

GERAÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES A FAGOS E ANÁLISE DA RESISTÊNCIA CRUZADA

Karen Cristina Dallaqua da Silva (IC) e José Luiz Caldas Wolff (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackpesquisa

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista gram-negativo responsável por parte das infecções causadas em ambiente hospitalar, provocando altas taxas de mortalidade e comorbidade em pacientes imunodeprimidos. Por conta do uso inadequado de antibióticos e a mecanismos de resistência intrínsecos, esses microrganismos apresentam poucos fármacos eficientes para seu tratamento. Dessa forma, o desenvolvimento de novas formas de combate desse patógeno se faz necessário. Coquetéis compostos por bacteriófagos são uma possível alternativa para o tratamento de infecções bacterianas e o aparecimento de cepas resistentes. Os coquetéis ideais são compostos por fagos que utilizam receptores de membrana diferentes. Considerando que a resistência cruzada ocorre entre fagos que utilizam os mesmos receptores, no presente trabalho foram selecionadas três cepas de *P. aeruginosa* mutantes resistentes ao fago BrSP1 e realizado testes de adsorção deste fago em três tempos, 0, 20 e 40 minutos e teste de resistência cruzada em outros fagos, dos quais a cepa original era sensível, através da aplicação das diluições virais em sobrecamadas compostas de células bacterianas. Os resultados mostraram a ocorrência de resistência cruzada nos fagos 26IF, 8F1 e 26F1, em ao menos uma dentre as onze cepas mutantes isoladas. O fago 23F3 foi sensível a todas as cepas, indicando possivelmente o uso de receptores de membranas diferentes do BrSP1 em seu processo de adsorção.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; bacteriófagos; controle microbiano

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative opportunistic pathogen responsible for infections in hospitals, causing high mortality and comorbidity rates in immunocompromised patients. Due to the inadequate use of antibiotics and the presence of intrinsic resistance mechanisms, these microorganisms have few efficient drugs for their treatment. Thus, the development of new ways to combat this pathogen is necessary. Cocktails composed of bacteriophage are a possible alternative for the treatment of bacterial infections and the development of resistant strains. The ideal phage cocktail requires phages that use different cell membrane receptors. Considering that cross-resistance occurs between phages that use the same receptors, in the present work, three strains of *P. aeruginosa* resistant mutants to phage BrSP1 were selected and isolated. In these strains, were performing an assay to test BrSP1's phage adsorption, over a time interval of 0, 20 and 40 minutes, and a cross-resistance

test on other phages, of which the original strain was sensitive, through the application of a viral dilutions in overlays composed of bacterial cells. The results showed the occurrence of cross resistance in phages 26IF, 8F1, and 26F1, in at least one of the eleven isolated mutant strains. The phage 23F3 was sensitive to all strains, possibly indicating the use of membrane receptors other than BrSP1 in its adsorption process.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophages; microbial control

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista gram-negativo responsável por parte das infecções causadas em ambiente hospitalar. Acomete principalmente pacientes imunossuprimidos, portadores de fibrose cística, com queimaduras e usuários de terapia intensiva, resultando em alta mortalidade e comorbidade (LOPES; SILVA; OLIVEIRA; ALVES, 2019; MINGRONE, 2011).

Além de acometer seres humanos, essa espécie bacteriana causa infecções ainda em diversos grupos de animais, como equinos, gatos e cães, se mostrando relevante também na medicina veterinária (FERNANDES, 2009; HAWKINGS, 2010).

A importância das infecções causadas por *P. aeruginosa* se dá em virtude a baixa disponibilidade de fármacos efetivos para seu tratamento. Essas bactérias apresentam mecanismos intrínsecos que as tornam resistentes a múltiplos antimicrobianos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Além disso, o aparecimento de cepas resistentes tem se intensificado nos últimos anos (LOUREIRO et al., 2).

Dessa forma, é de grande importância que novos fármacos e tratamentos alternativos sejam desenvolvidos para o controle *P. aeruginosa*. Uma possível alternativa para o tratamento de infecções bacterianas é a fagoterapia, ou seja, a utilização de vírus que infectam apenas bactérias de forma terapêutica (KORTRIGHT et al., 2019). Os bacteriófagos, também chamados abreviadamente de fagos, têm várias características que lhes confere grande potencial de aplicação no controle microbiano.

O ciclo infectivo dos fagos se inicia com o reconhecimento e adesão a receptores de membrana específicos da célula hospedeira, seguido da introdução de seu material genético no interior dela. Esse ciclo pode ocorrer de forma lisogênica, no qual o DNA do vírus se adere ao da bactéria, se mantendo em cada fase replicativa, ou de forma lítica promovendo a geração de novos vírus e a lise celular (HANLON, 2007). Os bacteriófagos que apresentam ciclo lítico proporcionam um controle da população bacteriana, uma vez que, ao lisar as células hospedeiras, acaba as matando rapidamente (MADIGAN et al., 2016). Por conta dessa característica, fagos líticos podem compor coquetéis para reduzir a população de *P. aeruginosa* (YANG et al., 2020).

Um aspecto essencial para a composição dos coquetéis é a determinação dos receptores que os fagos utilizam para adentrarem na célula susceptível. Coquetéis ideais são constituídos por dois ou mais fagos que utilizam receptores diferentes; por conta da menor possibilidade de mutações espontâneas gerarem resistência a ambos ao mesmo tempo (NILSSON, 2014). Essa característica pode ser investigada através de ensaios que determinam a ocorrência de resistência cruzada, resistência que ocorre a bacteriófagos que

utilizam os mesmos mecanismos de infecção, como, por exemplo, os mesmos receptores (TRUELLE; BRYAN; HUDSON; DENES, 2019).

Algumas cepas bacterianas apresentam fenótipos que as fazem ser insensíveis a uma espécie ou grupo de bacteriófagos. As bactérias mutantes insensíveis a fagos (BIMs) surgem naturalmente em decorrência de mutações cromossômicas espontâneas. Mutações das quais podem interferir na natureza do receptor utilizado pelo fago para adsorção, por exemplo (FORDE; FITZGERALD, 1999). Assim, através da geração de BIMs pode se observar a ocorrência de resistência cruzada contra fagos que utilizam o mesmo receptor para a adsorção.

Desse modo, esse trabalho analisou a ocorrência de resistência cruzada em três cepas de *P. aeruginosa* isoladas de animais domésticos, através da geração e isolamento de mutantes resistentes ao bacteriófago Pseudomonas BrSP1 (MELO et al., 2019).

1.2 Justificativa

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle de infecções bacterianas vem se tornando cada vez mais urgente no mundo atual, devido, principalmente, à necessidade de se reduzir o uso excessivo de antibióticos em tratamentos clínicos. A fagoterapia, neste sentido, vem se destacando como uma das alternativas de controle microbiano que apresenta maior potencial de uso tanto no cuidado da saúde humana como para uso veterinário. O presente trabalho tem como objetivo promover o avanço nas investigações sobre a utilização de fagos no controle microbiano. A bactéria alvo desse estudo, *P. aeruginosa*, é uma espécie oportunista de difícil controle e que, frequentemente, apresenta múltipla resistência a antibióticos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos gerais

Analisar a ocorrência de resistência cruzada em fagos que infectam *P. aeruginosa* e assim poder classificar esses fagos de acordo com o receptor celular que utilizam. Essa informação poderá servir para orientar o uso desses fagos em coquetéis para o controle de infecções veterinárias causadas por *P. aeruginosa*.

1.3.2 Objetivos específicos

1) Multiplicar quatro cepas de bactérias do gênero *P. aeruginosa* susceptíveis a fagos. Sendo elas, CAPE01, BOIJ02 e CASM06, estas são susceptíveis ao fago BrSP1 e, também, a pelo menos dois outros fagos, como indicado na tabela 1.

2) Isolar mutantes resistentes ao fago BrSP1 proveniente das 3 cepas indicadas acima. Estas cepas foram denominadas BIM/BrSP1 (Mutantes insensíveis ao bacteriófago BrSP1).

Portanto, as cepas isoladas resistentes ao fago BrSP1 foram chamadas de CAPE01_BIM/BrSP1, BOIJ02_BIM/BrSP1, CASM06_BIM/BrSP1.

3) Determinar se os mutantes insensíveis ao fago BrSP1 apresentam mecanismos de resistência cruzada quando expostos aos outros fagos capazes de infectar a cepa original.

4) Analisar se a resistência ao fago BrSP1 se dá em virtude do bloqueio das etapas de reconhecimento de receptores de membrana utilizados pelo fago durante o processo de adsorção.

Tabela 1. Sensibilidade de quatro cepas bacterianas de *P. aeruginosa* à cinco bacteriófagos. A cor verde indica que a cepa é susceptível; vermelho, resistente, e amarelo, possivelmente susceptível.

Cepa bacteriana	Sensibilidade a bacteriófagos isolados no laboratório do professor proponente				
	8FI	23F3	26F1	26IF	BrSP1
CASM06	Red	Red	Green	Green	Green
CAPE01	Green	Red	Yellow	Green	Green
BOIJ02	Yellow	Green	Green	Red	Green

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os bacteriófagos, também chamados de fagos, são vírus capazes de infectar células procariontes. Esses vírus são formados por um capsídeo, uma estrutura icosaédrica proteica que abriga o material genético viral, geralmente sendo DNA de fita dupla (MADIGAN et al., 2016; HANLON, 2007). As etapas de infecção do vírus são adsorção, biossíntese, maturação e liberação. O processo de infecção se inicia com o encontro do fago com seu hospedeiro, ocorrendo o reconhecimento e a fixação à receptores de membrana específicos, seguida da inserção do material genético viral no citoplasma da célula (SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). Os receptores presentes na superfície celular apresentam função específica para a bactéria; os fagos, por sua vez, se aproveitam dessas estruturas para seus processos de infecção (MADIGAN et al., 2016).

A produção de novos fagos pode ocorrer de duas maneiras: de forma lítica ou lisogênica. No ciclo lítico a inserção do material genético viral, faz com que o metabolismo da célula hospedeira concentre suas atividades na síntese de componentes do vírus, resultando na formação de novos materiais genéticos virais e na produção de proteínas e enzimas que

formarão as estruturas dos novos fagos. A montagem desses novos bacteriófagos provoca a lise da célula, colocando-os no ambiente extracelular (MINGRONE, 2011).

No ciclo lisogênico, o DNA do fago no citoplasma se insere ao cromossomo bacteriano através de uma recombinação, agora denominado profago. Este ciclo não provoca a lise, isso favorece o vírus, pois a cada fase replicativa da célula, o material genético do vírus é replicado também (MINGRONE, 2011).

A partir disso, nota-se que a infecção com fagos líticos com frequência resulta em grande redução da cultura bacteriana. Esta característica possibilitou o desenvolvimento de métodos de controle que utilizam estes agentes, tornando a terapia fágica uma alternativa para tratamento tanto em humanos como em animais (FILIPPOV, 2011).

Na medicina, coquetéis terapêuticos de fagos, ou seja, uma combinação de bacteriófagos distintos são uma alternativa como recurso na substituição do uso de antibióticos para bactérias com múltiplas resistências. Para ser eficiente no controle das lises das bactérias, o conjunto de fagos utilizados deve, preferencialmente, utilizar receptores distintos (NILSSON, 2014).

Neste contexto, *Pseudomonas aeruginosa* compõem um grupo de bactérias para qual o estudo e controle do uso de fagos é muito promissor, e extremamente necessário para a criação de tratamentos médicos eficazes em doenças acometidas em humanos e animais (VALOT et al., 2015). Essa bactéria é caracterizada como Gram-negativa aeróbica, movidas por flagelos, podendo estar agrupada em bastonetes isolados ou em pares. É extremamente abundante em diversos ambientes da biosfera, fazendo parte inclusive da microbiota de humanos e animais (MADIGAN et. al; 2016).

P. aeruginosa são um dos principais agentes causadores de infecções hospitalares afetando indivíduos imunossuprimidos, expostos por queimaduras, frequentemente também em infecções do trato urinário (no uso de cateter contaminados por esta bactéria), infecção ocular e do ouvido (MINGRONE, 2011). Esta espécie bacteriana é capaz também de infectar animais de pequeno e grande porte, causando por exemplo otite em cães e mastite em bovinos (HAWKINGS, 2010).

Fagos já têm sido utilizados em diversos países como nos Estados Unidos, na forma de controle biológico de bactérias, destacando-se o controle de contaminação bacteriana, como a aplicação e comercialização de coquetéis de fagos por exemplo o Listex™ and Salmonlex™, usados na indústria alimentícia (KAZI, 2015).

Bactérias assim como *P. aeruginosa* tem como um dos fatores para seu sucesso de sobrevivência a manutenção e modificação de características genotípicas que as tornem bem adaptadas através de diversos mecanismos de resistência. Fatores intrínsecos, como, por

exemplo, a presença de bombas de efluxo e baixa permeabilidade de membrana, além de hiper mutações em seu genoma, faz com que a *P. aeruginosa* seja resistente a diversos antibióticos (HENRICHFREISE; WIEGAND; PFISTER; WIEDEMANN, 2007).

Dentro deste contexto observa-se, também, a ocorrência de BIMs (Mutantes Insensíveis ao Bacteriófago), ou seja, mutantes dotados de alterações em seu genoma que resultaram em expressões gênicas que proporcionam através de alterações na bactéria, resistência ao fago que a infecta (MORADALI et al., 2017), provocando, por exemplo, o impedimento da adsorção, injeção de DNA e até mesmo a destruição do material genético viral (ROSTOL; MARRAFFINI, 2019).

Algumas das resistências selecionadas por parte dessas mutações podem gerar resistência não apenas a um, mas a um grupo de bacteriófagos, denominada de resistência cruzada (TRUDELLE; BRYAN; HUDSON; DENES, 2019).

3. METODOLOGIA

3.1. Origem e armazenamento das cepas de *P. aeruginosa*

As cepas utilizadas nesse trabalho são provenientes da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Originárias do laboratório de bacteriologia, coordenada pela Professora Agueda Palmira Castanho de Vargas, e autorizado pela mesma a utilização de tais cepas para trabalhos acadêmicos, realizados sob a supervisão do professor orientador. O armazenamento destas cepas foi feito por congelamento a -80°C em meio Triptona de Soja (Fluka Analítica®) com adição de 15% glicerol.

3.2. Bacteriófagos usados no trabalho

Os bacteriófagos utilizados no trabalho (tabela 1) são provenientes do laboratório do professor proponente. Muitos dos quais foram isolados de córregos e corpos d'água de São Paulo por trabalhos anteriores no laboratório sob orientação do professor proponente.

3.3. Meio de cultura para crescimento das bactérias e tampão para a manutenção dos fagos

As culturas bacterianas de *P. aeruginosa* utilizadas nesse trabalho foram mantidas em meio Triptona de Soja (TSB, Fluka Analítica®), cuja composição para o preparo de um litro de meio se dá por: 17 g de triptona, 3 g de farinha de soja digerida, 2,5 g de glicose, 5 g de cloreto de sódio e 2,5 g de fosfato dipotássico. Com regulação do pH do meio para $7,3 \pm 0,2$ a 25°C .

Para o manuseio dos bacteriófagos foi utilizado tampão SM com a seguinte composição por litro: 5,8 g de NaCl, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 50 mL Tris HCL (1M) e 5 mL gelatina a 2%. Com pH a 7,4.

3.4. Multiplicação dos fagos para estoque

Para a formação de estoques virais, os cinco isolados de fagos utilizados neste estudo (BrSP1, 8F1, 23F3, 26F1 e 26IF) foram multiplicados. Para isso, foi inoculado 50 µL de fago em 5 mL de uma cultura de *P. aeruginosa* em meio TSB que estava no início da fase exponencial de crescimento. Esta cultura foi transferida para uma estufa tipo “shaker” (New Brunswick) e mantida sob agitação a 100 rpm (rotações por minuto) por 24 horas a 35°C.

Após este período, a amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 2000 x g por 10 minutos. Após centrifugada, 800 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e purificado com o tratamento de clorofórmio. Para isto, 200 µL de clorofórmio foi transferido ao microtubo contendo o sobrenadante e agitado por 5 minutos utilizando um agitador tipo Vortex. Após agitado, este material foi submetido a uma nova centrifugação a 12000 x g por 10 minutos. O sobrenadante, contendo os fagos purificados, foi transferido a um novo microtubo e armazenado sob refrigeração.

3.5. Titulação dos fagos

A titulação dos fagos foi realizada através do método de microgotas em placas de Pétri contendo sobrecamada de células de *P. aeruginosa*. A sobrecamada foi feita adicionando 1 mL, aproximadamente um milhão, de células bacterianas, em 5 mL de uma solução de TSB com 0,25% de agarose a 55°C. Esta mistura foi homogeneizada e vertida sobre placas de Pétri contendo meio de cultura TSA. Garantindo uma distribuição uniforme das células bacterianas na superfície da placa.

Para a titulação dos fagos, foi feita uma diluição seriada em 8 microtubos de 1,5 mL. Em cada microtubo foi adicionado 450 µL de tampão SM. O primeiro microtubo, identificado como “diluição 1”, foi inoculado com 50 µL de fagos transferidos do estoque viral. Em seguida, foi homogeneizado rapidamente no agitador tipo Vortex. A partir deste microtubo, 50 µL de seu conteúdo foi transferido para um segundo microtubo. Esse processo foi repetido até o microtubo 8, obtendo-se uma diluição de até um bilhão de vezes comparada ao estoque original do fago.

Após a preparação das diluições, através do método de microgotas, 20 µL de cada uma das diluições foi inoculado em placas de Pétri contendo a sobrecamada bacteriana. Após secas, as placas foram incubadas na estufa por 24 horas a 30°C. Após este período, foi realizada a contagem das placas de lise para a estimativa do título viral em unidade formadora de placa por mL (PFU/mL), calculado conforme a fórmula:

$$\text{PFU/mL} = (\text{número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}) / (\text{volume da diluição (mL)})$$

Nesse estudo, a titulação dos fagos BrSP1, 8FI, 23F3, 26F1, 26IF foi equivalente a $4,5 \cdot 10^9$; $2,75 \cdot 10^{10}$; $3,75 \cdot 10^4$; $1,33 \cdot 10^9$ e $1,25 \cdot 10^{11}$, respectivamente.

3.6. Isolamento de cepas resistentes

O isolamento das cepas bacterianas de *P. aeruginosa* resistentes aos fagos foi feito através de uma sobrecamada viral. A partir das cepas CASM06, BOIJ02 e CAPE01, foram isoladas ao menos três variantes resistentes ao fago BrSP1. Para o preparo da sobrecamada viral, um bilhão de partículas virais, 222 μ L, foram adicionadas a uma solução de 5 mL de meio de cultura TSB com 0,40% de agarose, mantida a 55°C. Essa solução foi homogeneizada e vertida sobre placas de Pétri contendo, previamente, meio de cultura TSA.

A fim de se obter colônias bacterianas resistentes puras e isoladas, as culturas de *P. aeruginosa* em fase exponencial foram diluídas em dois microtubos de 1,5 mL. Em cada microtubo colocou-se 450 μ L de meio de cultura TSB. Em seguida, 50 μ L da cultura em fase exponencial foi transferida para o primeiro microtubo e homogeneizado no vórtex. A partir do microtubo 1, o mesmo processo foi repetido para o segundo microtubo. Após a diluição, 60 μ L da cultura original, em fase exponencial, e das duas diluições feitas foi inoculado sobre as placas de Pétri contendo a sobrecamada viral, nomeadas como original, 10^{-1} e 10^{-2} . Com o auxílio da alça de Drigalski, a amostra foi espalhada, obtendo-se uma camada homogênea de células bacterianas. Após secas, as placas de Pétri foram incubadas por 24 horas na estufa a 30°C.

A partir das colônias crescidas, foram selecionadas aleatoriamente de 3 a 5 colônias com morfologias diferentes das placas de Pétri 10^{-1} , as quais foram cultivadas e multiplicadas em 5 mL de meio TSB; e submetidas ao teste de microgotas para a confirmação prévia de resistência ao fago BrSP1. Para isso, foi preparada uma sobrecamada bacteriana com todas as cepas resistentes, como descrito no item 3.5., e inoculado 20 μ L de fago, correspondente a 1000 PFU/mL de BrSP1 sobre as células bacterianas. Desta forma, o não aparecimento de placas de lise indica a resistência ao BrSP1.

3.7. Verificação de resistência associada a adsorção do BrSP1

A fim de verificar a estabilidade da resistência nas cepas bacterianas resistentes isoladas e se a resistência ao bacteriófago BrSP1 se deu devido às etapas de adsorção viral ou posterior a esse evento, foi feito o teste de adsorção. Para isso, 100 μ L de cultura composta pelas BIMs em fase exponencial foi inoculado em um tubo de ensaio de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura TSB. A amostra foi encubada na estufa tipo “shaker” sob agitação de 150 rpm a 35°C até atingir 10^8 UFC/mL, turbidez referente ao número 0,5 da escala de McFarland (Nefelobac).

Após agitada, foi adicionado aproximadamente 10^6 UFP/mL de BrSP1 à amostra. A mistura foi homogeneizada rapidamente e 500 μ L foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, nomeado como T=0. O microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 10000 x g por 5 minutos.

Após a centrifugação, a amostra foi submetida à purificação com o tratamento de clorofórmio. Para isso, 400 μ L do sobrenadante presente no tubo T=0 foi transferido para um novo microtubo, no qual foi adicionado 40 μ L de clorofórmio e agitado por 1 minuto no agitador tipo vórtex. A amostra foi submetida a uma centrifugação a 4000 x g por 8 minutos. Em um novo microtubo, nomeado como “purificação T=0”, 300 μ L do sobrenadante purificado foi transferido e armazenado sob refrigeração.

O tubo de ensaio contendo as partículas virais e as células bacterianas, após retirada a amostra para o microtubo T=0, foi levada para a estufa tipo “shaker” para agitação a 120 rpm por 20 minutos. Após esse tempo, 500 μ L foi retirado e transferido para um novo microtubo, denominado T=1 e, após mais 20 minutos, mais uma amostra de 500 μ L foi transferido para outro microtubo, nomeado como T=2. Ambos microtubos, T=1 e T=2, foram submetidos aos mesmos procedimentos feitos para o T=0.

As amostras purificadas foram diluídas em tampão SM, conforme os procedimentos descritos na titulação viral, até a diluição 4. As diluições, em seguida, foram inoculadas através do teste de microgotas sobre uma placa de Pétri contendo uma sobrecamada bacteriana semeada com células da cepa original sensível ao bacteriófago. Assim, a quantidade de placa de lise constante nos três tempos medidos, 0, 20 e 40 minutos, indica que os bacteriófagos não estão adentrando nas células bacterianas, devido a modificações que não permitem sua adsorção e confirma a estabilidade das BIMs isoladas.

Esse teste foi realizado utilizando apenas o fago BrSP1 em todas as cepas de *P. aeruginosa* mutantes isoladas, portanto, CASM06_BIM/BrSP1 (2, 3, 4, 5 e 6), CAPE01_BIM/BrSP1 (1, 2 e 4) e BOIJ02_BIM/BrSP1 (3, 4 e 5).

3.8. Verificação de ocorrência de resistência cruzada a partir do teste de microgotas

A verificação de ocorrência de resistência cruzada nas cepas resistentes isoladas foi feita através do teste de microgotas. Para tanto, foram preparadas sobrecamadas a partir das BIMs, conforme os procedimentos descritos na titulação viral.

A partir das diluições virais realizadas para estoque dos fagos 8FI, 23F23, 26F1 e 26IF, 20 μ L das oito diluições do estoque viral original foram aplicadas na sobrecamada preparada previamente feita com as BIMs isoladas. O não aparecimento de placas de lise nas placas de Pétri indica que a resistência ao fago BrSP1 conferiu resistência aos outros fagos da coleção e a estabilidade desta resistência.

O teste de resistência cruzada foi feito apenas com os fagos que as cepas sensíveis eram previamente susceptíveis, conforme a tabela 1.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os bacteriófagos iniciam sua infecção se ligando a receptores de membrana ou a componentes presentes na superfície celular de suas hospedeiras. Fagos que infectam bactérias gram-negativas podem utilizar proteínas presentes na membrana externa bacteriana ou, ainda, várias regiões do LPS, como receptores (RAKHUBA et al., 2010).

A membrana externa dessas bactérias é composta por fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos. Por conta do complexo formado entre o lipídeo e o polissacarídeo, essa camada é denominada de lipopolissacarídica (MADIGAN et al., 2016).

A estrutura do lipopolissacarídeo (LPS) consiste em uma porção polissacarídica, dividida em polissacarídeo cerne e O-específico, e uma porção lipídica, denominada de lipídeo A, um glicofosfolipídeo. O polissacarídeo O-específico possui sequências de quatro a cinco repetições de açúcares, como, por exemplo, galactose, glicose, ramnose e manose, além de outros, e se conecta ao lipídeo A pelo polissacarídeo cerne (MADIGAN et al., 2016).

Existem dois tipos de LPS: Liso, o qual apresenta lipídeo A, polissacarídeo cerne e o polissacarídeo O-específico, também chamado de antígeno-O; e o rugoso, o qual não apresenta o antígeno O, mas sim, o lipídeo A e o polissacarídeo cerne (RAKHUBA et al., 2010; SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). *P. aeruginosa*, por exemplo, expressam dois tipos de LPS, um denominado de banda A, que determina a porção antigênica comum desse patógeno, e a banda B, que confere um tipo específico de antígeno O (MAKIN; BEVERIDGE, 1996). A composição do antígeno-O em bactérias varia entre os grupos taxonômicos; essa estrutura é responsável pela especificidade sorológica bacteriana, imunogenicidade e pela ligação de bacteriófagos, ao servir de receptor (KIM et al., 2010).

Uma maneira da bactéria evitar a infecção do fago, é prevenir sua adsorção. Fenômenos como esconder ou mascarar o receptor é uma das estratégias utilizadas por *P. aeruginosa*, por exemplo, essas bactérias podem promover a glicosilação da pili tipo IV para evitar a ligação dos fagos a esse receptor (HARVEY et al., 2017). Mutações espontâneas são estratégias comuns adotadas evolutivamente para se reduzir as infecções por bacteriófagos (SORENSEN et al., 2011).

No estudo realizado por Shen et al. (2018), cepas de *P. aeruginosa* resistentes a bacteriófagos tiveram grandes regiões de seu genoma deletado por conta de mutações no gene MutL, o qual é componente do sistema de reparo de DNA e promove deleções nesses microrganismos. O MutL é uma proteína de restrição que reconhece e marca o local do DNA que deve ser reparado (PILLON et al., 2011). Dentre a porção deletada, estavam os genes

hmgA e galU, o galU é responsável pela conversão de glicose-1-fosfato para UDP-D-glicose, açúcar que compõe o polissacarídeo cerne, formando LPS defeituosos e desprovidos de antígeno O (SHEN et al., 2018). Enquanto a perda do gene hmgA promove o acúmulo de ácido homogentísico, o qual possui pigmentação vermelha (LE et al., 2014). Por conta disso, apareceram cepas mutantes resistentes a fagos de coloração amarronzada.

Neste trabalho, ao realizar a seleção das cepas CASM06 de *P. aeruginosa* mutantes resistentes ao fago BrSP1, notou-se a presença de algumas colônias de coloração marrom, entre as brancas nas placas contendo a sobrecamada viral (Figura 1). O mesmo fenômeno foi identificado em outros estudos realizados com cepas mutantes resistentes a bacteriófagos, resultado de grandes deleções no genoma bacteriano (SHEN et al., 2018; LI et al., 2018).

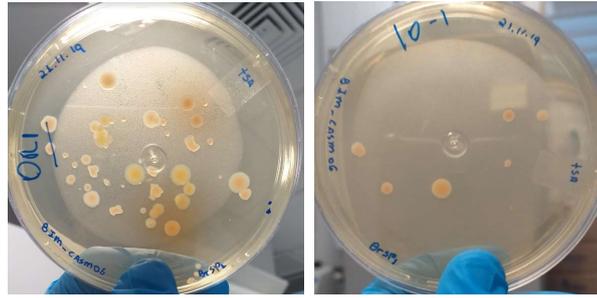
Nas mutantes brancas, apesar de não ter tido modificações na coloração, sua resistência está ligada a perda de outro gene, o *wzy*, o qual interfere na atividade da polimerase do antígeno O, conseqüentemente também altera o LPS, provocando resistência (LI et al., 2018). A polimerase do antígeno O é responsável pela polimerização e montagem das subunidades que compõe o antígeno O, e, conseqüentemente, da ligação destes ao lipídeo A (MULFORD; OSBORN, 1983).

Outras modificações ligadas ao LPS em *P. aeruginosa* foram encontradas, decorrente a mutações no gene Δ algC, ocasionando a perda das bandas A e B nesses microrganismos (ONG et al., 2020).

Dentre os mecanismos de resistência selecionados na *P. aeruginosa*, alterações em genes ligados a vias biossintética de receptores são encontrados predominantemente relacionados às estruturas do LPS e à pili tipo IV, uma vez que são os principais receptores utilizados por muitos fagos (POURCEL; MIDOUX; VERGNAUD; LATINO, 2020). Diversos fagos que infectam essa espécie bacteriana foram relatados utilizando esses dois receptores (LAM et al., 2011; BRADLEY; PITT, 1974), justificando a incidência de mutações contra os fagos que utilizam LPS como receptor.

Tendo em vista o aparecimento de cepas mutantes tanto brancas quanto marrons, podemos inferir, portanto, que possivelmente os receptores utilizados pelo fago BrSP1 para adsorção pode estar ligado a porções do LPS. Para resultados mais conclusivos, estudos moleculares devem ser feitos para mapear quais foram, de fato, as regiões mutadas que conferiram resistência a este fago.

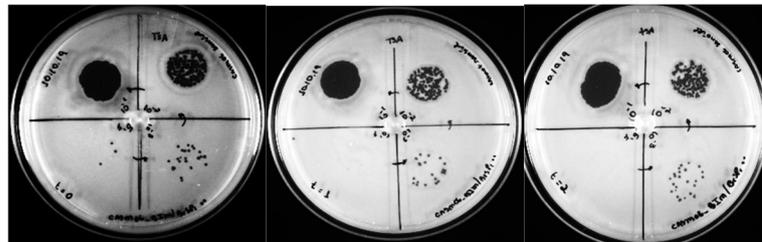
Figura 1. Colônias da cepa CASM06 mutantes insensíveis ao bacteriófago BrSP1.



Fonte: Autora do trabalho.

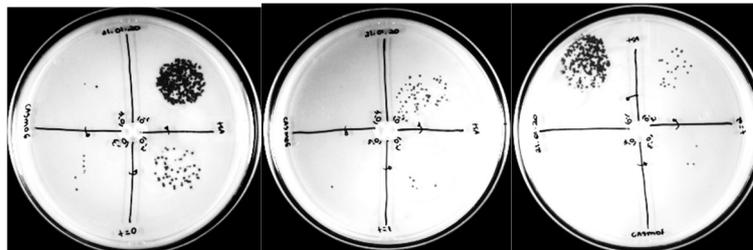
O teste de adsorção realizado nas onze cepas mutantes de *P. aeruginosa* isoladas indicaram uma quantidade de placas de lise constante nos três tempos, T=0, T=1 e T=2, assim como mostrado na cepa CASM06_BIM/BrSP1 2 (Figura 2) e BOI02_BIM/BrSP1 3 (Figura 4). Diferente do teste realizado com a cepa original de CASM06 sensível, na qual houve uma redução perceptível no T=1, comparado ao T=0 (Figura 3). Dessa forma, a prevalência de, aproximadamente, a mesma quantidade de placas de lise assim que foi adicionado o fago às células bacterianas resistentes, no tempo 0, e posteriormente a 20 e 40 minutos, indicou que os fagos não estavam adentrando na célula, confirmando a resistência das cepas ao fago BrSP1.

Figura 2. Placas de lise geradas no teste de adsorção na cepa de CASM06_BIM/BrSP1 2

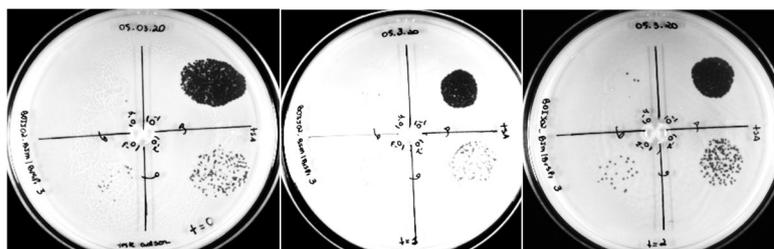


Fonte: Autora do texto.

Figura 3. Placas de lise geradas no teste de adsorção na cepa sensível de CASM06



Fonte: Autora do texto.

Figura 4. Placas de lise geradas no teste de adsorção da cepa BOIJ02_BIM/BrSP1 3

Fonte: Autora do texto.

A quantidade de placas de lise ao se manter parecida em cada quadrante nas três placas T=0, T=1 e T=2, provavelmente está relacionado com mutações espontâneas que conferiram o bloqueio de entrada do bacteriófago nas células hospedeiras. Ong et al. (2020) ao analisarem a eficiência de adsorção de dois fagos em cepas mutantes resistentes de *P. aeruginosa* constataram a diminuição de partículas virais ao realizarem sua titulação; sugerindo que os fagos conseguiram adsorver, e os mecanismos de resistência se davam internamente.

Uma vez que não ocorreu a adsorção, as mutantes resistentes ao BrSP1, CASM06_BIM/BrSP1(2, 3 e 5), BOIJ02_BIM/BrSP1 (2 e 4), e CAPE01_BIM/BrSP1 1, provavelmente conferiram mutações nos receptores de membrana. A prevenção da adsorção pode se dar pelo bloqueio de receptores, produção de cápsula ou biofilme e pela produção de inibidores competitivos (LABRIE; SAMSON; MONEAU, 2010) ou ainda, pela perda completa do receptor (HYMAN; ABEDON, 2010).

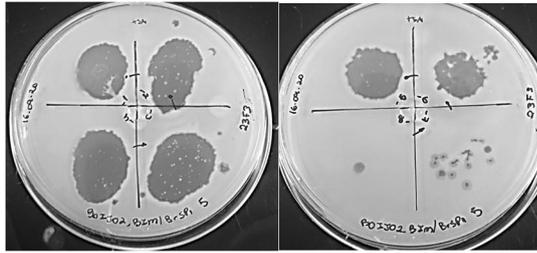
As cepas BOIJ02_BIM/BrSP1 (1 e 2) e CAPE01_BIM/BrSP1 (3 e 5) foram descartadas devido a prevalência de fagos associados a elas.

Após o teste de adsorção ao fago BrSP1, foi feita a verificação de resistência cruzada, utilizando fagos dos quais a cepa original era sensível (tabela 1), através do teste de microgotas nas 11 cepas BIMs isoladas (tabela 2).

Nas cepas de CASM06_BIM/BrSP1, três das cinco isoladas, houve a ocorrência de resistência cruzada ao fago 26F1, enquanto as restantes se mantiveram sensíveis ao fago (tabela 2). No entanto, todas as cinco BIMs foram sensíveis ao bacteriófago 26IF.

Nas cepas de BOIJ02_BIM/BrSP1, as três cepas selecionadas se mostraram sensíveis ao bacteriófago 23F3, como exemplificado pelo aparecimento de regiões de lise na cepa BIM 5 na figura 5.

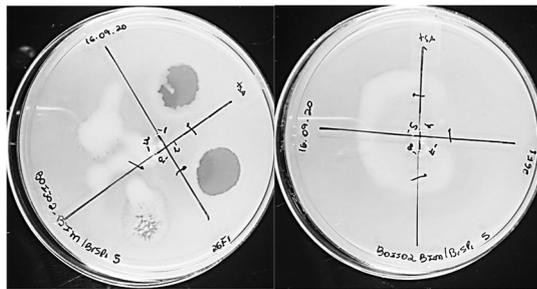
Figura 5 . Teste de resistência cruzada na cepa de BOIJ02_BIM/BrSP1 5 ao fago 23F3



Fonte: Autora do trabalho.

Além disso, as BIMs de BOIJ02 (3 e 4) foram resistentes ao fago 26F1, indicando resistência cruzada. A cepa BOIJ02_BIM/BrSP1 5, no entanto, apresentou-se sensível ao fago 26F1 apenas quando foi inoculado as diluições com maiores concentrações de fago (Figura 6).

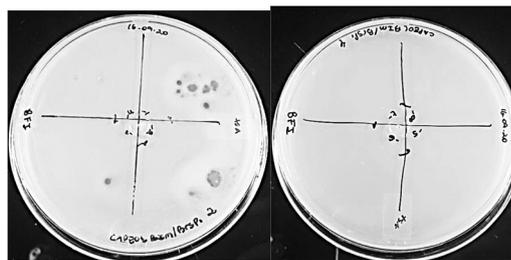
Figura 6. Teste de resistência cruzada na cepa de BOIJ02_BIM/BrSP1 5 ao fago 26F1



Fonte: Autora do trabalho.

Entre as três cepas BIMs selecionadas de CAPE01, duas foram sensíveis a ambos fagos, 8F1 e 26IF, sendo a CAPE01_BIM/BrSP1 4, assim como a BOIJ02 BIM 5, sensível apenas quando as diluições contendo concentrações mais altas de fagos foram aplicadas (Figura 7). Segundo Abedon e Yin (2009), o não aparecimento de placas de lise visíveis não necessariamente indicava a inviabilidade do fago. Dessa forma, outras alterações podem ter ocorrido de forma que apenas altas concentrações do fago permitiram ser visualizada as regiões de lise.

Figura 7. Teste de resistência cruzada na cepa de CAPE01_BIM/BrSP1 4 ao fago 8F1



Fonte: Autora do texto.

A CAPE01_BIM/BrSP1 1, foi resistente a ambos fagos, 8F1 e 26IF, indicando a ocorrência de resistência cruzada (Figura 8).

Figura 8. Teste de resistência cruzada na cepa CAPE01_BIM/BrSP1 1 aos fagos 8F1 e 26IF



Fonte: Autora do trabalho.

Bactérias desenvolveram diversos mecanismos para resistir a infecções de bacteriófagos. Em ambiente laboratorial, mutações nos receptores de cepas mutantes são os mais observados (LABRIE; SAMSON; MONEAU, 2010).

Tendo isso em vista, mutações nos receptores de membrana podem promover resistência a vários fagos que utilizam os mesmos receptores em seus processos de adsorção ou a diferentes receptores, porém que partilham de uma mesma via metabólica, fenômeno denominado de resistência cruzada (WRIGHT; FRIMAN; SMITH; BROCKHURST, 2018).

Assim, apesar de dois ou mais fagos não utilizarem o mesmo receptor, a síntese desses receptores pode estar ligada a uma mesma via metabólica e alterações nesta via pode gerar resistência cruzada (WRIGHT; FRIMAN; SMITH; BROCKHURST, 2018). Por exemplo, mutações causadas na via biossintética do LPS em mutantes resistentes de *E. coli* causaram resistência cruzada a dois fagos que utilizam regiões diferentes do LPS para adsorver, devido ao bloqueio da incorporação de alguns resíduos de glicose e heptose nessa estrutura (LENSKI, 1988). Portanto, as BIMs de CASM06 (2, 3 e 5), CAPE01 (1) e BOIJ02 (3 e 4), provavelmente conferiram mutações que afetaram genes da mesma via metabólica responsável pela constituição dos receptores utilizados pelos fagos BrSP1, 26F1, 8F1 e 26IF, promovendo a resistência cruzada; enquanto o restante das cepas mutantes selecionadas não tiveram alterações nos receptores usados por esses fagos.

A exposição sequencial dos fagos às cepas promove a aquisição de uma forte resistência cruzada naqueles que utilizam o mesmo receptor de membrana para seus processos de adsorção, uma vez que uma única mutação na via metabólica responsável pela constituição do receptor se altera (WRIGHT; FRIMAN; SMITH; BROCKHURST, 2019). Nesse sentido, a não ocorrência de resistência cruzada em todas as cepas CASM06_BIM/BrSP1 ao fago 26IF, e BOIJ02_BIM/BrSP1 ao fago 23F3, indica que os receptores utilizados para adsorção são diferentes e nenhum outro processo interno resultou em resistência, como, por

exemplo, o sistema imune adaptativo CRISPR-cas presente em algumas bactérias, inclusive em parte de cepas de *P. aeruginosa*, o qual cria memória do DNA viral invasivo e forma pequenas sequências chamados de espaçadores (CADY et al., 2011).

Tabela 2. Resultado do teste de microgotas para a resistência cruzada nas cepas de *P. aeruginosa* mutantes resistentes ao bacteriófago BrSP1 (BIMs). A cor verde indica que a cepa é sensível ao fago, a amarela, parcialmente sensível e a vermelha, resistente.

Cepa BIM	Bacteriófagos			
	8F1	23F23	26F1	26IF
CASM06 2	-*	-	Red	Green
CASM06 3	-	-	Red	Green
CASM06 4	-	-	Green	Green
CASM06 5	-	-	Red	Green
CASM06 6	-	-	Green	Green
BOIJ02 3	-	Green	Red	-
BOIJ02 4	-	Green	Red	-
BOIJ02 5	-	Green	Yellow	-
CAPE01 1	Red	-	-	Red
CAPE01 2	Green	-	-	Green
CAPE01 4	Yellow	-	-	Green

* (-) indica que o teste não foi realizado

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que os fagos 26F1, 8F1 e 26IF apresentaram resistência cruzada em cepas mutantes resistentes ao bacteriófago BrSP1 (tabela 2), devido a mutações espontâneas possivelmente resultantes de alterações nas vias metabólicas comuns para a constituição de seus receptores de membrana, já que também tiveram BIMs selecionadas que se mantiveram sensíveis a estes fagos.

Apesar disso, todos os fagos utilizados neste trabalho são candidatos à composição de coquetéis virais para o tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa* em animais. Embora não tenham sido sensíveis a todas as cepas, como o fago 23F3 nas cepas de BOIJ02_BIM/BrSP1 e 26IF nas cepas de CASM06_BIM/BrSP1, os quais possivelmente utilizam receptores de membranas diferentes do fago BrSP1, esses fagos podem ainda ser inseridos em um coquetel para ampliar a gama de hospedeiros a serem infectados, inclusive de forma preventiva ao aparecimento de cepas resistentes, como as que foram isoladas.

Apesar de terem se mostrado promíscuos para uso terapêutico, análises moleculares devem ser feitas para verificar em quais pontos do genoma bacteriano houve mutação, além de determinar quais receptores estes fagos utilizam e, também, quais foram afetados. A realização de ensaios para testar a adsorção dos fagos, os quais houve resistência cruzada,

promoveria um melhor entendimento do caráter da resistência, ou seja, se foi em decorrência a modificações ou perdas no receptor, ou outros processos moleculares internos.

6. REFERÊNCIAS

ABEDON, Stephen T.; YIN, John. Bacteriophage Plaques: theory and analysis. *Methods In Molecular Biology*, p. 161-174, 2009.

BRADLEY, D. E.; PITT, T. L.. Pilus-dependence of Four *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages with Non-contractile Tails. *Journal Of General Virology*, v. 24, n. 1, p. 1 - 15, 1 jul. 1974.

CADY, K. C.; WHITE, A. S.; HAMMOND, J. H.; ABENDROTH, M. D.; KARTHIKEYAN, R. S. G.; LALITHA, P.; ZEGANS, M. E.; O'TOOLE, G. A.. Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology*, v. 157, n. 2, p. 430-437, 1 fev. 2011.

FERNANDES, M.c.; RIBEIRO, M.g.; SIQUEIRA, A.k.; SALERNO, T.; LARA, G.h.b.; LISTONI, F.j.p.. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.

FILIPPOV, Andrey A.; SERGUEEV, Kirill V.; HE, Yunxiu; HUANG, Xiao-Zhe; GNADE, Bryan T.; MUELLER, Allen J.; FERNANDEZ-PRADA, Carmen M.; NIKOLICH, Mikeljon P.. Bacteriophage-Resistant Mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. *Plos One*, v. 6, n. 9, p. 1-11, 28 set. 2011.

FORDE, Amanda; FITZGERALD, Gerald F.. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 76, n. 1/4, p. 89-113, 1999.

HANLON, Geoffrey William. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, v. 30, n. 2, p. 118-128, 2007.

HARVEY, Hanjeong; BONDY-DENOMY, Joseph; MARQUIS, Hélène; SZTANKO, Kristina M.; DAVIDSON, Alan R.; BURROWS, Lori L.. Bacteria defend against phages through type IV pilus glycosylation. *Biorxiv*, p. 1-18, 15 jun. 2017.

HAWKINS, Catherine; HARPER, David; BURCH, David; ÄNGGÅRD, Erik; SOOTHILL, James. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Veterinary Microbiology*, v. 146, n. 3-4, p. 309-313, 2010.

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, 17 set. 2007.

HYMAN, Paul; ABEDON, Stephen T.. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. **Advances In Applied Microbiology**, p. 217-248, 2010.

KAZI, Mustafa; ANNAPURE, Uday S.. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 53, n. 3, p. 1355-1362, 26 out. 2015.

KIM, Tae-Hyun; SEBASTIAN, Shite; PINKHAM, Jessica T.; ROSS, Robin A.; BLALOCK, Leeann T.; KASPER, Dennis L.. Characterization of the O-antigen Polymerase (Wzy) of *Francisella tularensis*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27839-27849, 6 jul. 2010.

KORTRIGHT, Kaitlyn E.; CHAN, Benjamin K.; KOFF, Jonathan L.; TURNER, Paul E.. Phage Therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 219-232, fev. 2019

LABRIE, Simon J.; SAMSON, Julie E.; MOINEAU, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, 29 mar. 2010.

LAM, Joseph S.; TAYLOR, Véronique L.; ISLAM, Salim T.; HAO, Youai; KOCÍNCOVÁ, Dana. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. **Frontiers In Microbiology**, v. 2, p. 1-25, 2011.

LE, Shuai; YAO, Xinyue; LU, Shuguang; TAN, Yinling; RAO, Xiancai; LI, Ming; JIN, Xiaolin; WANG, Jing; ZHAO, Yan; WU, Nicholas C.. Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 28 abr. 2014.

LENSKI, Richard E.. EXPERIMENTAL STUDIES OF PLEIOTROPY AND EPISTASIS IN *ESCHERICHIA COLI*. I. VARIATION IN COMPETITIVE FITNESS AMONG MUTANTS RESISTANT TO VIRUS T4. **Evolution**, v. 42, n. 3, p. 425-432, maio 1988.

LI, Gang; SHEN, Mengyu; YANG, Yuhui; LE, Shuai; LI, Ming; WANG, Jing; ZHAO, Yan; TAN, Yinling; HU, Fuquan; LU, Shuguang. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Phage PaP1 Predation via O-Antigen Polymerase Mutation. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 1 jun. 2018.

LISTER, Philip D.; WOLTER, Daniel J.; HANSON, Nancy D.. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, out. 2009.

LOPES, Anny Caroline Costa; SILVA, Carina Assis Lima; OLIVEIRA, Jeisiane Souza; ALVES, Jorianne Thyessa Castro. Fatores de risco para infecção por pseudomonas aeruginosa em relação a infecções hospitalares. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 1, p. 2121-2130, 2020.

LOUREIRO, Rui João; ROQUE, Fátima; RODRIGUES, António Teixeira; HERDEIRO, Maria Teresa; RAMALHEIRA, Elmano. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, jan. 2016.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; STAHL, David A.; FONSECA, Flávio Guimarães da. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016. 1032 p.

MAKIN, S A; BEVERIDGE, T J. Pseudomonas aeruginosa PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolysaccharide at 45 degrees C. **Journal Of Bacteriology**, v. 178, n. 11, p. 3350-3352, 1996.

MELO, Anna Cristhina Carmine de; GOMES, Amanda da Mata; MELO, Fernando L.; ARDISSON-ARAÚJO, Daniel M. P.; VARGAS, Agueda Palmira Castagna de; ELY, Valessa Lunkes; KITAJIMA, Elliot W.; RIBEIRO, Bergmann M.; WOLFF, José Luiz Caldas. Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from domestic animals. **Bmc Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 17 jun. 2019.

MINGRONE, Roberta Cristina C. Caracterização de bacteriófagos Infectando Isolados Clínicos de Pseudomonas aeruginosa Armazenados em uma Coleção de Cultura. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) - Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, São Paulo, 2011.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd H. A.. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-28, 15 fev. 2017

MULFORD, C. A.; OSBORN, M. J.. An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of Salmonella typhimurium. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 80, n. 5, p. 1159-1163, 1 mar. 1983.

NILSSON, Anders S.. Phage therapy—constraints and possibilities. **Upsala Journal Of Medical Sciences**, v. 119, n. 2, p. 192-198, 2014.

ONG, Soo Peng; AZAM, Aa Haeruman; SASAHARA, Teppei; MIYANAGA, Kazuhiko; TANJI, Yasunori. Characterization of Pseudomonas lytic phages and their application as a cocktail

with antibiotics in controlling *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 693-699, jun. 2020.

PILLON, Monica C.; LORENOWICZ, Jessica J.; UCKELMANN, Michael; KLOCKO, Andrew D.; MITCHELL, Ryan R.; CHUNG, Yu Seon; MODRICH, Paul; WALKER, Graham C.; SIMMONS, Lyle A.; FRIEDHOFF, Peter. Structure of the Endonuclease Domain of MutL: unlicensed to cut. **Molecular Cell**, v. 39, n. 1, p. 145-151, jul. 2010

POURCEL, Christine; MIDOUX, Cédric; VERGNAUD, Gilles; LATINO, Libera. The Basis for Natural Multiresistance to Phage in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 1-21, 18 jun. 2020.

RAKHUBA, D.V.; KOLOMIETS, E.I.; DEY, E. Szwajcer; NOVIK, G.I.. Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. **Polish Journal Of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145-155, 4 jul. 2010.

ROSTØL, Jakob T.; MARRAFFINI, Luciano. (Ph)ighting Phages: how bacteria resist their parasites. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 184-194, fev. 2019.

SHEN, Mengyu; ZHANG, Huidong; SHEN, Wei; ZOU, Zhenyu; LU, Shuguang; LI, Gang; HE, Xuesong; AGNELLO, Melissa; SHI, Wenyan; HU, Fuquan. *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 9, p. 4505-4514, 5 mar. 2018.

SILVA, Juliano Bertozzi; STORMS, Zachary; SAUVAGEAU, Dominic. Host receptors for bacteriophage adsorption. **Fems Microbiology Letters**, v. 363, n. 4, p. 1-9, 10 jan. 2016.

SORENSEN, M. C. H.; VAN ALPHEN, L. B.; HARBOE, A.; LI, J.; CHRISTENSEN, B. B.; SZYMANSKI, C. M.; BRONDSTED, L.. Bacteriophage F336 Recognizes the Capsular Phosphoramidate Modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. **Journal Of Bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6742-6749, 30 set. 2011

TRUDELLE, Danielle M.; BRYAN, Daniel W.; HUDSON, Lauren K.; DENES, Thomas G.. Cross-resistance to phage infection in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a mutants. **Food Microbiology**, v. 84, p. 1-7, dez. 2019.

VALOT, Benoît; GUYEUX, Christophe; ROLLAND, Julien Yves; MAZOUZI, Kamel; BERTRAND, Xavier; HOCQUET, Didier. What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 11 maio 2015.

YANG, Yuhui; SHEN, Wei; ZHONG, Qiu; CHEN, Qian; HE, Xuesong; BAKER, Jonathon L.; XIONG, Kun; JIN, Xiaoling; WANG, Jing; HU, Fuquan. Development of a Bacteriophage

Cocktail to Constrain the Emergence of Phage-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Frontiers In Microbiology, v. 11, p. 327-338, 2020.

WRIGHT, Rosanna C. T.; FRIMAN, Ville-petri; SMITH, Margaret C. M.; BROCKHURST, Michael A.. Cross-resistance is modular in bacteria–phage interactions. **Plos Biology**, v. 16, n. 10, p. 1-22, 2018.

WRIGHT, Rosanna C. T.; FRIMAN, Ville-Petri; SMITH, Margaret C. M.; BROCKHURST, Michael A.. Resistance Evolution against Phage Combinations Depends on the Timing and Order of Exposure. **Mbio**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 24 set. 2019.

Contatos: karen_dallaqua@hotmail.com e joseluiz.wolff@mackenzie.br