

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATHEUS LUCA CAROTTA GABRIEL

**ANÁLISE DA REPLICAÇÃO DE FAGOS QUE INFECTAM *Pseudomonas*
aeruginosa NA PRESENÇA DE MUCINA**

ALFENAS/MG

2025

MATHEUS LUCA CAROTTA GABRIEL

ANÁLISE DA REPLICAÇÃO DE FAGOS QUE INFECTAM *Pseudomonas aeruginosa* NA PRESENÇA DE MUCINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado como critério de conclusão do curso Bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Gabriel, Matheus Luca Carotta.

Análise da replicação de fagos que infectam *Pseudomonas aeruginosa* na presença de mucina. / Matheus Luca Carotta Gabriel. - Alfenas, MG, 2025. 41 f. : il. -

Orientador(a): Luiz Felipe Leomil Coelho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025. Bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Fagoterapia. 3. Mucosa. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil, orient. II. Título.

MATHEUS LUCA CAROTTA GABRIEL

ANÁLISE DA REPLICAÇÃO DE FAGOS QUE INFECTAM *Pseudomonas aeruginosa* NA PRESENÇA DE MUCINA

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do(a) Trabalho de Conclusão de Curso/Dissertação/Tese apresentado(a) como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel/Licenciado/Mestre/Doutor em 11 de Dezembro de 2025 pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 11 de Dezembro de 2025

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
LUIZ FELIPE LEOMIL COELHO
Data: 19/12/2025 08:26:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alessandro Vieira Ferreira
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. Mateus de Souza Terceti
Universidade de São Paulo

Assinatura:

Dedico este trabalho a minha esposa, Thayana Dutra de Andrade, que me mostrou que poderíamos alcançar espaços onde nunca antes estivemos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela sabedoria que me foi concedida durante essa trajetória. Agradeço a minha família pelo incentivo em sempre buscar o caminho correto e da honestidade, principalmente minha avó Maria Aparecida de Fátima Carotta. Agradeço ao meu irmão Pablo Rafael Carotta por ser meu apoio durante os momentos difíceis durante toda a graduação.

De maneira especial agradeço minha esposa, Thayana Dutra de Andrade, que não mediu esforços para que a minha graduação fosse concluída, me incentivando sempre a buscar meu máximo, independente de quão árduo este caminho fosse. Tenho o privilégio de conviver todos os dias com a minha maior inspiração acadêmica e também de caráter, disciplina e coragem. Junto a isto, gostaria de agradecer a minha sogra, Maria de Fátima Dutra Andrade, por todo apoio e por acreditar desde o princípio nos meus sonhos. Agradeço também aos meus camaradas Pedro Oliveira Felipe e Cainã Miranda, pelas trocas de experiências e incentivo durante estes anos.

Agradeço ao Laboratório de Vacinas, onde tive a oportunidade de realizar iniciações científicas e, portanto, evoluir, me desenvolver profissionalmente, e ter contato com profissionais extremamente capacitados e referências. Sempre irei carregar em meu coração os experimentos realizados, o apoio de meus colegas, os congressos apresentados, e tudo que de alguma forma me trouxeram a ser biotecnologista. Nesse sentido, agradeço a todos os colegas de laboratório, em especial a Giovana Soares Marangoni, minha companheira de turma, com quem pude partilhar angústias, medos e experimentos, e também a Gustavo. Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, que me concedeu a oportunidade de ser monitor da disciplina de Tecnologia de Vacinas, onde criamos uma grande amizade.

Minha eterna gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, exemplo de professor e pesquisador, que me recebeu de braços abertos, e muito mais que um orientador, se tornou um grande amigo, no qual tenho a honra de trabalhar. Sou extremamente grato por todos os ensinamentos, lições, puxões de orelha, conversas, conselhos e principalmente, por ter acreditado na minha capacidade e no meu desenvolvimento como pesquisador.

Agradeço ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Alfenas, no papel de todos seus colaboradores, que foram primordiais para

realização deste trabalho.

Finalmente, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e às agências de fomento de forma geral, pela bolsa concedida para a realização do projeto de pesquisa.

É necessário sempre acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite e você truta, é imbatível. Que o tempo ruim vai passar é só uma fase e o sofrimento alimenta mais a sua coragem. Que a sua família precisa de você, lado a lado se ganhar, pra te apoiar se perder.

(Racionais MCs, 2002)

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa patogênica que acomete indivíduos imunossuprimidos com fibrose cística, carcinomas ou queimaduras. Devido à ineficácia dos antibióticos frente às cepas multirresistentes, a fagoterapia tem demonstrado resultados promissores em ensaios clínicos contra infecções bacterianas. Otimizar o isolamento de fagos com potencial proteção de mucosas infectadas, possibilita a criação de medidas profiláticas, sanitizantes e formulações terapêuticas. O estudo buscou desenvolver uma metodologia de triagem *in vitro*, utilizando como controle bacteriófagos fenotipicamente conhecidos, VAC1.1 não ligante e VAC3.1 ligante a mucina, desta maneira classificando bacteriófagos líticos com replicação diferencial frente à esta glicoproteína que compõe o muco. A cepa de *P. aeruginosa* PA14 foi incubada e utilizada como hospedeiro para os fagos controles, em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1, utilizando caldo Luria Bertani (LB) 0,5× em mucina 0,5%, concentração definida por apresentar alteração fenotípica significativa e aumento das UFC/mL bacteriana. Diante disto, com os testes estatísticos realizados com os controles, foi determinado que fagos ligantes, seriam aqueles que apresentam aumento biológico significativo de 3 casas logarítmicas na UFP/mL frente ao controle com ausência de mucina. Portanto, através deste teste diferencial, foi possível isolar 5 fagos com replicação diferencial em mucina, sendo eles VAC1.1.1.1, VAC2.2, VAC 8.1 e VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, determinando sua viabilidade e efetividade para usos em trabalhos posteriores para isolar bacteriófagos de interesse. Dessa forma, conclui-se que, esta metodologia *in vitro* permitiu a classificação dos bacteriófagos de acordo com sua ligação à mucina de maneira eficaz. A identificação e classificação de bacteriófagos é importante para compreensão da interação fago-mucosa e para o uso racional da fagoterapia frente a infecções por *P. aeruginosa* e outras bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; Fagoterapia; Mucosa.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a pathogenic Gram-negative bacterium that affects immunosuppressed individuals with cystic fibrosis, carcinomas, or burn injuries. Due to the inefficacy of antibiotics against multidrug-resistant strains, phage therapy has shown promising results in clinical trials against bacterial infections. Optimizing the isolation of phages with potential to protect infected mucosal surfaces enables the development of prophylactic measures, sanitizing agents, and therapeutic formulations. The study aimed to develop an in vitro screening methodology using phenotypically characterized control bacteriophages—VAC1.1, a non-binding phage, and VAC3.1, a mucin-binding phage—thus allowing the classification of lytic bacteriophages with differential replication in the presence of this glycoprotein that composes mucus. The *P. aeruginosa* PA14 strain was incubated and used as the host for the control phages at a multiplicity of infection (MOI) of 1, using 0.5× Luria-Bertani (LB) broth supplemented with 0.5% mucin, a concentration selected for producing significant phenotypic alteration and increased bacterial CFU/mL. Given this, through statistical tests conducted with the controls, it was determined that binding phages would be those that show a significant biological increase of 3 logarithmic units in PFU/mL compared to the control without mucin. Through this differential assay, five mucin-binding phages were isolated, VAC1.1.1.1, VAC2.2, VAC8.1, VAC2.1.1.1, and VAC2.1.2.1, demonstrating their viability and effectiveness for future studies aimed at isolating phages of interest. Thus, this in vitro methodology enabled the effective classification of bacteriophages according to their mucin-binding capacity. Identifying and classifying bacteriophages is important for understanding phage–mucus interactions and for the rational use of phage therapy against infections caused by *P. aeruginosa* and other multidrug-resistant bacteria

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Phagotherapy; Mucosa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em caldo LB 0,5× com diferentes concentrações de mucina (0,1%,0,5%, 1%) e sem mucina.....	26
Figura 2 - Títulos dos bacteriófagos VAC1.1 e VAC3.1 em UFP/mL.....	27
Figura 3 - Razão dos títulos dos bacteriófagos de interesse com VAC1.1 e VAC3.1 como controles.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.1.2	Objetivos Específicos.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	PATÓGENOS ESKAPE E A CRISE GLOBAL DA RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA.....	15
3.1.1	Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	16
3.1.2	Tratamentos convencionais e alternativos.....	18
3.2	TERAPIA FÁGICA.....	19
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA14) EM MEIO LURIA BERTANI 0,5× COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MUCINA.....	23
4.2	ANÁLISE DO POTENCIAL LÍTICO DOS bacteriófagos VAC1.1 E VAC3.1 EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA PRESENÇA DE MUCINA.....	23
4.3	APLICABILIDADE DO TESTE DIFERENCIAL NOS BACTERIÓFAGOS VAC1.1.1.1, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC2.2, VAC5.2, VAC8.1, VAC10.1, VAC12.4 E VAC13.1.....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MUCINA.....	25
5.2	AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DOS FAGOS COM A PRESENÇA DE MUCINA.....	27
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos é uma das principais formas de reduzir infecções bacterianas patogênicas devido ao seu custo baixo e praticidade de aplicação (Bassetti *et al.*, 2018). Porém, seu uso constante está relacionado ao surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos (MDR), que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a adotar medidas fiscalizadoras, como a criação do grupo ESKAPE. Esse grupo é composto por bactérias de importância clínica que apresentam fenótipos MDR e os componentes desse grupo constituem o *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. Essas bactérias são monitoradas devido ao risco iminente à saúde pública mundial por conta de sua resistência antibiótica, tornando necessário a criação de vias de combate a esses microrganismos (Miller; Arias, 2024).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa patogênica, que possui maior capacidade de infecção crônica e aguda sobre indivíduos imunossuprimidos, que possuem fibrose cística, acometidos por carcinomas ou queimaduras graves (Bassetti *et al.*, 2018). Essa infecção no hospedeiro ocorre devido às suas características morfológicas facilitadas pela formação de biofilmes, formando exopolissacarídeos e matriz extracelular que predispõe a evasão imunológica e resistência antimicrobiana (RAM) às principais classes de antibióticos utilizados no tratamento, como carbapenêmicos e polimixina, resultando em cepas multirresistentes (Jurado-Martín; Sainz-Mejías; McClean, 2021).

Devido à ineficácia de medicamentos em combater infecções de cepas MDR de *Pseudomonas aeruginosa*, medidas alternativas como a fagoterapia, que consiste no uso de bacteriófagos para lise bacteriana, demonstraram resultados promissores na literatura em relatos de casos e ensaios clínicos contra infecções bacterianas (Nikolic *et al.*, 2022; Suh *et al.*, 2022). Atualmente agências sanitárias, como a *Food and Drug Administration* (FDA), classificaram a fagoterapia como investigação emergencial e último recurso em casos clínicos contra bactérias multirresistentes (MDR), incentivando iniciativas globais para criação de um marco regulatório para implementação da fagoterapia como uma nova alternativa aos tratamentos convencionais a base de antibiótico, além de pesquisas sobre produtos, qualidade e

segurança em torno do uso dos bacteriófagos (Furfaro; Payne; Chang, 2018).

A superfície de mucosa que recobre os tecidos epiteliais é uma das principais barreiras de proteção e retenção ao acesso de agentes patogênicos. O muco, majoritariamente formado pelas glicoproteínas mucinas, é um local ideal para interação de bacteriófagos aderentes às mucinas e bactérias patogênicas oportunistas como a *P. aeruginosa* (Barr *et al.*, 2013). O modelo de adesão de bacteriófagos ao muco (BAM), demonstra que esses bacteriófagos ligantes à mucina atuam como camada protetora de defesa antimicrobiana e que quando ocorre o aumento dessa glicoproteína no muco, por mais que ocorra aumento da proliferação bacteriana, há também um aumento na eficiência de infecção desses bacteriófagos (Almeida *et al.*, 2022). Nesse sentido, busca-se compreender a interação dos bacteriófagos infectantes de *P. aeruginosa* com a mucina, de maneira a desenvolver um método capaz de identificar aqueles que possuem melhor ligação com a proteína, para que futuramente possam ser utilizados em tratamentos *in vivo* mais eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia de triagem para identificação de bacteriófagos líticos com a capacidade de replicação diferenciada na presença de mucina.

2.1.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar a replicação dos bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* na presença e na ausência de mucina;
- b) Avaliar se a mucina influencia significativamente o título viral após 24 horas de infecção bacteriana;
- c) Comparar o comportamento de diferentes fagos frente à mucina, identificando aqueles que apresentam maior variação de replicação;
- d) Verificar a consistência dos resultados por meio de análises estatísticas apropriadas;
- e) Validar o protocolo experimental proposto como metodologia de triagem preliminar para seleção de fagos que apresentem modulação de replicação em presença de mucina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PATÓGENOS ESKAPE E A CRISE GLOBAL DA RESISTÊNCIA ANTIBIÓTICA

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, determinou o início da era dos antibióticos, possibilitando o tratamento contra infecções bacterianas e iniciando diversas pesquisas e desenvolvimento industrial na área (Ventola, 2015). Posteriormente diversos outros antibióticos foram descobertos e o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos é um efeito natural, quando determinado microorganismo evolui e adquire mecanismos para escapar dos antibióticos (Gaubá; Rahman, 2023). Isto acontece através de processos complexos, e atividades como a automedicação, o uso indiscriminado de antibióticos e a exposição a infecções hospitalares têm contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes (MDR) (Davies, 2010).

Os patógenos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) pertencem a uma lista proposta por Rice (2008) de patógenos causadores de infecções hospitalares e oficialmente adotada pela OMS em 2017 (Tacconelli *et al.*, 2018; Gaubá; Rahman, 2023). A lista procura destacar os microrganismos pelos quais o desenvolvimento e pesquisa de novos antibióticos e tratamentos é urgente, tendo em vista a alta ocorrência clínica de resistência (Denissen *et al.*, 2022).

As bactérias ESKAPE têm como principais mecanismos de evasão ao tratamento, a inativação e/ou alteração das drogas, modificações estruturais nos sítios de ligação aos fármacos, alterações de permeabilidade e formação de biofilmes (Tacconelli *et al.*, 2018). Em relação aos mecanismos de evasão, a inativação ou alteração das drogas ocorre pelas enzimas β -lactamases, utilizadas como a principal defesa contra antibióticos como penicilina, carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactams. Esta enzima possui como característica a capacidade de modificar através da hidrolização do anel β -lactâmico, que ocasiona a quebra da ligação amida, inativando sua atuação sobre a síntese da parede celular da bactéria e impedindo a lise osmótica (Vrancianu *et al.*, 2020).

Outro mecanismo de evasão dos microrganismos do grupo ESKAPE é a formação de biofilmes. O biofilme é constituído por uma matriz polimérica extracelular (EPS) formada por ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos

liberados no agrupamento organizado e funcional de bactérias. É uma matriz utilizada para proteção e controle de pH e temperaturas extremas, alta pressão e salinidade, além de agentes externos, como antibióticos e bacteriófagos (Wang *et al.*, 2021). A formação de biofilmes é dividida em cinco etapas: fixação em superfícies abióticas e bióticas; colonização através da reprodução bacteriana; desenvolvimento, quanto há a secreção das EPS; maturação, quando há formação de canais organizados para dispersão de nutrientes no biofilme; por fim, dispersão ativa das colônias aglomeradas por fatores externos ou internos (Yin *et al.*, 2019; Sauer *et al.*, 2023).

A resistência bacteriana a antibióticos é um crescente desafio para garantir a saúde pública global, devido à diminuição da eficácia dos tratamentos médicos convencionais, tornando necessária a urgência no desenvolvimento de novas estratégias e medidas de prevenção (Tacconelli *et al.*, 2018). Novas tecnologias, tais como o uso de bacteriófagos, vêm sendo amplamente estudadas (Furfaro; Payne; Chang, 2018). Patil *et al.* (2021), destaca vantagens do uso dos bacteriófagos frente ao uso de antibióticos, como uma menor toxicidade, melhor especificidade aos patógenos, além da degradação dos biofilmes. O nome bacteriófago foi criado em 1917, quando o microbiologista Felix d'Herelle observou a atividade bacteriolítica, apesar desta ter sido observada anteriormente, mas não associada aos pequenos vírus (Roux, 1917). Nesse contexto, foram preparadas soluções contendo fagos e utilizadas como tratamento com sucesso nos anos 1930, antes mesmo da descoberta dos antibióticos (Strathdee *et al.* 2024).

3.1.1 Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa patogênica que possui a capacidade de causar infecções agudas e crônicas, devido aos seus fatores de virulência (Bassetti *et al.*, 2018). Considerando as infecções hospitalares, esse patógeno nosocomial contribui para aumento da mortalidade, morbidade e custo de tratamento devido sua prevalência de incidência nos casos clínicos, principalmente em pacientes da unidade de terapia intensiva (Schwartz *et al.*, 2024). Essa bactéria possui características que a garantem uma grande versatilidade, como a alta adaptabilidade, mutagenicidade, grande diversidade de fatores de virulência e alta transferência de resistência bacteriana (Sánchez; Rua; Pozo, 2023).

A presença de *P. aeruginosa* também pode ser identificada e isolada em equipamentos hospitalares, como cateter, macas, jalecos e respiradores, aumentando a chance de contaminação do paciente (Schwartz *et al.*, 2024). Esse patógeno pode ser comumente encontrado nas mucosas ou barreiras cutâneas de pacientes com queimaduras graves, fibrose cística, que passaram por procedimentos de ventilação mecânica invasivas ou não, trato urinário e imunocomprometidos (Lister; Wolter Hanson, 2009). Segundo Jurado-Martín *et al.* (2021), os principais mecanismos que garantem essa patogenicidade são a sua capacidade de formação de biofilme altamente resistente a antibióticos, sistema de secreção de efetores tóxicos, sistema de detecção quórum e sua composição de membrana externa.

Em humanos, *P. aeruginosa* possui a capacidade de colonizar a maioria dos tecidos do corpo, principalmente quando há brechas nas primeiras linhas de defesa do corpo, como a pele e mucosas, ou em indivíduos com predisposição genética e com características específicas de estilo de vida. Na fibrose cística (FC), uma patologia causada pela disfunção do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), há uma má funcionalidade das glândulas exócrinas, acarretando como consequência a produção de um muco mais espesso, possibilitando infecções com patógenos oportunistas como a *P. aeruginosa* (Corradi; Vergani; Tieleman, 2015).

Ainda em lesões térmicas, sejam leves ou graves, ocorre a necrose tecidual, deixando o indivíduo imunologicamente suscetível a infecções bacterianas, como causada por *P. aeruginosa* (Mahar *et al.*, 2010). Segundo Jault *et al.* (2019), essa infecção pode levar o paciente a sepse, principalmente pelas causadas por cepas de multirresistentes aos antibióticos mais comumente usados, o que torna necessário o desenvolvimento de vias terapêuticas, como o uso de coquetéis de bacteriófagos para tratamentos clínicos.

Além disso, as infecções por *P. aeruginosa* estão relacionadas à pneumonia associada à ventilação mecânica (VAPM) (Guillon *et al.*, 2021; Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). O tempo de exposição prolongada à ventilação mecânica na unidade de tratamento intensiva aumenta a possibilidade de infecção bacteriana. Foucrier *et al.* (2023), destacou que o uso de medidas profiláticas como a assepsia dos materiais cirúrgicos utilizados e a antibioticoterapia específica para o caso clínico auxiliam na redução principalmente de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. Contudo,

mesmo com a utilização dessas medidas, uma terapia combinada de antibióticos de amplo espectro, como o uso β -lactâmicos, cefalosporina antipseudomonas e aminoglicosídeo muitas vezes se faz necessária (Foucrier *et al.*, 2023).

No trato urinário, infecções por *P. aeruginosa* costumam ocorrer em pacientes que sofreram manipulação urológica ou uropatia obstrutiva. Seu crescimento está relacionado ao microambiente proporcionado pelo pH urinário, osmolaridade da urina, íons de ferro liberados durante a urina, proteína de Tamm-Horsfall (PTH) (Newman; Floyd; Fothergill, 2017). A infecção causa febre, dor ao urinar e sangramento na urina, em casos mais graves pode ocorrer a pielonefrite e evolução para casos de septicemia. Atualmente, para o tratamento de infecções urinárias, o uso convencional de antibióticos é recomendado para os pacientes, porém, este método pode gerar cepas multirresistentes. Isso abre espaço para busca de outras formas de tratamentos, como o uso de bacteriófagos, cujo mecanismo participa da produção da alginase e outras enzimas, degradando o alginato e exopolissacarídeos presentes nos biofilmes, fazendo a lise da célula bacteriana e expondo as sobreviventes para a ação de antibióticos (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

3.1.2 Tratamentos convencionais e alternativos

A principal forma de tratamento convencional utilizada atualmente para *P. aeruginosa* é baseada no emprego de antibióticos. Porém, devido a fatores morfológicos, bioquímicos e o surgimento de cepas multirresistentes, essa forma de tratamento tem se tornado menos eficiente (Chatterjee *et al.*, 2016).

Diversas classes de antibióticos são utilizadas no tratamento desta bactéria, e cada uma dessas possui uma diferente ação antimicrobiana. Sua aplicação varia segundo o quadro da infecção no paciente (Delcour *et al.*, 2009). Dentre esses antibióticos utilizados, os β -lactâmicos como penicilina, cefalosporinas e carbapenêmicos são os comumente aplicados para tratamentos. Esses antibacterianos adentram a membrana externa através das porinas, agindo na síntese do peptidoglicano e bloqueando a biossíntese da parede celular. Por outro lado, diversas cepas de *P. aeruginosa* apresentaram enzimas como penicilinases, amp-C β -lactamases, entre outros, concedendo resistência a esses antibióticos (Lambert *et al.*, 2002).

Devido a multirresistência de cepas de *P. aeruginosa*, diversas técnicas vêm

sendo testadas. Estratégias são frequentemente estudadas para promover o controle deste patógeno oportunista em infecções clínicas (Reig *et al.*, 2017). Segundo Ramalingam *et al.* (2016), o uso das nanopartículas (NPs) de prata pode ser considerado uma boa alternativa para a inibição do crescimento de *P. aeruginosa* devido à alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana, possibilitando a lise celular (Ramalingam *et al.*, 2016; Al-Momani *et al.*, 2023; Tabassaum *et al.*, 2024). Tendo em vista a necessidade de ferro para o crescimento bacteriano, substâncias quelantes de ferro vêm sendo utilizadas para limitar a concentração de ferro no microambiente ou interromper a absorção do mesmo (O'may *et al.*, 2009).

O *quorum sensing* é definido como um mecanismo químico, no qual as bactérias regulam-se coletivamente. Isso acontece mediante moléculas sinalizadoras, mais especificamente lactonas homoserinas (HSLs) nas bactérias Gram-negativas (Rutherford; Bassler, 2012). Portanto, a produção de inibidores de *quorum sensing*, naturais ou sintéticos, também tem sido uma estratégia estudada (O'loughlin *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2024; Yan *et al.*, 2024).

Outro tratamento alternativo para a *P. aeruginosa* é a terapia fágica ou fagoterapia. Esse tratamento consiste no uso de bacteriófagos para redução do biofilme bacteriano e surgiu como o primeiro tratamento efetivo contra infecções bacterianas, porém, com o descobrimento da penicilina e posteriormente de outros antibióticos, trabalhos sobre esses agentes infecciosos com potencial antimicrobiano foram reduzidos (Luong *et al.*, 2020). Atualmente, o interesse na fagoterapia foi renovado, existem diversos testes *in vitro*, *in vivo* e relatos de casos, que comprovam sua efetividade e aplicabilidade não apenas como um tratamento alternativo, mas também como um tratamento conjugado com o uso de antibióticos ou inibidores de *quorum sensing* (Vandenheuvel *et al.*, 2015).

3.2 TERAPIA FÁGICA

Devido ao surgimento de cepas multirresistentes a antibióticos de patógenos oportunistas, a terapia fágica vêm sendo explorada como tratamentos alternativos de último recurso para inibir o avanço de infecções bacterianas em pacientes imunossuprimidos (Suh *et al.*, 2022).

Os bacteriófagos foram descritos pela primeira vez em 1917 por Félix d'Herelle. Os fagos possuem a capacidade de gerar morte bacteriana com

especificidade e podem ser encontrados em amostras ambientais onde esteja presente a bactéria hospedeira (Chanishvili *et al.*, 2012). A terapia fágica consiste no uso desses bacteriófagos como forma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas agudas e crônicas, quando o uso dos métodos convencionais, como antibióticos, não possuem a capacidade efetiva (Strathdee *et al.* 2024).

Os bacteriófagos são parasitas intracelulares obrigatórios e podem ser classificados quanto à sua morfologia e seu ciclo de vida, podendo ser líticos ou temperados (Weinbauer *et al.*, 2004). A morfologia dos bacteriófagos no ambiente pode ser muito diversificada devido a sua expressão fenotípica e genotípica. Eles podem ser definidos conforme o material genético, capsídeo e tipo de cauda (Hatfull *et al.*, 2022). Os capsídeos, podem possuir diversos formatos como icosaédricos, cilíndricos como bacteriófagos da família *Myoviridae*, hexagonal, complexa como os bacteriófagos λ (Pope *et al.*, 2011). O material genético dos bacteriófagos podem ser DNA de cadeia simples (ssDNA), RNA e o mais frequentemente encontrado, DNA dupla fita (dsDNA) (Hatfull *et al.*, 2020).

Os bacteriófagos de ordem *Caudovirale*, segundo Ackermann *et al.* (2007) podem representar 96% dos bacteriófagos presentes no meio ambiente (Ackermann *et al.*, 2007) e são divididos conforme a morfologia da cauda em três famílias: *Podoviridae*, que possuem uma cauda curta, de exemplo o bacteriófago T7; *Siphoviridae* que possuem caudas com estruturas longas e não contrátil e *Myoviridae* que possui caudas longas contráteis (Zinke *et al.*, 2021).

A terapia fágica utiliza bacteriófagos líticos, devido aos bacteriófagos lisogênicos agregarem seu material genético à bactéria (Clokier *et al.*, 2011). Os bacteriófagos líticos possuem a capacidade de lise bacteriana e a liberação da progênie, diferente dos temperados, que estabelecem a lisogenia, inativando o gene de crescimento lítico, integrando o genoma ao cromossomo do hospedeiro durante a replicação (Strathdee *et al.*, 2023).

Em diversos estudos *in vitro*, o uso da fagoterapia no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* combinada com antibiótico, é capaz de reduzir significativamente a formação de biofilme deste patógeno, possibilitando a sensibilização e susceptibilidade da parede celular microbiana em casos de cepas multirresistentes (Nikolic *et al.*, 2022). Porém, pré-testes ainda são necessários para avaliar a interação de coquetéis de bacteriófagos e antibióticos, tendo em vista que alguns fármacos, de exemplo a colistina, interfere na LPS bacteriana, impedindo a produção

de vírions e a ação lítica dos bacteriófagos diminuindo sua efetividade em infecções clínicas (Corral *et al.*, 2023).

Tkhilaishvili *et al.*, demonstrou em seu trabalho que o antibiótico ciprofloxacina ao ser vinculado a um coquetel de bacteriófagos, mesmo em concentrações altas, foi capaz de reduzir o biofilme bacteriano conjugado de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sem atrapalhar o ciclo viral, abrindo possibilidades para futuros trabalhos que associam a ação sinérgica entre o fármaco e o bacteriófago (Tkhilaishvili *et al.*, 2020).

A fagoterapia também pode ser aplicada conjugada com inibidores de *quorum sensing*. Hoyland-Kroghsbo *et al.* (2017) em seu trabalho bem-sucedido, utilizou o composto químico inibidor “baicaleína” com a fagoterapia na cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Seu propósito era inibir esse sistema de comunicação do sistema imunológico adaptativo CRISPR-Cas, possibilitando a ação do bacteriófago contra esta cepa.

A fagoterapia pode ser aplicada em queimaduras para impedir o avanço de infecções bacterianas por *P. aeruginosa*, principal causa de sepse de pacientes acometidos. Prokopchuk *et al.* (2023), em um estudo controlado em um teste *in vivo* utilizando camundongos com queimaduras, apresentou resultados promissores utilizando o bacteriófago filamentosso eSI-Pf-tdTomato para inibir o crescimento bacteriano nas feridas. Em outro estudo, Jault *et al.* (2019), utilizando um coquetel de bacteriófagos aplicado em 220 pacientes de diversos hospitais na Bélgica e França, demonstrou que este tratamento diminui a infecção bacteriana, porém de forma mais gradual em relação ao tratamento convencional utilizando o creme de sulfadiazina de prata.

Em pacientes com fibrose cística, a fagoterapia também pode ser uma solução para tratar infecções causadas por *P. aeruginosa*. Cafora *et al.* (2019) utilizando o modelo *in vivo* zebrafish com fibrose cística, determinou que a fagoterapia foi capaz de tratar a infecção bacteriana e a impedir a morte dos modelos experimentais.

No tratamento do trato urinário com infecções bacterianas por *P. aeruginosa*, Leitner *et al.* (2020) em um estudo com 113 pacientes divididos em 3 grupos experimentais, placebos, uso de antibióticos e terapia fágica, destaca que foi possível reduzir a infecção, porém, era necessário o aumento das concentrações de bacteriófagos presentes.

Quanto a infecções presentes durante procedimentos de ventilação mecânica. Guillon *et al.* (2021), apresenta em seu trabalho, resultados promissores na redução de infecção por *P. aeruginosa in vivo*, utilizando um modelo experimental suíno, a partir da entrega de bacteriófagos por meio de nebulizadores durante o procedimento de ventilação mecânica.

O muco, composto principalmente de glicoproteínas mucina, desempenha uma das principais barreiras seletivas de organismos e é essencial para o sistema imunológico inato. Sua função é revestir células epiteliais, formando uma malha de mucina, que concede proteção de áreas expostas ao ambiente externo e a patógenos para a maioria dos metazoários (Bakshani *et al.*, 2018). Porém, alterações na sua produção de mucina, o fazem desempenhar papel antagônico, como aumento de infecções bacterianas, acometimentos médicos e alterações nos mecanismos biofísicos ao impedir a difusão de partículas (Lieleg *et al.*, 2010).

O modelo de aderência de bacteriófagos ao muco (BAM) é caracterizado pela ligação específica de fagos a glicoproteínas da mucina via domínios estruturais homólogos a imunoglobulinas, localizados no capsídeo viral (Barr *et al.*, 2013). A adesão dos fagos, induz a formação de uma interface antimicrobiana na camada mucosa, que atua como filtro seletivo, inibindo a adesão bacteriana e subsequente formação de biofilmes patogênicos. Esse mecanismo favorece o equilíbrio da microbiota e impede que patógenos potencialmente perigosos se estabeleçam e causem danos ao organismo (Ng *et al.*, 2013).

Os bacteriófagos desempenham uma função de imunidade inata contra infecções bacterianas. Porém, os estudos sobre a aderência de bacteriófagos ao muco (BAM) ainda são pouco compreendidos (Barr *et al.*, 2015). Segundo Lim e colaboradores (2018), a exposição precoce nos primeiros anos de vida aos bacteriófagos, modulam a resposta imunológica adquirida, reduzindo a incidência de infecções bacterianas e a probabilidade de reações inflamatórias exacerbadas (Lim *et al.*, 2018).

Dessa maneira, tendo em vista a importância de entender o comportamento dos bacteriófagos frente ao contexto da infecção por *P. aeruginosa*, é necessário também elucidar sua interação com as proteínas presentes nos tecidos e também sintetizadas nesse microambiente. Sabendo do papel da proteína mucina no organismo e sua abundância em tecidos, além da interação que vem sendo esclarecida com bacteriófagos para *P. aeruginosa*, o presente trabalho busca

desenvolver um método capaz de realizar uma triagem facilitada de bacteriófagos com replicação diferente junto a esta proteína, o que facilitará o desenvolvimento de novos estudos e uma identificação mais eficaz de bacteriófagos úteis para futuros tratamentos.

4. METODOLOGIA

4.1 AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) EM MEIO LURIA BERTANI 0,5× COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MUCINA.

Com o objetivo de definir a concentração de mucina com maior influência no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e, assim, estabelecer a concentração de trabalho para os testes subsequentes, empregou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Para isso, a cepa PA14 foi cultivada em caldo Luria Bertani (LB) 0,5× suplementado com mucina nas concentrações de 0%, 0,1%, 0,5% e 1%.

Para o cultivo inicial de *P. aeruginosa* (cepa PA14), 300 µL da cultura preservada e armazenada em glicerol a -80°C foram inoculados em 12 mL de caldo LB e incubados sob agitação em shaker a 37°C por 24 horas. Após esse período de incubação, uma alíquota de 5 µL foi transferida para tubos de 15 mL estéreis contendo 5 mL de caldo LB 0,5× suplementado com as diferentes concentrações de mucina (0,1%, 0,5% e 1%) e sem mucina, conforme o delineamento experimental.

As culturas resultantes foram submetidas à diluição seriada até 10^{-12} . Em triplicata, 5 µL de cada diluição foram plaqueados em meio ágar LB 1,5%, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colônias visíveis, permitindo o cálculo de UFC/mL para cada concentração de mucina testada.

Para a análise estatística dos dados obtidos, empregou-se o teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Dunnett para comparação entre os grupos experimentais. A significância estatística foi considerada com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.2 ANÁLISE DO POTENCIAL LÍTICO DOS bacteriófagos VAC1.1 E VAC3.1 EM *Pseudomonas aeruginosa* NA PRESENÇA DE MUCINA.

Para a padronização do método analítico, a interação dos bacteriófagos VAC1.1 (não ligante) e VAC3.1 (ligante) com *Pseudomonas aeruginosa* foi avaliada por meio da quantificação de unidades formadoras de placa (UFP/mL). As culturas bacterianas foram incubadas em caldo Luria Bertani (LB) 0,5× suplementado com 0,5% de mucina, concentração previamente estabelecida no item 3.1 como a condição mais influente sobre o crescimento bacteriano. Ambos os fagos foram testados utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 1, conforme padronização de títulos realizada no Laboratório de Vacinas (COELHO et al., 2025).

Para o preparo das culturas experimentais, *P. aeruginosa* foi inoculada em caldo LB 0,5× contendo mucina 0,5% e em LB 0,5× sem mucina. As culturas bacterianas foram previamente diluídas até 10^{-3} , atingindo aproximadamente 10^6 células, enquanto os bacteriófagos VAC1.1 e VAC3.1 foram igualmente diluídos para aproximadamente 10^6 UFP/mL, gerando a condição necessária para MOI 1. Em seguida, 10 μ L de cada fago foram adicionados separadamente às culturas bacterianas, que foram incubadas em shaker a 37 °C por 18 a 24 horas.

Após 24 horas de incubação, foram coletadas alíquotas das culturas infectadas para purificação dos fagos por filtração em membrana de 0,22 μ m, seguida da adição de 10% de clorofórmio para remoção de detritos celulares. Os bacteriófagos purificados foram submetidos à diluição seriada até 10^{-12} . Em triplicata, 5 μ L de cada diluição foram plaqueados pelo método de dupla camada em ágar LB, utilizando uma camada base de ágar 1,5% e uma camada superior de ágar LB 0,85% contendo 1 mL de PA14. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 24 horas, e os pontos de lise resultantes foram quantificados para determinação do título viral expresso em UFP/mL. Portanto, foram definidas as razões entre a replicação dos bacteriófagos na presença e na ausência de mucina.

Para a análise estatística, os dados de UFP/mL foram transformados logaritmicamente, e a normalidade das distribuições foi verificada por meio do teste de Shapiro–Wilk. Dependendo do comportamento dos dados transformados, empregou-se o teste Mann–Whitney (não paramétrico) ou o Ratio Paired t-test (paramétrico) para comparação entre VAC1.1 e VAC3.1. Adicionalmente, foram calculados a média geométrica das razões, intervalos de confiança e coeficientes de determinação para avaliar variabilidade e qualidade do pareamento. Diferenças superiores a três ordens de magnitude entre condições com e sem mucina foram consideradas indicativas de interação fago–mucina com relevância biológica.

4.3 APLICABILIDADE DO TESTE DIFERENCIAL NOS BACTERIÓFAGOS VAC 1.1.1.1, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC2.2, VAC5.2, VAC8.1, VAC10.1, VAC12.4, VAC13.1.

Utilizando a padronização estabelecida no item 3.2 com os bacteriófagos VAC1.1 e VAC3.1, o método diferencial foi aplicado para avaliar a interação com mucina dos demais fagos da coleção. Assim, utilizaram-se os 9 fagos com capacidade de infectar *P. aeruginosa* PA14 pertencentes à coleção de bacteriófagos do Laboratório de Vacinas da UNIFAL-MG (VAC1.1.1.1, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC2.2, VAC5.2, VAC8.1, VAC10.1, VAC12.4 e VAC13.1), cuja interação com mucina ainda não havia sido definida.

A metodologia empregada seguiu integralmente o protocolo previamente estabelecido, incluindo diluições seriadas, plaqueamento em dupla camada, purificação dos sobrenadantes por filtração em membrana de 0,22 µm seguida da adição de clorofórmio, além do tratamento estatístico padronizado. Os títulos virais foram transformados em logaritmo, avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk e comparados por Mann–Whitney ou Ratio Paired T-test, conforme a distribuição dos dados.

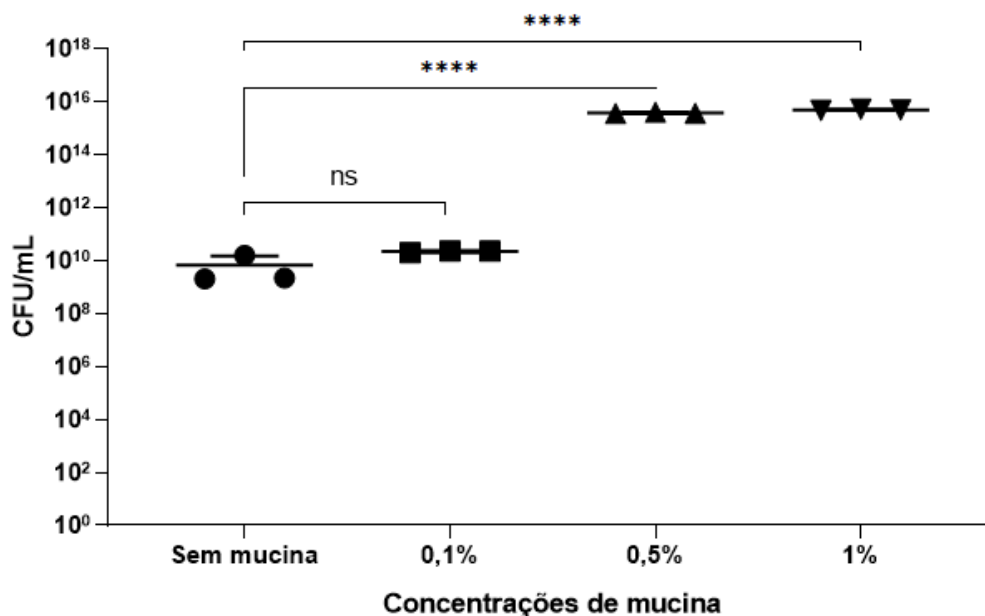
Para interpretação biológica, os fagos foram considerados ligantes quando apresentaram aumento de replicação maior que 3 ordens logarítmicas na presença de mucina 0,5%, acompanhado de significância estatística, conforme definido na padronização do teste diferencial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE *P. aeruginosa* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MUCINA

Nos resultados do crescimento de *P. aeruginosa* com suplementação de diferentes concentrações de mucina, foi possível observar um crescimento diferencial nas unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo LB 0,5× com diferentes concentrações de mucina (0,1%, 0,5%, 1%) e sem mucina.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Crescimento de *P. aeruginosa* (UFC/mL) em caldo LB 0,5%, suplementado com diferentes concentrações de mucina (0,1%, 0,5% e 1%) e sem mucina. O teste One way ANOVA indicou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,0001$), com grupos 0,5% e 1%. E o teste de Dunnett identificou que as concentrações de 0,5% e 1% de mucina promoveram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) no crescimento bacteriano em comparação ao sem mucina, enquanto a concentração de 0,1% não apresentou diferença significativa.

A análise mostrou que existem diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados ($p < 0,0001$), indicando que uma variação na quantidade de unidades formadoras de colônia pode ser explicada pelas diferenças na concentração de mucina. Ao fazer a comparação múltipla entre os valores dos grupos, as concentrações de 0,5% ($p < 0,0001$) e 1% ($p < 0,0001$) de mucina apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo sem mucina. Nesse sentido, existe um crescimento bacteriano maior em cultura enriquecida a partir da concentração de 0,5%, o que possibilitou a utilização desta concentração para determinar a influência da mucina na replicação dos fagos.

Schick *et al.* (2018) apresenta em seus resultados que a presença de mucina tem pouco impacto na variação fenotípica e genotípica, porém sua presença favorece a formação de biofilmes e redução da motilidade bacteriana, permitindo uma maior aderência sobre tecidos epiteliais. Rouillard *et al.* (2018) aborda que a presença de mucina junto ao EPS, aumenta a viscoelasticidade do biofilme, alterando a suscetibilidade de antibióticos, atuação de forças biomecânicas e químicas.

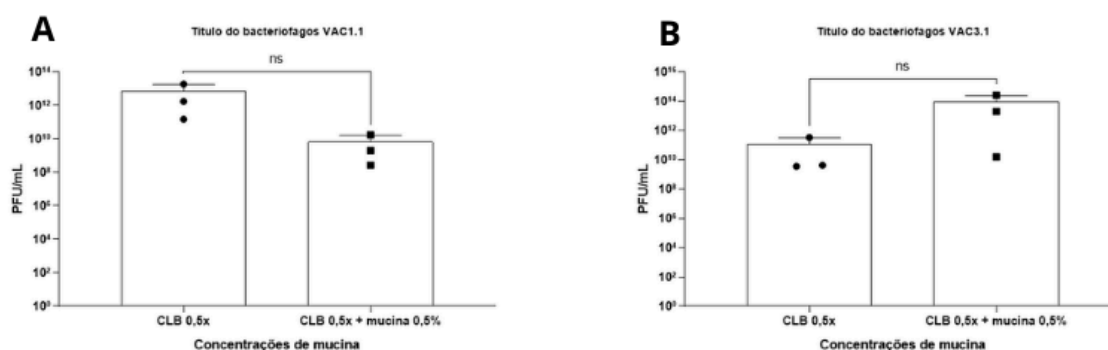
Matsui *et al.* (2006) abordam que em pacientes com fibrose cística, a hipersecreção de mucinas, contribui para formação de biofilme de *P. aeruginosa* pois ele garante um ambiente nutricional favorável e medidas de proteção biofísicas, como a facilidade de aderência do biofilme formado e impedimento de difusão de pequenas moléculas, como a lactoferrina, proteína multifuncional essencial para a limitação de ferro para os patógenos.

5.2 AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DOS FAGOS COM A PRESENÇA DE MUCINA

Para avaliar os bacteriófagos VAC 1.1.1.1, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC2.2, VAC5.2, VAC8.1, VAC10.1, VAC12.4, VAC13.1, foram utilizados os bacteriófagos VAC1.1 e VAC3.1 como controles negativos e positivos, respectivamente, uma vez que são fenotipicamente conhecidos. Nesse sentido, as UFPs foram utilizadas para determinar a ligação dos bacteriófagos sem ligação conhecidas.

Na análise biológica, para o fago VAC1.1, sem diferença na replicação em mucina a média das razões da UFP/mL apresentaram valor de $7,77E-03$, demonstrando uma redução de 3 casas logarítmicas e confirmando sua deficiência na replicação quando a mucina está presente, sendo possível sua utilização como controle negativo, assim também foi feito para o VAC 3.1, com maior replicação em mucina, onde a média das razões apresentaram valor de $2,18E+03$, resultado este classificado como controle positivo.

Figura 2 - Títulos dos bacteriófago VAC1.1 e VAC 3.1 em UFP/mL



Legenda: A- Título do bacteriófago VAC1.1 em UFP/mL submetidos aos tratamentos com e sem mucina 0,5% em Ratio Paired T Test ($p= 0,0962$).B- Título do bacteriófago VAC3.1 em UFP/mL submetidos aos tratamentos com e sem mucina 0,5% em Ratio Paired T Test ($p= 0,1234$)

Na análise estatística, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado aos dados do bacteriófago VAC1.1 (Figura 3A), confirmando normalidade para ambos os grupos,

Caldo LB ($p= 0,1434$) e CLB + mucina ($p= 0,1769$), permitindo o uso do teste t de Student não pareado com correção de Welch. Após a transformação logarítmica dos títulos, novamente o teste de Shapiro-Wilk indicou distribuição normal ($p > 0,05$). O Ratio Paired t Test ($p= 0,0962$) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as condições, embora a média geométrica das razões (0,7616) e o intervalo de confiança de 95% (0,5143 a 1,128) indiquem uma possível redução viral na presença de mucina. O coeficiente de determinação ($R^2= 0,8168$) demonstrou boa explicação da variabilidade pelo modelo, enquanto o coeficiente de correlação ($r= -0,4809$; $p= 0,3403$) evidenciou baixa eficiência no pareamento, sugerindo variabilidade inconsistente entre as condições.

Para o bacteriófago VAC3.1 (Figura 3B), também foi aplicada a transformação logarítmica, e o teste de Shapiro-Wilk confirmou distribuição lognormal para ambos os grupos ($p > 0,05$). O Ratio Paired t Test ($p= 0,1234$) indicou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras com e sem mucina. No entanto, a média geométrica das razões (1,227) e o intervalo de confiança de 95% (0,8717 a 1,728) sugerem aumento na concentração viral na presença de mucina. O coeficiente de determinação ($R^2= 0,7684$) indicou boa explicação da variabilidade, enquanto o coeficiente de correlação ($r= 0,6519$; $p= 0,2740$) demonstrou baixa eficiência de pareamento entre os grupos.

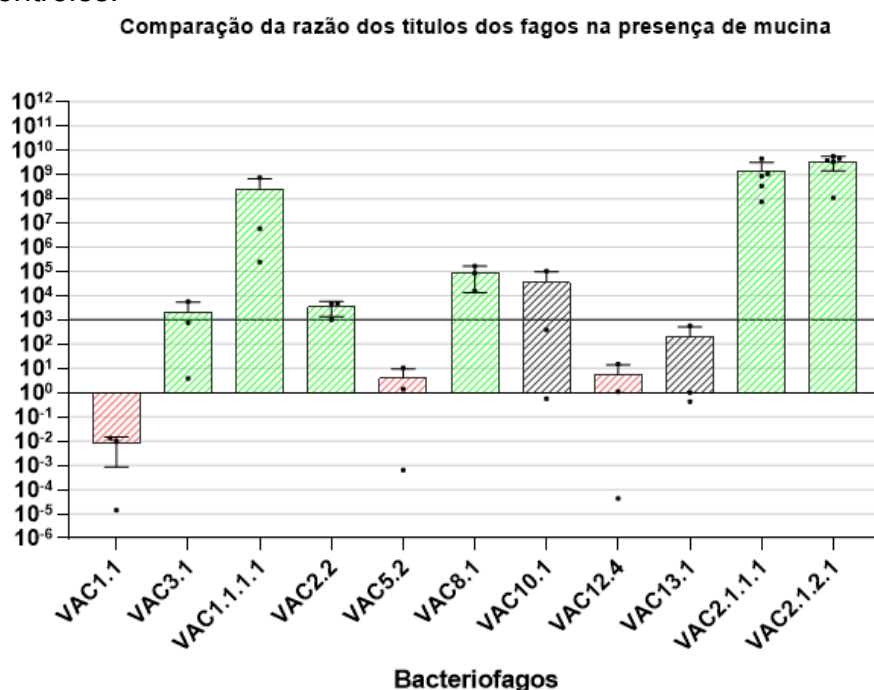
Apesar de estatisticamente não haver diferença significativa, observou-se aumento biologicamente relevante nos títulos do bacteriófago VAC3.1, cuja razão atingiu três casas logarítmicas, conforme previsto pelo projeto de pesquisa e consistente com estudos anteriores.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente (Coelho *et al.*, 2025), em testes *in vitro*, o bacteriófago VAC3.1 em crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* na presença de mucina, foi mais efetivo em relação ao bacteriófago VAC1.1, mesmo sendo morfológicamente e geneticamente parecidos. Também foi demonstrado que em teste *in vivo* com infecção por *P. aeruginosa* nos pulmões de camundongos, que o pré tratamento com o bacteriófago VAC3.1 em relação ao bacteriófago VAC1.1, resultou em uma maior sobrevivência, redução dos sinais clínicos e menor carga bacteriana e associa estes resultados a retenção do bacteriófago VAC 3.1 na cavidade nasal e traqueal, áreas com grande presença de epitélios mucosos.

Nesse sentido, para determinar o efeito da mucina sob a replicação de diferentes bacteriófagos, foi definida a razão entre os títulos destes na presença e na

ausência da mucina. A FIGURA 3, apresenta o resultado das médias das razões dos bacteriófagos com ligação a mucina não conhecidas, com VAC1.1 e VAC3.1 como controles negativos e positivos, respectivamente. Os bacteriófagos representados na coluna verde, que são aqueles que apresentaram resultados significativos biológicos e estatísticos, sendo eles o VAC3.1, replicante em mucina, o VAC1.1.1.1, VAC2.2, VAC8.1, VAC2.1.1.1 e VAC2.1.2.1. Em vermelho temos os bacteriófagos VAC1.1, sem diferença de replicação em mucina, o VAC5.2 e VAC12.4, que não tiveram um aumento biológico e estatístico significativo. Já em preto foram os bacteriófagos VAC10.1 e VAC13.1 que não apresentaram resultados significativos biológicos ou estatísticos.

Figura 3 - Razão dos títulos dos bacteriófagos de interesse com VAC1.1 e VAC3.1 como controles.



Legenda: Razão comparativa entre o caldo LB 0,5× e caldo LB 0,5× enriquecido com mucina 0,5% para os bacteriófago VAC1.1, VAC3.1, VAC 1.1.1.1, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC2.2, VAC5.2, VAC8.1, VAC10.1, VAC12.4, VAC13.1 em UFP/mL.

Para o bacteriófago VAC1.1.1.1 (FIGURA 3), a média das razões da UFP/mL apresentaram valor de 3,68E+08, demonstrando um aumento de 8 casas logarítmicas, resultado significativo biologicamente. Na análise estatística, o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) confirmou uma distribuição normal, possibilitando a aplicação do Ratio Paired T Test ($p = 0,0303$), indicando uma diferença estatisticamente

significativa entre os grupos com e sem mucina, confirmando características significativas de replicação diferencial na presença de mucina.

Assim como bacteriófago VAC2.2 (FIGURA 3), que apresentou aumento da replicação na presença de mucina, com a média das razões da UFP/mL um valor de $3,53E+03$, significativo biologicamente de 3 casas logarítmica e estatisticamente, através do teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e o Ratio Paired T Test ($p = 0,0026$) significativos.

O bacteriófago VAC 8.1, que também possui replicação diferencial na presença de mucina, conforme na FIGURA 3, apresentou na média das razões da UFP/mL um valor de $8,93E+04$, aumento este, significativo biologicamente. Além de estatisticamente, através do resultado significativo no teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e no Ratio Paired t Test ($p = 0,0074$) entre os grupos com mucina e sem mucina.

Os bacteriófagos VAC2.1.1.1 e VAC2.1.2.1 (FIGURA 3), tiveram comportamentos semelhantes na média das razões da UFP/mL, com valores de $1,13E+09$ e $3,47E+0,9$ respectivamente. Demonstrando que ambos tiveram um resultado significativo quanto sua replicação frente a mucina biologicamente, com aumento de 9 casas logarítmicas e estatisticamente, com o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), que determinou uma distribuição não normal, sendo necessário, o uso do teste de Mann-Whitney, indicando uma diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem mucina, com mesmo valor $p = 0,0079$ encontrado.

Para o bacteriófago VAC10.1 a média das razões da UFP/mL apresentaram valor de $3,55E+04$ (FIGURA 3), demonstrando um aumento de 4 casas logarítmicas, resultado significativo biologicamente. Contudo, apesar das análises estatísticas do teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) serem significativas, o Ratio Paired t Test ($p = 0,2400$) não indicou uma diferença estatisticamente significativa.

Testes *in vivo* feitos por Wu *et al.* (2024), demonstraram que o bacteriófago \emptyset PNJ-6, ligantes ao muco através de ligações entre a proteína HOC e glicanos fucosilados em MUC2, foram capazes de proteger infecções causadas por *Escherichia coli* em gastrointestinal de murinos e aumentar a expressão de mucina no local. Resultados que corroboram para a necessidade de isolar e separar bacteriófagos que possuem mecanismos diferenciais de ligação à mucina.

Almeida *et al.* (2019) demonstra que, para *F. columnare*, a modulação da motilidade bacteriana e o aumento da secreção de proteases na presença de mucina foram fatores determinantes para o crescimento diferencial da bactéria.

Esses mecanismos tornam as células mais suscetíveis à infecção por fagos, resultando em um aumento na replicação viral. Características essas que são apresentadas nos bacteriófagos replicantes em mucina apresentados na FIGURA 3.

Fraser *et al.* (2007) aborda em ensaios *in vitro* que bacteriófagos T4 da ordem *Caudovirales* possuem a proteína HOC, semelhantes a imunoglobulinas no capsídeo, o que permite uma adesão dos bacteriófagos na mucina e um maior contato com bactérias, favorecendo a replicação viral e promovendo a seleção positiva de fagos capazes de se ligar ao muco. O resultado contrasta com o observado para o bacteriófago controle positivo VAC 3.1 utilizado neste teste diferencial, pois segundo Coelho *et al.* (2025), esse bacteriófago não possui proteínas HOC e seu mecanismo de adesão à mucina não está completamente elucidado. Portanto, isolar bacteriófagos ligantes à mucina permite esclarecer este mecanismo de interação patógeno-hospedeiro, ressaltando sua importância biotecnológica no tratamento de frente a *P. aeruginosa* e outras bactérias multirresistentes.

Os bacteriófagos VAC5.2, VAC12.4 e VAC13.1 tiveram a média das razões das UFP/mL de 3,92E+00, 5,42E+00 e 1,91E+02, respectivamente, demonstrando que não ocorreu nenhum aumento das casas logarítmicas em nenhum destes, resultado não significativo biologicamente. As análises estatísticas confirmam que não apresentam características significativas de replicação junto a mucina.

Carroll-Portillo *et al.* (2021) aborda que no trato gastrointestinal há alterações na mucina através da diminuição da glicosilação, sialilação ou disbiose pelo excesso de bacteriófagos que podem diminuir a replicação viral. Porém, na metodologia proposta, a mucina utilizada foi adquirida comercialmente e padronizada, garantindo consistência na sua estrutura e concentração para os testes realizados nos bacteriófagos VAC1.1 e VAC3.1. Isso indica que a redução na razão da UFP/mL nos bacteriófagos, apresentada na FIGURA 4, confirma a hipótese conhecida de que os bacteriófago VAC1.1 controle negativo, VAC5.2, VAC12.4 e VAC13.1, não tem sua replicação alterada pela mucina.

Segundo Almeida *et al.* (2019), é fundamental buscar abordagens técnicas que possam ser exploradas para otimizar o cultivo de fagos em meio líquido, visando sua aplicação na produção de fagos específicos para fins terapêuticos ou biotecnológicos em larga escala. Nesse contexto, a metodologia de triagem para identificar bacteriófagos que se ligam ou não à mucina possui grande potencial, pois

pode ser utilizada para selecionar fagos com características desejáveis para esses processos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como propósito desenvolver e validar uma metodologia *in vitro* capaz de identificar bacteriófagos líticos com comportamento de replicação diferencial na presença de mucina, com foco na triagem de fagos que apresentem afinidade a essa glicoproteína. A aplicação do método permitiu caracterizar o efeito da mucina sobre a replicação e infectividade de fagos de *P. aeruginosa*, fornecendo uma abordagem prática para estudos de interação fago-hospedeiro. Os resultados mostraram que a mucina, em concentrações a partir de 0,5%, favoreceu o crescimento bacteriano sem afetar a viabilidade dos fagos testados. Na comparação entre os fagos de referência, observou-se que o VAC3.1, ligante a mucina, apresentou aumento expressivo de até quatro ordens logarítmicas no título viral (UFP/mL) quando cultivado na presença de mucina, enquanto o VAC1.1, não ligante, manteve replicação estável. Portanto, considerou-se o aumento de três casas logarítmicas associado ao fenótipo replicante em mucina e os testes sem diferença ao fenótipo não ligante. Esses achados confirmam a eficiência do método para distinguir fagos com diferentes capacidades diferencial de replicação em mucina.

Com base nesses resultados, o ensaio foi aplicado a nove novos fagos, permitindo classificá-los de maneira consistente em replicantes em mucina, os bacteriófagos VAC1.1.1.1, VAC2.2, VAC2.1.1.1, VAC2.1.2.1, VAC8.1 e sem alteração na replicação em mucina, VAC5.2, VAC10.1, VAC12.4 e VAC13.1. As análises estatísticas, incluindo teste *t* e Mann-Whitney, demonstraram boa reprodutibilidade e sensibilidade da metodologia, consolidando-a como uma ferramenta simples e de baixo custo para triagem preliminar de fagos com potencial uso terapêutico.

A identificação de fagos com afinidade à mucina tem importância estratégica para a fagoterapia, principalmente em infecções associadas a superfícies epiteliais e mucosas, como as do trato respiratório e gastrointestinal. Esses fagos podem atuar de forma complementar à imunidade inata, aderindo à mucosa e formando uma camada protetora contra patógenos, conforme o modelo *Bacteriophage Adherence to Mucus* (BAM). Essa propriedade os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias profiláticas e curativas voltadas a infecções causadas

por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

Concluiu-se que o método proposto neste estudo mostrou-se viável e aplicável à triagem de fagos replicantes em mucina, contribuindo para o avanço da pesquisa sobre interações fago-mucosa e abrindo novas perspectivas para o uso racional da fagoterapia. Estudos futuros devem priorizar a validação *in vivo* do modelo, além da análise genômica e proteômica dos fagos identificados, de modo a compreender os mecanismos moleculares envolvidos na adesão e replicação em ambientes mucosos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H.-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of virology**, v. 152, p. 227-243, 2007.
- AKREMI, I. et al. Isolation and Characterization of Lytic *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Isolated from Sewage Samples from Tunisia. **Viruses**, v. 14, n. 11, 1 nov. 2022.
- ALLEN, K. D. et al. Acquisition of endemic *Pseudomonas aeruginosa* on an intensive therapy unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 10, n. 2, p. 156-164, 1987.
- ALHEDE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mechanisms of immune evasion. Em: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press Inc., 2014. v. 86p. 1–40.
- BAO, H.; WANG, Y.; ZHANG, H.; ZHAI, S.; ZHANG, L.; ZHU, S. Therapeutic potential of phage proteins in combating bacterial infections. **Viruses**, v. 16, n. 5, p. 682, 2024.
- BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015
- BAKSHANI, C. R. et al. Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. **Npj Biofilms and Microbiomes**, v. 4, n. 1, p. 14, 2018.
- CARROLL-PORTILLO, A.; LIN, H. C. Exploring mucin as adjunct to phage therapy. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 509, 2021.
- CHANISHVILI, N. Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. **Advances in virus research**, v. 83, p. 3-40, 2012.
- CHATTERJEE, Maitrayee et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 48-58, 2016.
- CLOKIE, Martha RJ; MILLARD, Andrew D.; LETAROV, Andrey V.; HEAPHY, Shaun. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31-45, 2011.
- COELHO, L. F. L. et al. Mucosal-adapted bacteriophages as a preventive strategy for a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge in mice. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2025.
- CORRADI, V.; VERGANI, P.; TIELEMAN, D. P. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 22891–22906, set. 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

DANIS-WLODARCZYK, Katarzyna M. et al. Friends or foes? Rapid determination of dissimilar colistin and ciprofloxacin antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* phages. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1162, 2021.

DE OLIVEIRA, David M. P.; FORDE, Brian M.; KIDD, Timothy J.; et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

DEAN, S. N.; HARRIS, M. D.; TURNER, K. B. Transferrin receptor binding and uptake of bacteriophage displayed scFv. **Virology**, v. 577, p. 73-83, 2023. DOI: 10.1016/j.virol.2022.10.009.

D'HERELLE, F. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris**, v. 165, p. 373-375, 1917.

DENISSEN, J. et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 244, p. 114006, jul. 2022.

DELCOUR, Anne H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

FLEMING, Alexander. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FOUCRIER, A. et al. Association between combination antibiotic therapy as opposed as monotherapy and outcomes of ICU patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an ancillary study of the iDIAPASON trial. **Critical Care**, v. 27, n. 1, p. 211, 30 maio 2023.

FURFARO, L. L.; PAYNE, M. S.; CHANG, B. J. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 23 out. 2018.

G, Santamaría-Corral; A, Senhaji-Kacha; A, Broncano-Lavado; et al. Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 7, 2023.

GIBSON, Ronald L.; BURNS, Jane L.; RAMSEY, Bonnie W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 168, n. 8, p. 918-951, 2003.

GUILLON, A. et al. Inhaled bacteriophage therapy in a porcine model of pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* during mechanical ventilation. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 18, p. 3829–3842, 9 set. 2021.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050–1051, 1 jun. 2005.

HATFULL, Graham F. Actinobacteriophages: Genomics, Dynamics, and Applications. **Annual Review of Virology**, v. 7, n. 1, p. 37–61, 2020.

HATFULL, Graham F.; DEDRICK, Rebekah M.; SCHOOLEY, Robert T. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, 2021.

HOBBS, Z.; ABEDON, S. T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 7, p. fnw047, 2016.

HOYLAND-KROGHSBO, Nina M. et al. Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 1, p. 131-135, 2017.

JASSIM, S. A. A.; LING, S.; TIAN, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; LIU, H.; XIE, Z.; HUANG, J. D. Isolation and characterization of a novel phage belonging to a new genus against *Vibrio parahaemolyticus*. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 11, 2023.

JAULT, P. et al. 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. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 35–45, jan. 2019.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 18 mar. 2021.

LAMBERT, PA1308633. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the royal society of medicine**, v. 95, n. Suppl 41, p. 22, 2002.

LEITNER, Lorenz et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 427-436, 2021.

LIELEG, O. et al. Characterization of particle translocation through mucin hydrogels. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 9, p. 1782-1789, 2010.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. 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.

LUONG, Tiffany et al. Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going?. **Clinical Therapeutics**, v. 42, n. 9, p. 1659-1680, set. 2020.

NIKOLIC, Isidora et al. An optimized checkerboard method for phage-antibiotic synergy detection. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1542, 2022.

MAHAR, Patrick et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burns patients: risk factors and outcomes. *Burns*, v. 36, n. 8, p. 1228-1233, 2010.

MARIA DE SOUZA MORAIS, S. et al. Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Vaccine**, v. 36, n. 43, p. 6408–6415, 15 out. 2018.

MATSUI, H. et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18131-18136, 2006.

MENG, X. et al. Isolation, characterization, and genome analysis of a novel phage BUCT_49532 lysing *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 466, 2024.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 598-616, 2024. DOI: 10.1038/s41579-024-01054-w.

MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 1 abr. 2019.

MUSILA, S. et al. Isolation and characterization of a novel Siphoviridae phage, vB_SsoS_REX, that lyses *Salmonella* species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 834, 2024.

NEWMAN, John W.; FLOYD, Rachel V.; FOTHERGILL, Joanne L. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 15, p. fnx124, 2017.

O'LOUGHLIN, Colleen T. et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 2013.

O'MAY, Che Y. et al. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 6, p. 765-773, 2009.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OSAMA, E.; ABOUELNAGA, M.; ELSHESHTAWY, A.; GAMAL, H.; GHARIB, A. Genomic and functional characterization of five novel Salmonella-targeting bacteriophages. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 38, 2023.

PATIL, A. et al. Bacteriophages for ESKAPE: role in pathogenicity and measures of control. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 7, p. 845–865, 3 jul. 2021.

PAZ-ZARZA, V. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 2, p. 180–189, abr. 2019.

POLLACK, Matthew. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Reviews of infectious diseases**, v. 6, n. Supplement_3, p. S617-S626, 1984.

POPE, Welkin H. et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

PROKOPCZUK, Federico I; IM, Hansol; CAMPOS-GOMEZ, Javier; *et al.* Engineered Superinfective Pf Phage Prevents Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* in a Mouse Burn Model. **American Society for Microbiology**, v. 14, 2023.

QIAO, Shuai et al. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. **Nature**, v. 511, n. 7507, p. 108-111, 2014.

RAMALINGAM, Baskaran; THANUSU PARANDHAMAN; DAS, Sujoy K. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of Gram-negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 7, p. 4963-4976, 2016.

RASHID, S. J. et al. The ability of phage cocktail to disinfect *Salmonella* is highly dependent on the substrate of contamination. **Journal of Medical Microbiology**, v. 72, n. 11, 2023.

REIG, S.; LE GOUELLEC, A.; BLEVES, S. What Is New in the Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, p. 909731, 8 jul. 2022.

ROUILLARD, K. R. et al. Effects of mucin and DNA concentrations in airway mucus on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm recalcitrance. **mSphere**, v. 7, n. 4, p. e00291-22, 2022.

RUTHERFORD, Steven T.; BASSLER, Bonnie L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427, 2012.

SALMON-DIVON, M.; SAAD, N.; ZIMERI, A. M.; BHARDWAJ, A.; GANA, K.; MEIROLES, L. H. I.; BOURAS, G.; MALIK, D. J.; ELIA, U. Isolation, characterization, and bioinformatic analyses of lytic *Salmonella enterica* phages and evaluation of their

antibacterial activity in food. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1140606, 2023.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

SCHICK, A.; KASSEN, R. Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 42, p. 10714-10719, 2018.

SUH, Gina A. et al. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. e02071-21, 2022.

TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

UCHIYAMA, Jumpei et al. Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage–antibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of virology**, v. 163, p. 1941-1948, 2018.

VANDENHEUVEL, Dieter; LAVIGNE, Rob; BRÜSSOW, Harald. Bacteriophage therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials. **Annual review of virology**, v. 2, p. 599-618, 2015.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Perspectives in Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, Apr. 2015.

VRANCIANU, C. O. et al. Emerging Strategies to Combat β -Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8527, 12 nov. 2020.

TKHILAISHVILI, Tamta et al. Using bacteriophages as a trojan horse to the killing of dual-species biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 695, 2020.

WANG, S. et al. Lipopolysaccharide from biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induces macrophage hyperinflammatory responses. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 4, 28 abr. 2021.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181, maio de 2004.

WHITFIELD, Chris; TRENT, M. Stephen. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. **Annual review of biochemistry**, v. 83, p. 99-128, 2014.

WU, J. et al. Bacteriophage defends murine gut from *Escherichia coli* invasion via mucosal adherence. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 4764, 2024.

YIN, W. et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments.

International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 14, p. 3423, 12 jul. 2019.

YU, P. et al. Phage therapy: a renewed approach against oral diseases caused by *Enterococcus faecalis* infections. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1165, 2023.

ZAVASCKI, Alexandre Prehn et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1206-1215, 2007.

ZHAO, F. et al. Isolation and characterization of novel *Salmonella* phages and their therapeutic potential in *Galleria mellonella*. **mSphere**, v. 9, n. 2, p. e00520-23, 2024.

ZINKE, Maximilian; SCHRÖDER, Gunnar F. ; LANGE, Adam. Major tail proteins of bacteriophages of the order Caudovirales. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, p. 101472, 2022.