passadas as 24 horas, 850 µL de amostra foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL e centrifugados a 4.000 rpm, por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 250 µL de clorofórmio e homogeneizado, por cerca de dois minutos, com um agitador do tipo vórtex, antes de ser novamente centrifugado por 10 minutos a 4.000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e a amostra foi armazenada sob refrigeração.

3.3 Titulação dos estoques de fagos

A titulação do estoque viral foi feita visando o cálculo da concentração do estoque de bacteriófagos (BrSP1 e BrSP7) e seus resultados foram obtidos através da diluição seriada dos fagos em tampão SM (0,29 g NaCl + 0,1 g MgSO₄.12.H₂O + 2,5 mL 1M Tris HCl + 0,25 mL de gelatina a 2% + 47,25 mL de H₂O destilada) na razão de 1:10, os quais foram inoculados em sobrecamadas bacterianas.

Para o preparo da sobrecamada, foi utilizada uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido, sobre o qual foi adicionado uma camada homogênea de células bacterianas. Sendo assim, 3 mL da cepa de *P. aeruginosa* sensível ao fago foram adicionados à 5 mL de meio TSB (Fluka Analytica®) contendo 0,25% de agarose (Agargen®) fundida e, em seguida, a amostra foi homogeneizada e vertida sobre as placas de Petri com meio TSA.

A diluição seriada, por sua vez, foi feita em 8 microtubos de 1,5 mL contendo 180 µL de tampão SM. Ao primeiro microtubo foram adicionados 20 µL de bacteriófagos do estoque viral, a mostra foi homogeneizada no agitador do tipo vortex e, dela, foram retirados 20 µL, os quais foram transferidos o segundo microtubo. Esse procedimento se repetiu até o microtubo de diluição 8.

A placa de Petri com a sobrecamada foi dividida em quatro partes e foram utilizadas as diluições de número 5, 6, 7 e 8. Desse modo, 20 µL de cada uma dessas diluições foram aplicados na placa de Petri, permitindo a visualização de placas de lise, as quais nos permitem estimar o título viral em unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL), através da fórmula: título viral = [nº de placas de lise / (volume da diluição (µL) x fator de diluição)] x (1000 µL / 1 mL)

3.4 Extração de ácidos nucleicos dos fagos

A extração dos ácidos nucleicos virais foi realizada de acordo com o procedimento descrito por SU e colaboradores (1998). Inicialmente, os fagos BrSP1 e BrSP7 foram multiplicados conforme descrito previamente e, após o período de incubação, cada amostra foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL, e submetida à centrifugação a 4.000 rpm, por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1/50 (vol/vol) de solução de 2M ZnCl₂, a qual favorece a precipitação dos fagos, seguido de incubação à 37°C por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi novamente submetida à centrifugação a 15.000 rpm por 2 horas.

O precipitado formado foi diluído em tampão TENS (50 mM Tris HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,3% SDS), adicionou-se proteinase K (concentração final de 100 µg/ml) e a amostra foi incubada à 55°C por 16 horas. No dia seguinte, alíquotas de 500 µL da amostra foram distribuídas em microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados fenol antes de serem homogeneizados e levados para a centrífuga (Centrífuga Hitachi, modelo CR22G) por 10 minutos, a 10.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado isopropanol gelado, na proporção de 1:1, e a amostra foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi lavado com etanol 70%, houve uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, seguida do descarte do etanol.

Por fim, o precipitado foi diluído em 100 µL de água ultrapura.

A análise eletroforética dos fragmentos obtidos após a extração foi realizada em géis de agarose (0,85%) de acordo com o procedimento padrão (SAMBROOK et al., 1989).

3.5 Preparo de células competentes

O preparo das células competentes foi realizado com base no procedimento descrito por Chuanchuen, Narasaki e Schweizer (2002).

As cepas bacterianas ATCC® 27853 e SWSM04 foram colocadas em 4 mL de caldo LB (1 g Triptona + 0,5 g Extrato de levedura + 1 g NaCl + 100 mL H₂O destilada + pH 7) para crescer overnight, à 32°C. Todos os procedimentos realizados no dia seguinte foram realizados com os tubos assentados em gelo triturado.

Inicialmente, microtubos de 1,5 mL foram resfriados por cerca de 3-5 minutos e neles foram adicionadas alíquotas de 1 mL de bactéria em fase estacionária. As amostras foram levadas à centrífuga (Centrífuga Hitachi, modelo CR22G) por 30 segundos à 13.000 rpm e, em seguida, tiveram seus sobrenadantes descartados e seus pellets ressuspensos em 1 mL de 0,1M MgCl₂ gelado.

As amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 13.000 rpm por 30 segundos, seus sobrenadantes foram descartados e seus pellets foram ressuspensos em 1 mL de TG salts (75mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 15% glicerol). As suspensões foram mantidas no gelo por 10 minutos antes de serem centrifugadas por 30 segundos a 13.000 rpm.

Por fim, após o descarte do sobrenadante, os pellets foram novamente ressuspensos em 200 µL de TG salts gelado e as amostras foram mantidas no gelo até o uso.

3.6 Transformação por choque térmico

A realização da transformação por choque térmico foi realizada com base no procedimento descrito por Chuanchuen, Narasaki e Schweizer (2002) e, para ele, foram utilizados os DNAs extraídos dos fagos BrSP1 e BrSP7, bem como as células competentes das cepas bacterianas

ATCC® 27853 e SWSM04 de *P. aeruginosa* – ambos os procedimentos foram descritos previamente.

Para a transformação, 100 µL de células competentes foram transferidas para dois microtubos de 1,5 mL pré-resfriados (cada tubo recebeu as células cometentes de uma das cepas bacterianas), ao quais foram adicionados 2-5 µL de solução contendo o DNA de ambos os fagos. A mistura foi incubada no gelo por 15 minutos e, em seguida, o choque térmico foi promovido através da transferência dos tubos para um banho-maria a 37°C por 2 minutos.

Por fim, foram adicionados 500 µL de caldo LB (1 g Triptona + 0,5 g Extrato de levedura + 1 g NaCl + 100 mL H₂O destilada + pH 7) e a amostra foi transferida para um tubo de borosilicato e incubada a 37°C, por 1 hora, em uma incubadora de bancada com agitação (New Brunswick). Passada 1 hora, foram adicionados mais 4 mL de caldo LB e a amostra foi mantida overnight na incubadora.

3.7 Confirmação da transformação

A confirmação da transformação foi realizada através da purificação com clorofórmio, que foi descrita previamente, a qual é capaz de eliminar as bactérias, enquanto os fagos permanecem viáveis. A presença dos fagos, por sua vez, foi avaliada pelo método de sobrecamada, o qual também foi descrito previamente, e o aparecimento de placas de lise indicará que a transformação funcionou.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Considerando os desafios da fagoterapia, a alta diversidade genética das espécies bacterianas apresentam uma grande relevância para os estudos, uma vez que os bacteriófagos são específicos para apenas uma parte das cepas de sua espécie alvo. Levando isso em consideração, coquetéis de fagos são utilizados para que, em conjunto, possam infectar as principais cepas causadoras de infecções, no entanto, essa situação não é ideal, tornando necessário estudos que avaliem técnicas de melhoramento genético dos fagos visando uma maior amplitude de hospedeiros (ROHDE et al., 2018).

Neste projeto, foram utilizados os fagos BrSP1 e BrSP7 e as cepas ATCC® 27853 e SWSM04 de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com o quadro 3, como foi constatado em

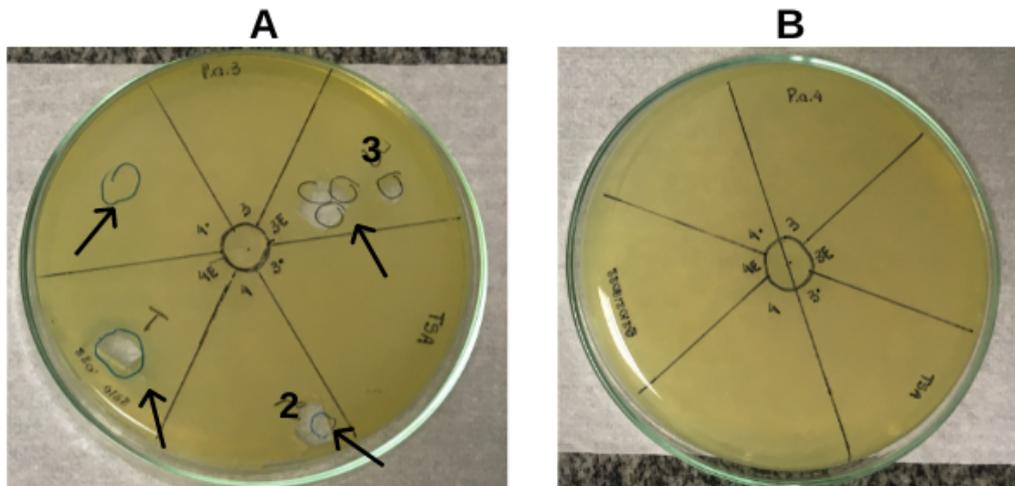
estudos prévios do laboratório de Biologia Molecular e Virologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

QUADRO 3 – Sensibilidade das cepas ATCC® 27853 e SWSM04 de *P. aeruginosa* aos fagos BrSP1 e BrSP7. A cor verde indica que a cepa é sensível ao fago e a cor vermelha indica que a cepa é resistente.

Bacteriófagos	Cepas bacterianas	
	ATCC® 27853	SWSM04
BrSP1		
BrSP7		

O procedimento de transformação, conforme descrito por Chuanchuen, Narasaki e Schweizer (2002), foi realizado com células competentes de ambas as cepas bacterianas em estudo e, após a purificação das amostras, foi feito o procedimento de confirmação da transformação. Apenas na placa de Petri contendo a sobrecamada com a cepa SWSM04 houve presença de placas de lise, indicando que o procedimento de transformação foi bem-sucedido, mas que não houve recombinação entre o DNA dos fagos BrSP1 e BrSP7 (imagem 1).

IMAGEM 1 –Ensaio para confirmação da ocorrência de transformação. 20 µL dos materiais provenientes do procedimento de transformação e purificados com clorofórmio foram inoculados em placas de Petri com meio TSA contendo uma sobrecamada das cepas bacterianas SWSM04, indicada pela letra “A”, e ATCC® 27853, indicada pela letra “B”. As setas indicam a presença de placa de lise e os números 2 e 3 indicam as placas de lise que foram cortadas para a realização de novos testes.



As placas de lise indicadas pelos números 2 e 3, na imagem 1“A”, eram provenientes dos fagos gerados pela transformação nas cepas ATCC® 27853 e SWSM04, respectivamente. Desse modo, essas placas foram recortadas e foi feita sua purificação com clorofórmio para a realização de novos testes.

Após a purificação dos recortes das placas de lise, as amostras foram diluídas em série e os fagos receberam o nome de fago 2 proveniente da transformação (F2PT) e fago 3 proveniente da transformação (F3PT). 20 μ L da diluição do F2PT e F3PT foram inoculados em placas de Petri com meio TSA contendo uma sobrecamada com as cepas bacterianas ATCC® 27853 e SWSM04.

Nas placas de Petri contendo a sobrecamada com a cepa ATCC® 27853 não houve a formação de placas de lise por nenhum dos fagos provenientes da recombinação (imagem 2), no entanto, nas placas de Petri contendo a sobrecamada com a cepa SWSM04 houve a formação de placas de lise geradas tanto pela diluição do F2PT, quanto pela diluição do F3PT (imagem 3).

IMAGEM 2 – Inoculação de diluições do F2PT e F3PT. 20 μ L dos materiais recortados da placa (imagem 1 “A”) e purificados foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA com uma sobrecamada com a cepa ATCC® 27853 – a imagem indicada pela letra “A” representa a inoculação com o F2PT e a imagem indicada pela letra “B” representa a inoculação com o F3PT. Não houve formação de placas de lise.

ATCC® 27853

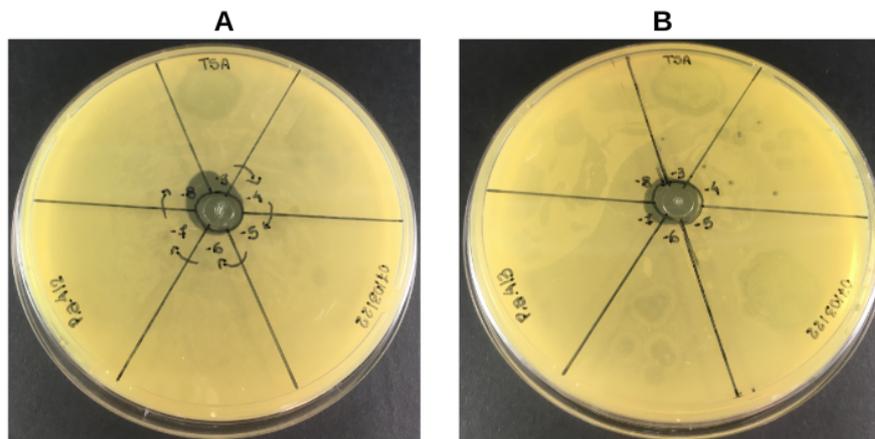
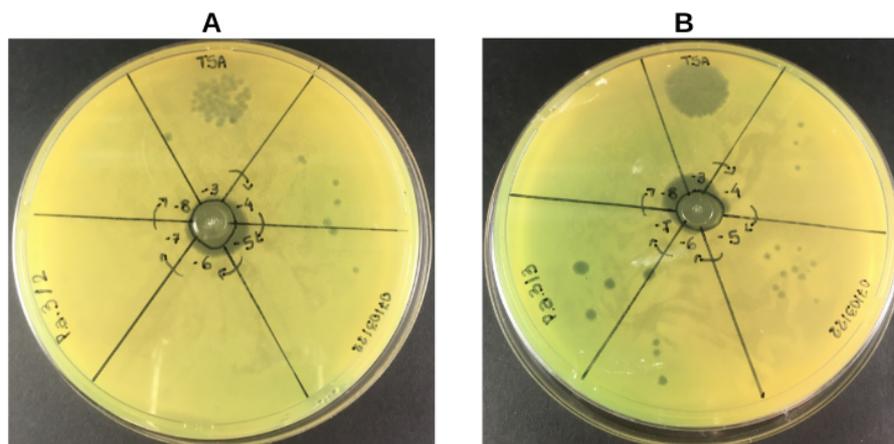


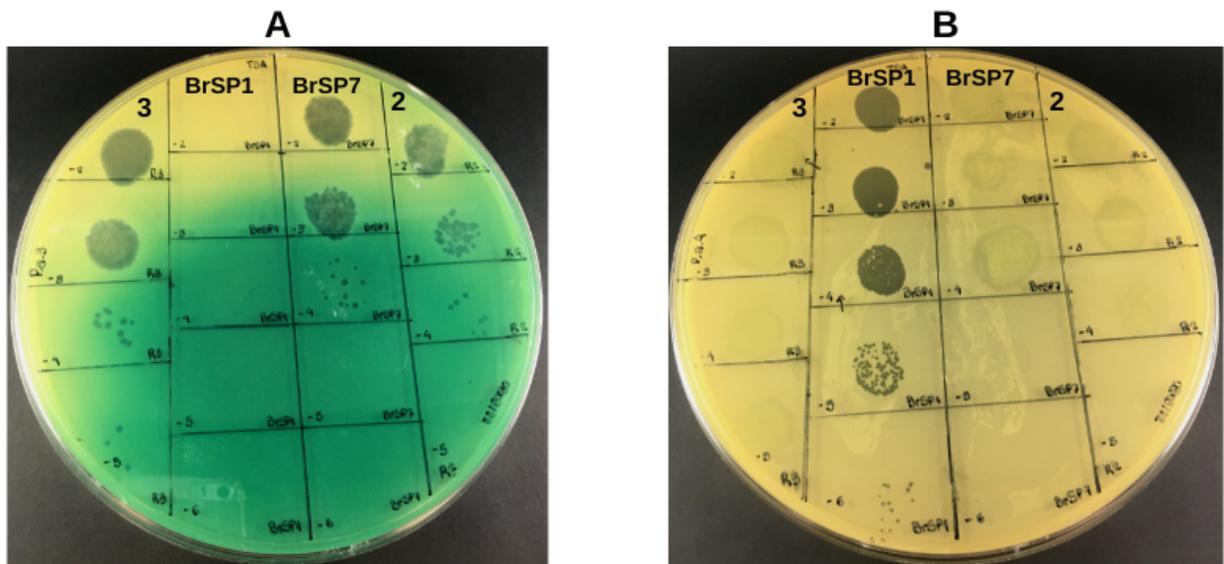
IMAGEM 3 – Inoculação de diluições do F2PT e F3PT. 20 μ L dos materiais recortados da placa (imagem 1 “A”) e purificados foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA com uma sobrecamada com a cepa SWSM04 – a imagem indicada pela letra “A” representa a inoculação com o F2PT e a imagem indicada pela letra “B” representa a inoculação com o F3PT. Em ambas as placas houve a formação de placas de lise.

SWSM04



Por fim, para a confirmação dos resultados, novas placas de Petri com meio TSA e uma sobrecamada das cepas ATCC® 27853 e SWSM04 foram inoculadas com a diluição seriada de ambos os fagos controle (BrSP1 e BrSP7), bem como com a diluição do F2PT e F3PT. Como pode ser observado na imagem 4, houve a formação de placas de lise geradas pelos fagos controle de acordo com suas respectivas cepas bacterianas sensíveis (quadro 3), assim como foi possível identificar a presença de placas de lise dos fagos provenientes da transformação apenas na sobrecamada com a cepa SWSM04.

IMAGEM 4 – Inoculação de diluições do F2PT, F3PT, BrSP1 e BrSP7. 20 µL das amostras do F2PT, F3PT, BrSP1 e BrSP7 foram inoculados em placas de Petri com meio TSA contendo uma sobrecamada com as cepas bacterianas ATCC® 27853 e SWSM04 – a imagem indicada pela letra “A” representa a sobrecamada com a cepa SWSM04 e a imagem “B” representa a sobrecamada com a cepa ATCC® 27853. Observa-se que na imagem “A” houve formação de placas de lise pelos fagos F2PT, F3PT e BrSP7, enquanto na imagem “B” houve formação de placas de lise apenas pelo fago BrSP1.



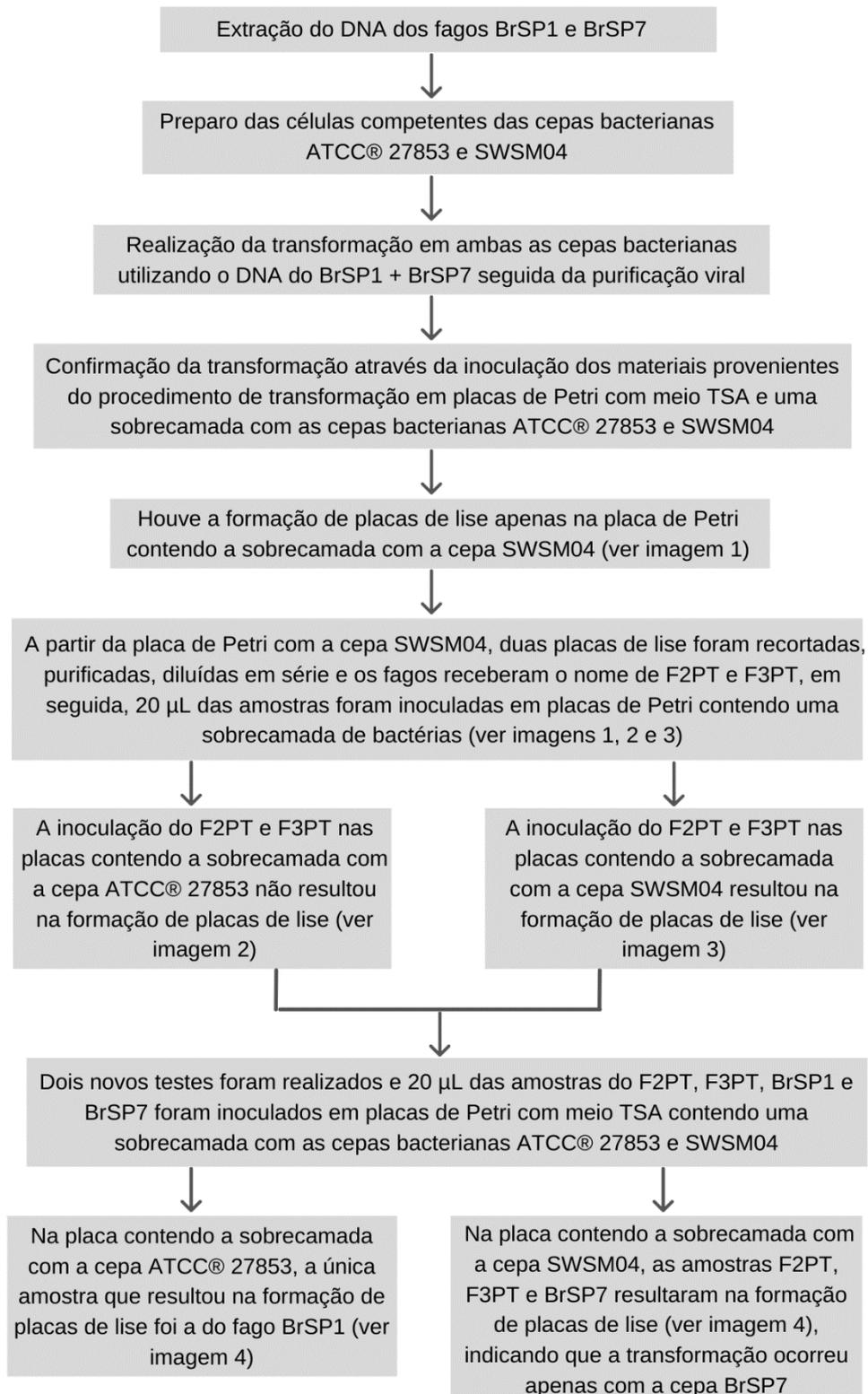
Considerando que houve surgimento de placas de lise apenas em sobrecamadas com a cepa bacteriana SWSM04, pode-se assumir que a transformação foi bem sucedida, porém não houve recombinação genética, uma vez que, caso a recombinação tivesse ocorrido, haveriam placas de lise em ambas as cepas. É importante ressaltar que, durante a transformação, apenas o DNA do fago BrSP7 foi capaz de entrar na célula bacteriana e se multiplicar, já que apenas a cepa sensível a ele apresentou placas de lise.

Como pode ser observado nas imagens 2 e 4, a sobrecamada com a cepa ATCC® 27853 parece apresentar uma densidade menor de células, isso indica que essa cepa bacteriana apresenta alguma sensibilidade ao fago BrSP7, e consequentemente ao F2PT e F3PT, no entanto esses danos podem ser resultado de alguma ação mínima do fago, não representando capacidade de controle em bioensaios.

Outra possibilidade que não deve ser descartada é a de que restou uma partícula viral na amostra de DNA, mesmo após o procedimento de extração. No entanto, essa

probabilidade é muito baixa, uma vez que as etapas de extração de DNA são muito agressivas para o bacteriófago devido à elevada temperatura que a amostra é submetida e ao uso de substâncias como proteinase K, fenol e clorofórmio.

IMAGEM 5 – Fluxograma com as etapas dos experimentos a partir da extração de DNA até a obtenção dos resultados finais.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de bacteriófagos no controle microbiano é uma técnica promissora, uma vez que os fagos possuem a capacidade de diminuir a concentração de bactérias patogênicas, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*. Os maiores desafios dessa técnica, no entanto, residem na necessidade de melhoramento genético dos fagos para que eles apresentem uma maior amplitude de hospedeiros e virulência.

Uma das técnicas utilizadas no melhoramento genético de bacteriófagos é o protocolo de Appelman (BURROWES; MOLINEUX; FRALICK, 2019). Esse método consiste na infecção de uma cepa bacteriana com dois ou mais tipos de fagos com o objetivo de promover a recombinação entre esses dois tipos de fagos. Uma limitação desse procedimento é que para que a recombinação homóloga ocorra é necessário que os dois fagos sejam capazes injetar seus genomas no interior das células.

No presente estudo foi constatada a possibilidade do uso da transformação como uma ferramenta para inserir genomas completos de fagos em *P. aeruginosa*. Logo, esses resultados mostraram que é possível promover a recombinação homóloga utilizando fagos que na natureza não conseguem transferir seu DNA para o interior da célula. Estratégias alternativas aquelas que usamos devem ser testadas no futuro, tais como a fragmentação de um dos genomas com enzimas de restrição antes do processo de transformação e a utilização de outros conjuntos de fagos.

Uma importante limitação do nosso estudo é o fato conhecermos o genoma de apenas um dos fagos utilizados no estudo. A ocorrência do processo de recombinação homóloga depende da existência de alguma homologia entre as sequências recombinantes. Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de que a ausência de recombinação foi devida a inexistência de sequências homólogos que permitiriam a ocorrência desse processo. Outra limitação é que nossa estratégia para constatação de recombinação se limitou a expansão da amplitude de hospedeiros. Ou seja, recombinações que não afetem essa característica não seriam detectadas no nosso experimento.

6. REFERÊNCIAS

BURROWES, B. H.; MOLINEUX, I. J.; FRALICK, J. A. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: The appelmans protocol. **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.

- CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; DE SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, p. 41-53, 2015.
- CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C. T.; SCHWEIZER, H. P. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. **Biotechniques**, v. 33, n. 4, p. 760-763, 2002.
- DA MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2013.
- DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 351-368, 2007.
- HENRICHFREISE, B.; WIEGAND, I.; PFISTER, W.; WIEDEMANN, B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4062-4070, 2007.
- KAHLMETER, G.; EUCAST, Comitê Gestor do. **Redefinição das categorias dos testes de sensibilidade S, I e R**. European Committee On Antimicrobial Susceptibilitytesting, 2019. 54 slides, color. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- MACIÁ, M. D.; BLANQUER, D.; TOGORES, B.; SAULEDA, J.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3382-3386, 2005.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. Genômica, Genética e Virologia. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2016. p. 251-301.
- MAPES, A. C.; TRAUTNER, B.W.; LIAO, K.S.; RAMIG, R.F. Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Bacteriophage**, v. 6, n. 1, p. e1096995, 2016.
- MARCHIOTTI, M. C.; UBER, A.P.; PAIVA, L.R.S.; HELBEL, C. Fagoterapia: uma alternativa simples e barata para o tratamento de infecções bacterianas resistentes à antibioticoterapia. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 26, n. 2, 2016.
- MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2013.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

PIRES, D. P.; BOAS, D.V.; SILLANKORVA, S.; AZEREDO J. Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of virology**, v. 89, n. 15, p. 7449-7456, 2015.

PRADA-PEÑARANDA, C.; HOLGUÍN-MORENO, A.V.; GONZÁLEZ-BARRIOS, A.F.; VIVES-FLOREZ, M.J. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. **Universitas Scientiarum**, v. 20, n. 1, p. 43-60, 2014.

ROHDE, C.; RESCH, G.; PIRNAY, J.P.; BLASDEL, B.G. Expert opinion on three phage therapy related topics: bacterial phage resistance, phage training and prophages in bacterial production strains. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 178, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SU, M. T.; VENKATESH, T.; BODMER, V. Large- and Small-Scale Preparation of Bacteriophage Lysate and DNA. **BioTechniques**, v. 25, p. 44-46, 1998.

Contatos: lais.feba@hotmail.com e joseluiz.wolff@mackenzie.br