

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

VINICIUS BORRONI FACANALI

**TERAPIA FÁGICA E ENTREGA DE SISTEMAS CRISPR-CAS9 TIPO II
PROGRAMÁVEIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE ANTIBIÓTICOS NO
COMBATE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS: REVISÃO SISTEMÁTICA DA
LITERATURA**

SÃO CARLOS

2022

VINICIUS BORRONI FACANALI

**TERAPIA FÁGICA E ENTREGA DE SISTEMAS CRISPR-CAS9 TIPO II
PROGRAMÁVEIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE ANTIBIÓTICOS NO
COMBATE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS: REVISÃO SISTEMÁTICA DA
LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de
São Carlos como pré-requisito à obtenção
do grau de Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina da
Silva Pranchevicius

SÃO CARLOS

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeira mão a Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, que aceitou me orientar, e pacientemente forneceu todo o suporte necessário para realização do trabalho, muito obrigado Cris. Você sempre será uma das minhas maiores, se não minha maior referência de força, perseverança e bondade que pode existir. Espero um dia poder ser metade da pessoa e da profissional que você é hoje, Cris.

Agradeço a toda minha família, porém em especial meus pais, Wanderley Facanali e Marita Borroni Facanali, que sempre acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram em minhas decisões, dividiram comigo todos os momentos da vida, desde os mais magníficos até momentos de dor e angústia. Serão sempre meus maiores pilares durante essa jornada que é a vida. Um agradecimento especial para minha tia Valdete Facanali que é como uma segunda mãe para mim, e seu marido, José Carlos.

Agradeço a todos os colegas e professores que pude conhecer no curso de biotecnologia, na UFSCar e na cidade de São Carlos. Agradeço especialmente a minha segunda família durante os 4 longos anos de graduação, a República Sete Copos, Leonardo Murilo Aoyagi, Pedro Osmar de Almeida Cardoso, Alam Croco, Victor Sadanory Takekawa, Lucas Roque, Paulo Henrique Gomes Lisboa, e todos nossos mais queridos amigos e amigas, Isabela Del Ponti, Ana Luisa Villa Rios, Maria Vitória Lima e Marlon Breno Lima Zampieri, que dividiram comigo os medos, as angústias, as alegrias, os sorrisos, as lágrimas e inúmeros momentos especiais, os quais carregarei para a vida toda, muito obrigado meus irmãos e irmãs..

Agradeço também meus grandes amigos de infância, que me acompanham e apoiam a tempos na caminhada da vida, Luis Paulo Silva, Leonardo Bergamini de Souza, Yuri Cardoso Kersnowsky, Guilherme Melari, e Rodrigo Mori, muito obrigado meus irmão, levo vocês comigo no coração sempre.

Um agradecimento final a duas pessoas muito especiais para mim, que a vida me deu de presente em São Carlos, Mariana Pagan Bonaldo e Isabella Godwin Coury, obrigado por fazerem parte da minha vida.

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal tanto da pele quanto da mucosa humana, mas também uma causa frequente de infecções graves com alta morbidade, mortalidade e custos associados à saúde. As cepas de *S. aureus* possuem a capacidade de se adaptar rapidamente às pressões de seleção de antibióticos, resultando no desenvolvimento de cepas resistentes. O presente estudo é uma revisão descritiva sistemática, sem metanálise, que teve como objetivo abordar o tema da terapia com bacteriófagos como uma potencial ferramenta para o tratamento alternativo ao uso de antibióticos, e combate ao surgimento acelerado de cepas bacterianas resistentes a esses antibióticos.

Apesar de seu grande potencial como agente antimicrobiano, o uso de bacteriófagos para tratamento de infecções bacterianas ainda é pouco eficaz, principalmente em cenário *in vivo*, devido a uma série de fatores como a restrita gama de hospedeiros, dificuldade em atingir altas concentrações, e de transporte até o local de ação. Avanços nas técnicas de biologia sintética tem permitido a transposição de algumas dessas barreiras, principalmente ao se utilizar técnicas de edição do genoma, como o sistema CRISPR-Cas. Este trabalho buscou analisar artigos da literatura que utilizaram o engenhieramento de bacteriófagos, para que estes pudessem transportar sequências codificadoras de um sistema CRISPR-Cas9 tipo II programável, e fossem capazes de agir como agente antimicrobiano contra bactérias *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Bacteriófagos; Engenhieramento; CRISPR-Cas9 tipo II; Terapia com Bacteriófagos; *Staphylococcus aureus*

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Inserção de sequência exógena de interesse no genoma do bacteriófago	15
Figura 2 - Exemplos de enxertos de ação extracelular e intracelular	18
Figura 3 - CRISPR-Cas Tipo 2	20
Figura 4 - Construção sistema CRISPR-Cas9 e inserção na bactéria alvo	21
Figura 5 - Fluxograma da seleção de artigos, de acordo com a metodologia PRISMA	25

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características chave dos estudos incluídos na revisão sistemática	28
Tabela 2 - Fluxograma de testes e experimentos dos estudos incluídos na revisão sistemática	29

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	7
1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS (S. AUREUS)	8
1.2 BACTERÍOFAGOS	10
1.2.1 TERAPIA COM BACTERÍOFAGOS OU FAGOTERAPIA	12
1.3 ENGENHEIRAMENTO DE BACTERÍOFAGOS PARA FAGOTERAPIA	13
1.3.1 ENXERTOS DE AÇÃO INTRACELULAR E EXTRACELULAR	16
1.4 ENXERTOS DE AÇÃO INTRACELULAR	18
1.4.1 CRISPR-Cas9 TIPO II	18
1.4.2 ENXERTO PROGRAMÁVEL DE CRISPR-Cas9 TIPO II	20
2) OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3) METODOLOGIA	22
3.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	22
3.2 BASES DE DADOS	23
3.3 SELEÇÃO DOS ESTUDOS	23
3.4 PROCESSO DE COLETA DE DADOS E LISTA DE DADOS	23
4) RESULTADOS	24
4.1 NACIONALIDADE	24
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	26
4.4 PRINCIPAIS ACHADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS	30
4.4.1 BIKARD (2014)	30
4.4.2 PARK (2017)	31
4.4.2 COBB (2019)	32
5) DISCUSSÃO	34
5.1 BIKARD (2014)	34
5.2 PARK (2017)	36
5.3 COBB (2019)	39
6) CONCLUSÃO	41
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1) INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos procariontes, e muitas das vezes, unicelulares. Sua existência está intrinsecamente ligada à vida na terra, e podem ser encontradas em praticamente todos os ecossistemas de nosso planeta. Em sua grande maioria, são inofensivas, e contribuem de forma simbiótica e harmônica para o bem da vida. Estes seres vivos, por possuírem um curto ciclo de vida possuem uma habilidade extraordinária de responder extremamente rápido a estímulos e mudanças que ocorrem no ambiente à sua volta, se adaptando às mais diversas condições e possíveis ameaças (SANTOS, 2004).

As bactérias possuem naturalmente estruturas de defesa em sua parede celular, como as porinas e as bombas de efluxo, mas ao longo do tempo, diante da exposição aos antibióticos, as bactérias desenvolveram diversos mecanismos de resistência contra os fármacos (LIMA, 2017). A resistência aos antibióticos se desenvolve assim como uma natural consequência da habilidade que a população bacteriana possui em se adaptar, sendo essa adaptação uma parte crucial de seu processo evolutivo (SANTOS, 2004). No entanto, esse o processo de adaptação ou evolução é amplificado com a pressão seletiva exercida pelo difundido uso contínuo e indevido de agentes antimicrobianos, tanto na saúde humana quanto animal (WHO, 2022), o que tem gerado um cenário atual de risco, onde cada vez mais se torna maior o número de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Em 2016, estudos estimaram que a partir de 2050, o número de mortes relacionadas às bactérias super resistentes pode ultrapassar o número de mortes relacionadas ao câncer (O'NEILL, 2016). Em adição, o relatório do Sistema Global de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (GLASS, 2020), relataram que aproximadamente 30% dos recém-nascidos, com sepse, morrem devido a infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos de uso básico (amoxicilina, clavulanato, e outros), os chamados primeira linha de defesa, ou *first-line antibiotics*.

Uma vez que a taxa de descoberta de novas cepas resistentes é muito maior que a taxa de descoberta de novos antibióticos, se torna cada vez mais necessário o estudo e

desenvolvimento de tratamentos alternativos, que combatam o agente microbiano, preservando a integridade do paciente, ao passo que também inibem o surgimento de cepas bacterianas resistentes. (DA SILVA GRILLO et al., 2013).

1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

As bactérias *Staphylococcus aureus* foram primeiramente identificadas em 1880 em Aberdeen, Escócia, pelo cirurgião Alexander Ogston, em uma infecção com fluido purulento na perna de um de seus pacientes, e foram formalmente isoladas por Friedrich Julius Rosenbach, pouco tempo depois (NEWSOM, 2008). *Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus*, *Firmicutes*; são positivas para coloração de Gram; possuem forma esférica que pode variar entre 0,5 e 1,5 micrômetros de diâmetro; suas cepas podem ser tanto aeróbicas quanto anaeróbicas facultativas; e crescem em forma de cachos de uvas a 37°C e pH 7,4 (GUO et al., 2020; GARDETE et al., 2014; EDWARDS & MASSEY, 2011).

Staphylococcus aureus são bactérias altamente versáteis, adaptáveis, e capazes de colonizar o trato respiratório superior, gastrointestinal e urogenital. Cerca de 20% a 30% de indivíduos saudáveis, são colonizados e portadores de longo prazo de *S. aureus* em suas peles e membranas nasofaríngeas, onde *S. aureus* existem como membros da microbiota normal e não causam infecções em estado imunológico normal (SAKR et al., 2018). No entanto, as bactérias *S. aureus* possuem potencial para causar uma série de infecções humanas, que podem variar desde furúnculos e celulites até infecções graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007; CONG et al., 2019; PARVEZ et al., 2018; BOUCHER & COREY, 2008).

As infecções mais graves causadas por *S. aureus* podem vir a ser extremamente problemáticas, se considerarmos o fato de que a espécie bacteriana apresenta, na atualidade, uma ocorrência frequente de cepas resistentes a meticilina (*methicillin-resistant S. aureus*, MRSA), um dos principais antibióticos utilizados para tratamento de suas infecções. Estudos mostraram que as MRSA possuem uma taxa de mortalidade maior quando comparadas as infecções causadas por cepas sensíveis à meticilina (*methicillin-sensitive S. aureus*, MSSA) (CHEUNG et al., 2021). Em adição, às MRSA podem também adquirir resistência a quase todos os antibióticos disponíveis como penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, lincomicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas, rifampicina (GUO

et al., 2020). As cepas MRSA, devido a soma de seus fatores de resistência e alta taxa mortalidade, têm sido consideradas um dos principais patógenos encontrados em estabelecimentos de saúde, hospitalares (Healthcare-associated MRSA, HA-MRSA), e podem também serem encontradas na comunidade (Community-associated methicillin-resistant *S. aureus*, CA-MRSA) (PARVEZ et al., 2018).

Além das MRSA, outras cepas têm ganhado a atenção, com as *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina VRSA (Vancomycin-resistant *S. aureus*). A vancomicina é o antibiótico mais utilizado como último recurso em infecções graves ocasionadas por *S. aureus*. (VRSA) (GUO et al., 2020; LOWY et al., 2003; WEIGEL et al., 2003; MCGUINNESS et al., 2017). Portanto, devido às limitadas opções terapêuticas restantes para tratar as infecções ocasionadas por essas cepas, tanto as cepas MRSA como as VRSA se tornaram um grave problema de saúde pública (CONG et al., 2019; MCGUINNESS et al., 2017).

Além da resistência aos antibióticos, as cepas *S. aureus* são capazes de produzir muitos fatores de virulência (FV), que permitem a aderência à superfície, invasão, escape do sistema imunológico e efeitos tóxicos ao hospedeiro (Bien et al., 2011). Os FV que frequentemente estão associados às infecções são as exotoxinas como as enterotoxinas, estafiloquinase (SAK), toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) β -lisina, polissacarídeos capsulares, lipase, toxina esfoliativa e leucocidina de Panton-Valentine. PVL), bem como os componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) (RAHIMI & SHOKOOHIZADEH, 2018; BECKER et al., 2003). Portanto, os FV podem estar relacionados à sua patogenicidade e à resistência à antibiótica inespecífica (CHEUNG et al., 2021).

Atualmente, *S. aureus* são consideradas cepas de alta prioridade para estudos e desenvolvimento de novos tratamentos, pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021). Embora novos antimicrobianos foram desenvolvidos recentemente contra MRSA, e outros estão em vários estágios de ensaios clínicos, incluindo ceftarolina, ceftobiprole, dalbavancina, oritavancina, iclaprim e delafloxacina (ARSHAD et al., 2018; COREY et al.; O'RIORDAN et al., 2018; HUANG et al., 2017; WHO, 2022), a mortalidade ocasionada por esses patógenos permanece alta e o sucesso do tratamento é muito desafiador (TURNER et al., 2019). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas são urgentemente necessárias para efetivamente controlar as cepas MRSA e VRSA.

1.2 Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que foram descobertos por Frederick W. Twort no ano de 1915. Em 1917, Félix d'Hérelle mostrou seu potencial de infectar e matar bactérias (CLOKIE et al., 2011). Esses vírus podem ser encontrados nos mais variados ambientes que incluem, solo, água do mar, águas residuais, superfícies oceânicas e terrestres, ambientes extremos com temperaturas muito altas ou muito baixas, hospitais, e tecidos animais e humanos capazes de abrigar bactérias (CLOKIE et al., 2011). Estruturalmente, os bacteriófagos consistem de um genoma de ácidos nucleicos (na maioria das vezes DNA, mas também RNA) envolto em um invólucro de proteínas do capsídeo codificadas por fagos, que protegem o material genético e mediam sua entrega para próxima célula hospedeira (KASMAN & PORTER, 2021).

Eles são classificados de acordo com o seu conteúdo de ácido nucleico, suas características morfológicas, o local onde podem ser encontrados, e as espécies bacterianas que podem infectar e matar (PRINCIPI et al., 2019). Os bacteriófagos tendem a ser muito específicos, infectando apenas uma única espécie bacteriana ou mesmo cepas específicas dentro de uma espécie, e possuem estratégias de replicação lítica ou lisogênica.

Os fagos denominados virulentos, são de replicação lítica. Durante seu ciclo de replicação, um fago se liga a uma bactéria hospedeira suscetível, e insere seu genoma no citoplasma da célula (bactéria) hospedeira. Uma vez introduzido, utilizará os ribossomos do hospedeiro para produzir suas proteínas, promovendo assim a produção de novos genomas virais e proteínas do capsídeo, que se reúnem e formam várias cópias do fago original. Por fim, a célula hospedeira é lisada ativamente ou passivamente e morre, liberando os novos bacteriófagos para infectar outras bactérias hospedeiras (KASMAN & PORTER, 2021).

Os fagos denominados temperados (*temperate*), possuem ciclo de replicação lisogênica, onde o fago também se liga a uma bactéria hospedeira suscetível, introduz seu genoma no citoplasma e este pode se integrar ao cromossomo da célula bacteriana ou se manter como um elemento episomal. Em ambos os casos, o genoma é replicado e transmitido às células bacterianas filhas, porém sem matá-las. Os genomas de fagos integrados são denominados profagos, e as bactérias que os contêm são denominadas lisógenas (KASMAN & PORTER, 2021). Os profagos podem se converter de volta a um

ciclo de replicação lítica e matar seu hospedeiro, na maioria das vezes em resposta a mudanças nas condições ambientais (PTASHNE et al., 2006). No contexto de uso terapêutico, existe grande interesse nos fagos lisogênicos, uma vez que não matam naturalmente sua célula hospedeira, podendo ser induzidos a iniciarem seu ciclo lisogênico, o que facilita o processo de engenheiramento de fagos (MEILE et al., 2022). Porém, os fagos virulentos (que realizam ciclos líticos) não deixam de ser extremamente relevantes, pois sua grande habilidade reprodutiva e alta mortalidade da célula hospedeira o tornam atrativo para realização de terapias fágicas (MEILE et al., 2022).

Considerando sua capacidade de matar bactérias, estudos sugerem que possam ser usados, sozinhos ou em combinação com antibióticos, para tratar infecções bacterianas (DOMINGO CALAP & DELGADO MARTÍNEZ, 2018). Os primeiros registros de sua utilização para o tratamento de uma eventual doença, são relatados por Félix d’Hérelle, no ano de 1919, onde o pesquisador utilizou os primeiros “isolados”, denominados bacteriófagos, no combate a desinteria em alguns pacientes. Em seus registros, Félix d’Hérelle relata a melhora de um paciente após tratamento. Portanto, antes do surgimento dos primeiros antibióticos, por volta de 1940, os bacteriófagos já eram estudados e se conhecia seu potencial como agente antimicrobiano natural (WEI et al., 2020). Porém, como a maioria dos estudos nessa época eram escritos em Russo, estes não eram conhecidos no mundo ocidental. Quando, os resultados foram traduzidos e difundidos entre os cientistas de língua inglesa, estes foram vistos com ceticismo, pois a maioria dos ensaios clínicos não seguiram os padrões internacionais (CHANISHVILI et al., 2001).

Nesta época, os bacteriófagos deixaram de ser tão estudados, e os esforços se concentraram quase que todos nos estudos dos recém descobertos antibióticos (WEI et al., 2020). Apesar da crescente disponibilidade de medicamentos antimicrobianos seguros e eficazes, após a Segunda Guerra Mundial e mantidos no Ocidente até a década de 1980 (CHANISHVILI, 2016; CHANISHVILI, 2011), os bacteriófagos utilizados como tratamento antimicrobianos continuaram a ser usados na Rússia e na Europa Oriental, particularmente nos países anteriormente incluídos na União Soviética (ABEDON et al., 2011).

Com o aumento de bactérias multidrogas resistentes (MDR) em todo o mundo, juntamente com um declínio no desenvolvimento e produção de novos agentes antibacterianos, os estudos com bacteriófagos *in vitro* e *in vivo* voltaram a ser reconsiderados tanto nos Estados Unidos quanto na Europa (GUO et al., 2020). Além disso, os bacteriófagos

estão sendo usados na produção de alimentos e pecuária, e em um projeto financiado pela Comissão Europeia está avaliando coquetéis de fagos para tratar queimaduras infectadas por *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Comissão Europeia, 2018). No site ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>) existem diversos estudos clínicos sobre uma ampla gama de doenças e condições nas quais os bacteriófagos estão sendo testados (NLM, 2018).

1.2.1 Terapia com bacteriófagos ou Fagoterapia

Por definição, a terapia com bacteriófagos, ou fagoterapia, é a utilização terapêutica de vírus capazes de infectar e lisar/eliminar bactérias e/ou biofilmes bacterianos, de modo a não apresentar riscos às demais células presentes em organismos de mamíferos (GÓRSKI et al., 2020). A fagoterapia é uma área de estudo muito atrativa, devido principalmente à habilidade natural dos bacteriófagos em agir como agentes antimicrobianos específicos, se encaixando como excelente alternativa ao tratamento com antibióticos (GÓRSKI et al., 2020).

Os fagos são a entidade biológica mais diversa e abundante do planeta, sua magnitude na biosfera do planeta terra é estimada na ordem de 10^{31} . O tamanho de seu genoma é relativamente pequeno (5-735 kb), o que lhe confere uma estrutura simples e de fácil manipulação (SHENGJIAN et al., 2020). Apesar de existir uma grande quantidade de estudos sobre os fagos, pouco se sabe sobre as diversas cepas existentes, sobre os diferentes genomas em cada espécie, e seus mecanismos específicos de ação (GÓRSKI et al., 2020). A grande variedade de organismos a se explorar, bem como as inúmeras possibilidades que estão à mercê de descobertas, provenientes de estudos futuros, tornam a terapia com fagos ainda mais atrativa para a ciência e medicina moderna (GÓRSKI et al., 2020).

Apesar de seu potencial, a fagoterapia apresenta limitações. As barreiras primárias que limitam a técnica são principalmente a estreita faixa de hospedeiros que os fagos possuem, e a capacidade de resistência e defesa das bactérias contra ameaças externas. A estreita faixa de hospedeiros que os fagos possuem, isso limita que a terapia seja efetiva em infecções com múltiplas cepas bacterianas. Com relação à resistência e defesa das bactérias, essas possuem a capacidade de impedir a entrada de material genético exógeno (genoma viral); através da maquinaria CRISPR-Cas identificam e degradam o material genético estrangeiro; e são

capazes de guardar um pequeno fragmento do DNA invasor, criando assim um sistema de memória imunológica (ROSTOL et al., 2019). Portanto, ambas barreiras limitam a eficiência do tratamento e impedem que este possua uma alta taxa de sucesso (GUO et al., 2021).

Como barreiras limitantes secundárias, existe a necessidade dos bacteriófagos serem entregues diretamente em suas bactérias alvo. No entanto, apesar de sua habilidade em esvair-se do sistema imunológico humano, estes são facilmente degradados quando expostos a ambientes externos não favoráveis para sua proliferação (GUO et al., 2021). Outra limitação está relacionada às doses, ou concentração de fagos por dose. Os bacteriófagos não sobrevivem a ambientes desfavoráveis, portanto, precisam ser adicionados a uma solução ou transportador, que realizará o seu transporte até as bactérias alvo, proporcionando um ambiente externo favorável e controlado. Comumente, utiliza-se hidrogéis para transportar a solução de fagos ou aplicá-la na região de infecção, porém isso acaba por limitar a concentração de fagos, que poderá limitar a eficácia do tratamento de bacteriófagos. (JOHNSON et al., 2014; BEAN et al., 2014; SOUZA et al., 2008). Cabe ressaltar, que o transporte, a concentração e o tempo de tratamento, são extremamente difíceis de medir e padronizar, pois estes podem ser variáveis para os diferentes tipos de fagos utilizados no tratamento, bem como para as bactérias a serem tratadas, o que particularmente dificulta as aplicações em testes clínicos (ROSTOL et al., 2019).

1.3 Engenharia de bacteriófagos para fagoterapia

Considerando as limitações que a terapia com fagos apresenta, os estudos mais recentes na área têm se direcionado para as técnicas de aprimoramento dos vírus. A biologia sintética, uma das inúmeras áreas dentro da biotecnologia, tem se destacado como principal solução para essas limitações, e tem permitido o desenho de um novo e promissor cenário para a fagoterapia, no qual é possível projetar e programar os organismos virais em novos sistemas biológicos (GÓRSKI et al., 2020).

Dentre a infinidade de possibilidades que a biologia sintética oferece, as principais mudanças estudadas e realizadas em bacteriófagos, visam principalmente: ampliar a faixa de hospedeiros do fago, com modificações nos genes codificadores das proteínas de cauda do bacteriófago, que é o conjunto de proteínas responsáveis por se ligarem a um receptor

específico na superfície da membrana bacteriana, chamada etapa de adsorção, que é a primeira etapa no processo de infecção da bactéria hospedeira pelo bacteriófago (LE et al., 2013); aumentar a segurança de sua utilização, ao remover sequências responsáveis por sua virulência; integrar novas sequências exógenas específicas em seu genoma, para que o bacteriófago seja capaz de atingir alvos extremamente específicos, ou até serem utilizados como vetores de transporte dessas sequências exógenas para dentro das bactérias. (BARBU et al., 2016; SHENGJIAN et al., 2020).

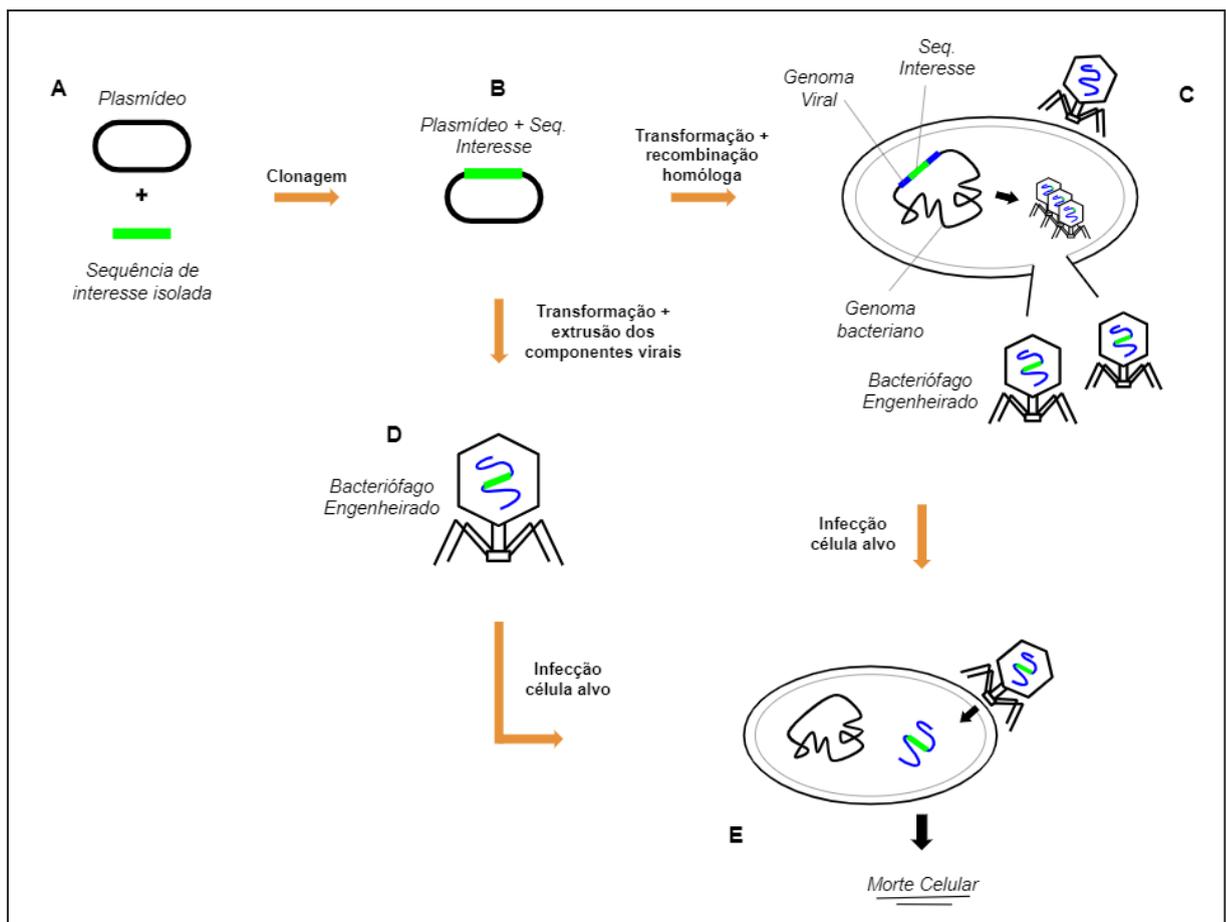
Neste estudo, o foco será direcionado para o melhor entendimento das mudanças que visam a inserção de sequências, ou genes codificadores de proteínas, exógenos ao genoma do bacteriófago, o que por sua vez também acarreta ao fago a característica de vetor para transporte de tais sequências (MEILE et al., 2022). A Figura 1, demonstra de forma resumida e simplificada de como o genoma viral do bacteriófago pode ser modificado ou engenheirado, e assim ter uma sequência exógena de interesse adicionada ao seu genoma.

A técnica inicia com a escolha de um plasmídeo ou fagomídeo, que será a base para clonagem da sequência de interesse isolada e amplificada e que contém adicionada em suas extremidades regiões de homologia ao genoma viral (Figura 1A e 1B). Fagomídeo (traduzido do inglês, *phagemid*), é um plasmídeo que carregará uma sequência ou um conjunto de sequências codificadoras de proteínas específicas, juntamente com trechos específicos de um bacteriófago, como sua origem de replicação, sequências responsáveis pelo empacotamento de seu material genético e até mesmo uma proteína de fusão (GOERING et al., 2018). Fagomídeos são comumente utilizados como vetores, para estudos de enovelamento de sequências específicas, bem como para o estudo de funções proteicas, ou até mesmo para a produção em massa de proteínas, podendo ser utilizados também para expressão de biomoléculas, em uma técnica chamada *phage display* (PECORARO, 2016).

Uma vez clonado, o plasmídeo agora contendo o enxerto genético, pode ser transformado em uma bactéria que previamente foi infectada com o bacteriófago alvo do engenheiramento, gerando um profago (Figura 1C). Nessa etapa, o enxerto que agora está clonado em diversos plasmídeos, e que contém em suas extremidades sequências homólogas ao local onde se deseja que este seja inserido no genoma viral, realizará a recombinação homóloga e irá se inserir no genoma do vírus.

Após a inserção do enxerto, por recombinação homóloga, será feito um processo de indução, instigando o início do ciclo lítico, onde os vírus resultantes serão os recombinantes, ou seja, vão possuir em seu genoma a “carga genética de interesse” (do inglês, *payload*) (MEILE et al.; 2022). Uma outra possibilidade para se adicionar o enxerto exógeno no genoma viral, é o contato direto deste com o próprio vírus de interesse (Figura 1D), onde a carga genética exógena será anexada ao genoma, mais uma vez, por recombinação homóloga, devido a suas regiões flanqueadoras guias (PARK et al., 2017). Por fim, o bacteriófago engenheirado será utilizado para infecção da bactéria alvo (Figura 1E), desencadeando assim uma série de acontecimentos intracelulares ou extracelulares, que eventualmente levam à morte do organismo ou até mesmo à morte dos organismos que o cercam.

Figura 1 - Inserção de sequência exógena de interesse no genoma do bacteriófago



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 1. A) Plasmídeo (preto), vetor primário a ser utilizado para carregar a sequência ou conjunto de sequências de interesse, isolada e amplificada (verde); B) Plasmídeo ou fagomídeo contendo sequência de interesse integrada; C) Plasmídeo: transformação de linhagem bacteriana alvo já infectada previamente pelo bacteriófago alvo do engenhieramento. A região de interesse se insere no genoma do fago (que já está integrado ao genoma bacteriano, estado de latência) por meio de recombinação homóloga, e os fagos resultantes do processo de indução, são formados contendo o genoma viral novo e enxertado com a sequência de interesse; D) Via alternativa: fagomídeo é transformado diretamente na linhagem bacteriana alvo, e por meio plasmídeos ajudantes (*helpers plasmids*), a sequência de interesse se funde a proteínas do capsídeo do bacteriófago, produzidos dentro da bactéria. O capsídeo com material genético enrolado, é eliminado por extrusão da bactéria dando origem ao bacteriófago engenheirado, não levando a bactéria a morte por lise.; E) Fagos enxertados são utilizados em ensaios de infecção da bactéria alvo e sua eficiência de eliminação da população bacteriana pode ser medida.

1.3.1 Enxertos de ação intracelular e extracelular

Uma das principais técnicas utilizadas ao se engenheirar um vírus, é transformá-lo em um vetor carregador de uma sequência de interesse, ou enxerto, que será transportado até um organismo alvo. Tais enxertos podem desencadear uma série de acontecimentos dentro de seu organismo alvo. Através da integração em seu genoma, o material genético exógeno se aproveita dos processos de tradução e transcrição do hospedeiro, o que permite a técnica ser utilizada desde a produção em massa de proteínas ou substâncias, até como precursores de morte celular (MEILE et al., 2022)

Atualmente, existem diversos estudos que mapeiam os diferentes acontecimentos que podem ser desencadeados no organismo bacteriano com a inserção de material exógeno por meio de um bacteriófago como seu vetor. Aqui focaremos em dois, os enxertos desencadeadores de efeitos extracelulares e os desencadeadores intracelulares, sendo sua finalidade o controle de atividade bacteriana, ou seja, morte do organismo alvo/hospedeiro (MEILE et al., 2022).

Os enxertos que são denominados de ação extracelular, estão principalmente relacionados a utilização de um vetor viral temperado, que promove o ciclo lítico após inserção de seu conteúdo genético na bactéria, e eventualmente leva o organismo a morte por lise de sua parede celular (Figura 2A), liberando assim compostos, proteínas, toxinas, enovelados a partir do enxerto introduzido, que são capazes de atuar nas bactérias vizinhas,

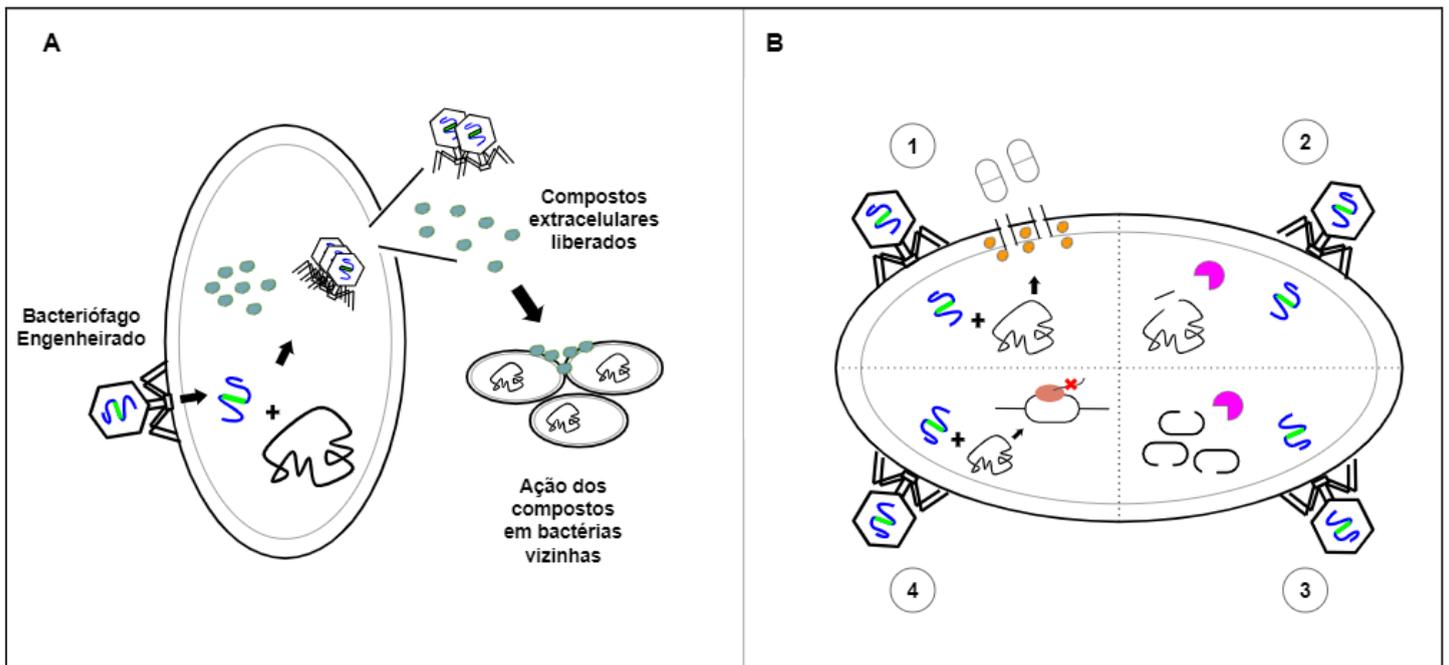
causando danos em suas paredes celulares, interferindo em seus fatores de comunicação e até rompendo biofilmes (MEILE et al., 2022).

Para a terapia fágica, os bacteriófagos temperados ainda não são de grande interesse, mesmo possuindo uma maior eficácia quando o objetivo é a indução de morte bacteriana, pois ao se lisar a bactéria, são liberadas no ambiente a seu redor grandes quantias de subprodutos, que muitas vezes são tóxicos e podem desencadear reações inflamatórias, o que acaba por gerar danos colaterais indesejados a células não alvo (LIU et al., 2021). Logo, são muito utilizados e preferidos os bacteriófagos de ciclo lisogênico (MEILE et al., 2022), que assim como no mecanismo descrito na Figura 1, se aderem ao genoma bacteriano e acabam por gerar compostos, proteínas, toxinas, que agem internamente no organismo bacteriano, ou seja, a morte celular é gerada por um efeito intracelular (Figura 2B). Sua ação interna garante que, no processo de combate a atividade microbiana, não sejam liberados citotoxinas ou superantígenos no momento da morte bacteriana, protegendo o ambiente externo de eventuais danos colaterais que acabam por agravar a infecção bacteriana, prejudicando a eficácia ao tratamento e até causando danos indesejáveis ao paciente (MEILE et al., 2022). É importante notar que, recentes avanços em técnicas de biologia sintética tem permitido estudos que utilizam fagos temperados para realização das edições genéticas e eventual combate efetivo da atividade microbiana, porém, ainda a utilização de fagos lisogênicos é mais segura (GÓRSKI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2019).

Os enxertos de ação interna podem desencadear respostas diferentes dentro da bactéria, que serão responsáveis por combater e/ou neutralizar a atividade microbiana. Dentre as respostas mais comuns, o enxerto pode carregar sequências codificadoras de proteínas capazes de sensibilizar a membrana bacteriana, tornando as bactérias susceptíveis a ação de fármacos (Figura 2.B1) (HAGENS et al., 2004; HAGENS & BLASI et al., 2003); pode carregar uma maquinaria proteica de remoção ou neutralização de genes promotores de resistência e virulência bacteriana (EDGAR et al., 2012; LU, 2009; LU, 2007), tornando as bactérias mais suscetíveis ao tratamento com antibióticos ou levando-as diretamente à morte (Figura 2.B2); essa mesma maquinaria proteica, pode ser responsável pela remoção ou neutralização de genes de virulência nos plasmídeos bacterianos (Figura 2.B3), removendo a capacidade da bactéria em perpetuar sua virulência; o enxerto pode carregar sequências capazes de ocasionar danos pontuais no genoma bacteriano, de modo a induzir sua morte por

perda de funcionalidades vitais, como perda da capacidade de transcrição e tradução protéica (Figura 2.B4) (MORADPOUR et al., 2009).

Figura 2 - Exemplos de enxertos de ação extracelular e intracelular



Fonte: Adaptado e legendado de MEILE et al., 2022

Figura 2. A) *Enxertos de ação extracelular.* Bacteriófago temperado insere uma sequência codificadora de proteínas, ou substâncias, capazes de agir nas células vizinhas. Uma vez que o organismo hospedeiro inicial é morto por lise, as substâncias são liberadas e agem interferindo na comunicação ou degradando a membrana externa, eventualmente, matando as bactérias ao redor, sendo muito útil no combate a biofilmes bacterianos;

B) *Enxertos de ação intracelular.* B1) Sequência exógena inserida no genoma do bacteriófago é introduzida na bactéria e se acopla no genoma bacteriano, entrando em lisogenia. Durante processos de transcrição e tradução, serão produzidas proteínas que agem na membrana celular, tornando-a permeável a medicamentos; B2) O enxerto carrega sequência codificadora de enzimas com potencial para clivagem ou danificação do genoma bacteriano, como por exemplo, sistemas CRISPR-Cas, responsáveis por clivar ou danificar regiões específicas do genoma, genes essenciais, de virulência ou de resistência a antibióticos. A remoção ou danificação desses genes pode tornar a bactéria suscetível a tratamentos medicamentosos, bem como levá-la a morte celular; B3) A remoção de genes de virulência e resistência, pode ocorrer a nível plasmidial, neutralizando a capacidade da bactéria em prosperar ambos os genes; B4) Enxerto com sequências codificadoras de proteínas que agem impedindo o processo de replicação do genoma bacteriano, assim como impedindo a produção proteica, levando o organismo a morte (MEILE et al., 2022).

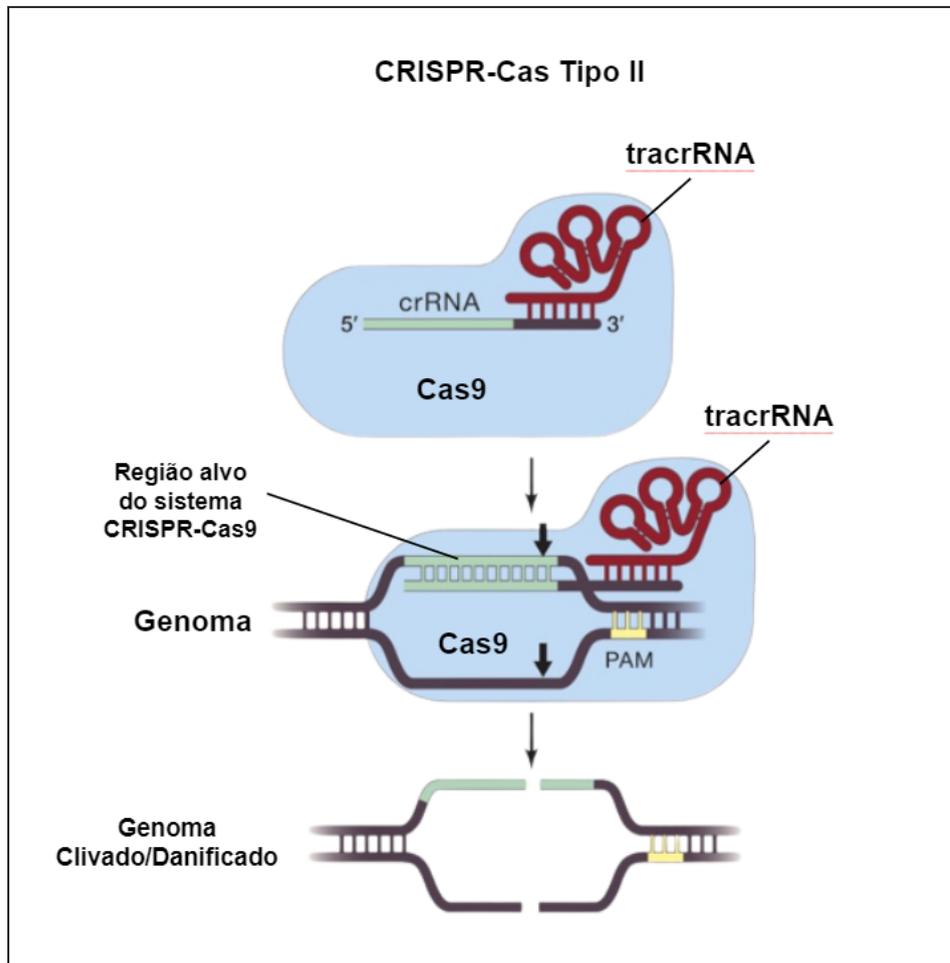
1.4 Enxertos de ação intracelular

1.4.1 CRISPR-Cas9 Tipo II

Neste trabalho, abordaremos uma das várias técnicas que envolvem a utilização de enxertos de ação intracelular na terapia com fagos engenheirados. Será descrito o mecanismo de ação da técnica que envolve a inserção de um conjunto de genes codificadores do sistema proteico CRISPR-Cas, associado a um espaçador, que irá gerar um RNA guia ou crRNA (CRISPR RNA), o qual, eventualmente, irá guiar o sistema de CRISPR-Cas até a região alvo no genoma bacteriano (ou genoma plasmidial bacteriano). Os sistemas de CRISPR que se utilizam de RNA guia, são os sistemas de CRISPR tipo I, II e IV (HILLE et al., 2018). Iremos abordar a maquinaria de CRISPR tipo II (Figura 3), que se utiliza da proteína Cas9, mais RNA guia (crRNA), para direcionar e realizar cortes no material genético (HILLE et al., 2018).

A sigla CRISPR, do inglês, se refere a *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Inter-espaçadas, que são pequenas sequências encontradas no genoma bacteriano, mais especificamente no *loci* CRISPR, onde os nucleotídeos se repetem continuamente de forma palindrômica. Essas sequências repetidas, são inter-espaçadas por sequências não codificadoras denominadas espaçadoras (*spacers*), que são cópias de trechos de materiais genéticos virais exógenos. A presença dos espaçadores entre as sequências palindrômicas continuamente repetidas, somadas ao complexo protéico das proteínas *Cas*, conferem à bactéria uma espécie de “sistema imune” contra a ação de bacteriófagos. Isto permite que o complexo CRISPR-Cas seja guiado pelo RNA guia, gerado a partir da região espaçadora, e clive o material genético exógeno inserido na bactéria, e até mesmo permite que a bactéria gere uma memória imunológica contra esses invasores, ao se apoderar e incorporar de um pequeno trecho do genoma invasor em seu próprio genoma (HILLE et al., 2018; ROSTOL et al., 2019).

Figura 3 - CRISPR-Cas Tipo 2



Fonte: Adaptado e legendado de HILLE et al., 2018

Mesmo possuindo função primária de defesa contra invasores, a maquinaria de CRISPR-Cas pode ser manipulada e programada, para que ao ser inserida dentro de um organismo, possa clivar e até editar regiões específicas no genoma alvo (HILLE et al., 2018).

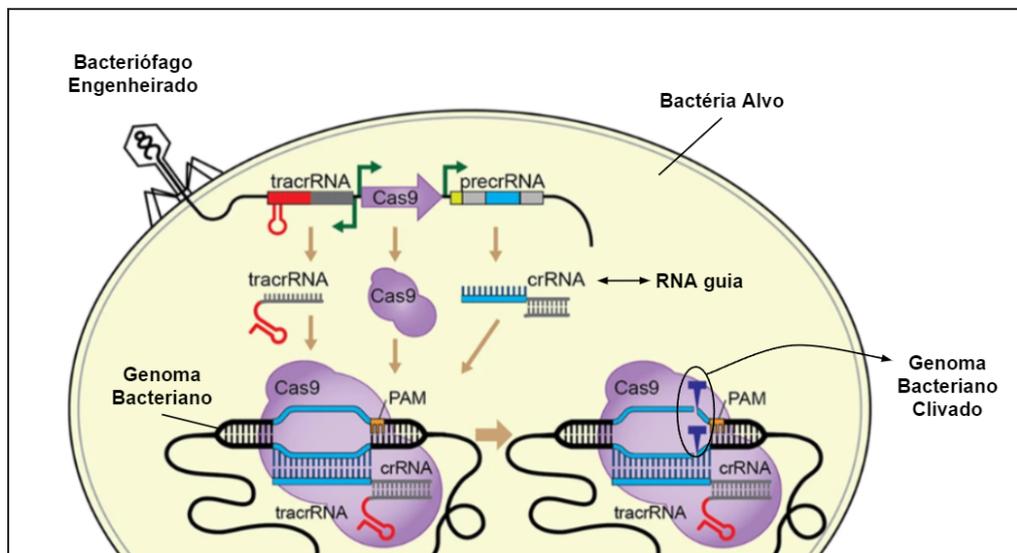
No contexto da terapia com fagos, a maquinaria de CRISPR-Cas pode ser inserida no genoma de um bacteriófago, como um enxerto de ação interna e, conseqüentemente pode ser programada para agir no genoma bacteriano, clivando genes de interesse e levando a bactéria a morte (MEILE et al., 2022).

1.4.2 Enxerto programável de CRISPR-Cas9 Tipo II

O enxerto a ser inserido no bacteriófago, para que possa ser devidamente programado, deve conter: sequência codificadora da proteína Cas9; sequência codificadora de espaçador (ou espaçadores), também denominada de região pré RNA guia (precrRNA), que dará origem ao RNA guia (crRNA); sequência codificadora do RNA transativador (tracrRNA), que é uma sequência, em forma de grampo, complementar a sequência de nucleotídeos repetidos que acompanha o RNA guia, e que futuramente se anexará ao RNA guia, formando um pequeno complexo proteico que guiará e auxiliará, a proteína Cas9, no processo de chegada e acoplagem no local alvo do genoma bacteriano. São necessárias também a sequência promotora (*promoter sequence*), regiões de início e final da transcrição, e por fim, sequência referente a região PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), região responsável por atuar na etapa de acoplamento da proteína Cas9 a região alvo do genoma a ser clivado (ANDERS et al., 2014).

Uma vez o enxerto inserido no fago, este passa a atuar como um vetor de entrega (Figura 4), que ao ter contato com a bactéria alvo, insere tais sequências no genoma bacteriano e assim se utiliza de seu sistema de produção proteica, para editar, clivar ou danificar regiões específicas do genoma bacteriano (HILLE et al., 2018; MEILE et al., 2022).

Figura 4 - Construção sistema CRISPR-Cas9 e inserção na bactéria alvo



Fonte: Adaptado e legendado de PARK et al., 2017.

Apesar de apresentar grande potencial, a utilização dos fagos ainda precisa de muito estudos e testes, para que se possa compreender melhor seus mecanismos de ação bem como as maneiras de se aumentar a efetividade de sua utilização em tratamento clínico (BIKARD et al., 2014). Portanto, tanto análises da literatura quanto estudos experimentais são de extrema importância para o avanço do conhecimento nessa área.

2) OBJETIVOS

A presente revisão sistemática, teve como objetivo principal revisar as evidências científicas existentes, acerca do tema: modificação ou engenheiramento de bacteriófagos, cujo objetivo final é seu uso como um sistema de entrega da maquinaria exógena de CRISPR-Cas 9 tipo II, para controle da atividade microbiana de *Staphylococcus aureus*, sendo a priori, a aplicação destes em terapias fágicas.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Entender a fagoterapia e seu potencial para combate a bactérias resistentes a antibióticos;
- Ressaltar a importância de se buscar novas alternativas para os tratamentos com antibióticos;
- Compreender como os avanços nas pesquisas tem possibilitado a quebra de barreiras que hoje limitam a terapia com fagos;
- Compreender a técnica de entrega da maquinaria de CRISPR através de bacteriófagos;
- Discutir as metodologias adotadas e os resultados obtidos pelos artigos científicos que se adequaram aos critérios de elegibilidade, e que vieram a compor essa revisão;
- Ressaltar os principais achados no combate às bactérias *Staphylococcus aureus* e as perspectivas futuras com a metodologia utilizada.

3) METODOLOGIA

Este estudo se baseia em uma revisão sistemática que seguiu as recomendações “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses” (PRISMA). Para o presente trabalho foram analisadas extensamente quatro bases de dados, em busca de artigos/estudos sobre o tema e que atendessem aos critérios de elegibilidade.

3.1 Critérios de Elegibilidade

Para guiar a seleção de estudos, foram definidos critérios de elegibilidade. Os critérios adotados para guiar a exclusão de anúncios não relevantes para a dissertação são: (1) estudos que não utilizam fagos modificados para entrega da maquinaria de CRISPR-Cas9 tipo II e combate da atividade microbiana da bactéria *Staphylococcus aureus*; (2) pesquisa não disponível nos idiomas inglês, espanhol ou português; (3) estudos com texto completo não disponível; (4) revisões sistemáticas, meta-análises, relatos de casos e teses de doutorado sem artigos publicados, ou resumos que foram publicados em anais de congressos (sem artigo).

3.2 Bases de Dados

Os estudos foram coletados após extensa pesquisa bibliográfica nas seguintes bases de dados eletrônicas: Portal CAPES Periódicos (maio de 2014 a fevereiro de 2022), Scopus (janeiro de 2017 a março de 2017), PubMed (março de 2017) e Google Acadêmico (novembro de 2014 a fevereiro de 2022). Buscou-se utilizar os operadores booleanos e palavras-chaves de forma padronizada nas bases de dados, foram esses: [Bacteriophage] AND [Delivery] AND [CRISPR] AND [“Guided Nuclease”] AND [“Staphylococcus aureus”]. A conjunção “E” foi utilizada pois para a elegibilidade, todos deveriam conter os termos pesquisados.

3.3 Seleção dos Estudos

Para a seleção dos estudos que comporiam o presente trabalho, a busca por artigos, assim como a conferência dos critérios de elegibilidade, foram feitos por dois pesquisadores distintos. Artigos que atenderam aos critérios de elegibilidade, tiveram seus textos completos revisados, e apenas artigos selecionados por ambos pesquisadores foram considerados elegíveis para a dissertação e avaliação.

3.4 Processo de Coleta de Dados e Lista de Dados

Após leitura dos artigos, foram extraídos e compilados, na Tabela 1, os seguintes dados chave de cada artigo: fago utilizado como transportador da nuclease; linhagem de *S. aureus* usada para os experimentos; nuclease exógena responsável pela ação antimicrobiana; gene alvo da nuclease ou alvo dentro da bactéria; foi testado *in vitro*? e foi testado *in vivo*?

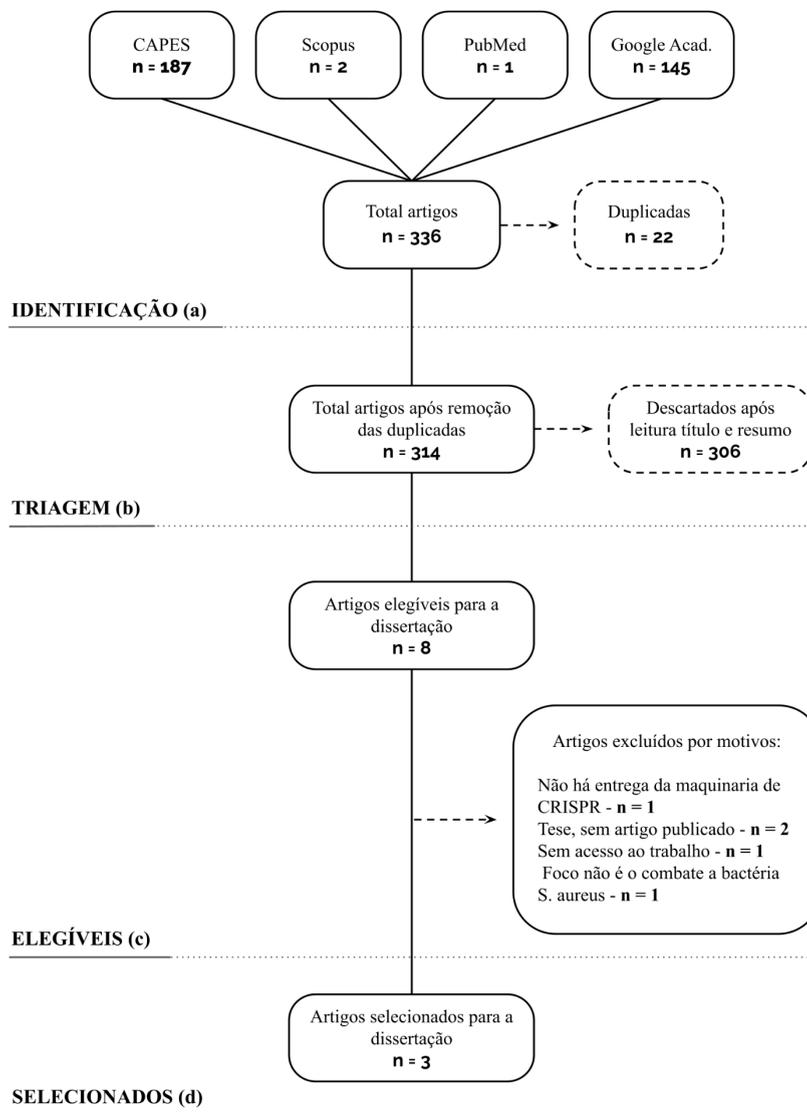
O fluxograma de testes e experimentos dos trabalhos, foi descrito resumidamente na Tabela 2, enquanto o desenho experimental, principais achados e perspectivas futuras, foram abordados nas seções 4.2 e 4.4.

4) RESULTADOS

A fase inicial, identificação de artigos nas bases de dados, resultou em um total de 336 artigos. Do total de artigos encontrados na etapa identificação, e compilados na plataforma EndNote, 22 artigos duplicados foram excluídos, como consta na Figura 5a. A fase seguinte foi a triagem, onde após a leitura de título, resumo e palavras chave, 308 artigos foram excluídos por não estarem de acordo com o tema (Figura 5b). Em sua grande maioria, os artigos não apresentavam os fatores cruciais para elegibilidade ou não atendiam ao objetivo do trabalho. Foi encontrada uma grande quantidade de revisões sistemáticas, e estudos onde o objetivo não era o combate às cepas de *S.aureus*.

A terceira etapa foi de leitura integral e verificação, quanto aos critérios de elegibilidade, dos 8 artigos classificados como elegíveis para a revisão. Dos 8 artigos, 5 foram excluídos pelos motivos: não havia entrega da maquinaria de CRISPR; não possuíam acesso; não eram artigos publicados; não utilizavam bactéria *S. aureus* (Figura 5c). A seleção final resultou em 3 artigos, que atenderam os critérios de elegibilidade (Figura 5d).

Figura 5 - Fluxograma da seleção de artigos, de acordo com a metodologia PRISMA.



Fonte: Elaborada pelo autor

4.1 Nacionalidade

Seguindo ordem cronológica crescente do ano de publicação dos artigos selecionados para essa revisão sistemática, temos o primeiro, publicado no ano de 2014, referenciado neste trabalho como **Bikard (2014)** (BIKARD et al., 2014), produzido pelo Grupo de Biologia Sintética no Instituto Pasteur, localizado em Paris, França, em parceria com o Laboratório de Bacteriologia na Universidade Rockefeller, em Nova York, Estados Unidos .

O segundo artigo, na ordem crescente, é o artigo publicado em 2017 referenciado aqui como **Park (2017)** (PARK et al., 2017), produzido no Departamento de Ciências Básicas, dentro da Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade do Mississippi, Estados Unidos. em parceria com o Departamento de Microbiologia, dentro da Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade Nacional de Seul, em Seul, capital da Coreia do Sul. Por último, temos o mais recente dos três artigos, publicado em 2019, referenciado aqui como **Cobb (2019)** (COBB et al., 2019) e que foi produzido no Departamento de Engenharia Agrícola e Biológica na Universidade do Mississippi, Estados Unidos.

4.2 Desenho Experimental

Dentre os artigos selecionados para essa revisão, todos tem como princípio a utilização e exploração de uma das funções base da maquinaria de CRISPR existente nos organismos bacterianos, ou seja, sua capacidade de edição genética. Coincidentemente, todos os 3 artigos (BIKARD et al., 2014; PARK et al., 2017; COBB et al., 2019) se utilizaram de genes, para a maquinaria de CRISPR-Cas9 tipo II, extraídos de linhagens da bactéria *Streptococcus pyogenes*, que possui mesma classe e ordem das bactérias *Staphylococcus aureus*.

Com relação ao processo inicial de criação do fago engenheirado, um dos artigos utilizou um fagomídeo para inserir material genético desejado no bacteriófago (BIKARD et al., 2014). Os outros dois artigos introduziram o material genético ao genoma do fago por recombinação homóloga (PARK et al., 2017; COBB et al., 2019).

Para Bikard (2014), o fago utilizado para engenheiramento foi o Φ NM1, e a primeira linhagem de *S. aureus* utilizada para criação do fago, para os primeiros experimentos e testes *in vivo*, foi a linhagem RN4220 (KREISWIRTH et al., 1983). A segunda linhagem testada, apenas para testes *in vitro*, foi a USA300 MRSA (DIEP et al., 2006). Para Park (2017) e Cobb (2019), o fago escolhido para engenheiramento foi o Φ SaBov, e a linhagem de *S. aureus* utilizada para criação/geração do fago engenheirado foi a RF122, e para os testes *in vitro* e *in vivo*, foi utilizada a linhagem CTH96, e a linhagem ATCC 6538.

Para os testes iniciais, *in vitro*: em 2 dos 3 artigos, Bikard (2014) e Park (2017), foram realizados ensaios para comprovar a funcionalidade e eficácia do bacteriófago, após engenheirado. Para os estudos de Cobb (2019), o fago foi diretamente testado em um ensaio de kirby bauer, também conhecido como antibiograma ou teste de sensibilidade a antimicrobianos. Quanto aos testes *in vivo*, Bikard (2014) e Park (2017) apresentaram similaridades, ao testarem a eficácia de ação antimicrobiana do bacteriófago em infecções na pele das costas de camundongos, enquanto Cobb (2019) desenvolveu um método de ensaio *in vivo*, que se aproxima do quadro mais comum de infecções por *S. aureus*, onde se é formado um biofilme bacteriano. O método permitiu estudar e quantificar a eficiência de se utilizar bacteriófagos modificados, no tratamento de osteomielite e infecção tecidual, causada por *S. aureus*.

Em Park (2017) e Cobb (2019), o gene alvo da nuclease Cas9 exógena, cuja sequência codificadora era carregada dentro do bacteriófago, foi o conjunto de genes *nuc1* e *nuc2*, genes codificadores de nucleases, presentes na grande maioria das linhagens de *S. aureus* (HU et al., 2012). Os genes alvo das nucleases, utilizados por, Bikard (2014), foram os responsáveis por conceder às bactérias resistência aos antibióticos: gene *mecA*, que confere resistência à meticilina; e o gene *aph-3*, que confere resistência à canamicina. Em adição, Bikard (2014) também utilizou o gene *sek*, responsável pela codificação de enterotoxinas, desencadeadoras de forte efeito inflamatório, como alvo de estudos.

Todos os 3 artigos selecionados para essa revisão, se utilizam de GFP (*green fluorescent protein*) para marcação das linhagens de *S. aureus*, com o objetivo de quantificar os resultados da ação antimicrobiana do bacteriófago engenheirado. Em Bikard (2014) e Park (2017), as linhagens de *S. aureus* utilizadas nos testes foram transformadas com plasmídeos carregando a sequência codificadora da proteína GFP, enquanto Cobb (2019) integrou a sequência codificadora no genoma do bacteriófago.

A Tabela 1 abaixo compila de forma visual partes chave do desenho experimental de cada artigo e a Tabela 2 mostra um fluxograma resumido dos testes e experimentos realizados nos estudos incluídos na revisão sistemática.

Tabela 1 - Características chave dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Referência (Ano); Nacionalidade	BIKARD et al. (2014); Estados Unidos	PARK et al. (2017); Estados Unidos	COBB et al. (2019); Estados Unidos
Fago Selecionado para o Estudo	Φ NM1	Φ SaBov	Φ SaBov
Linhagens de <i>S. aureus</i> Utilizadas no Estudo	Linhagem RN4220 e Linhagem USA300	Linhagem RF122 e Linhagem CTH96	Linhagem RF122 e Linhagem ATCC 6538
Nuclease Exógena	Maquinaria CRISPR-Cas9 tipo 2 <i>S. pyogenes</i> (NR*)	Maquinaria CRISPR-Cas9 tipo 2 <i>S. pyogenes</i> Linhagem SF370	Maquinaria CRISPR-Cas9 tipo 2 <i>S. pyogenes</i> Linhagem SF370
Gene Alvo do Estudo	Gene <i>mecA</i> , Gene <i>aph-3</i> e Gene <i>sek</i>	Genes <i>nuc</i>	Genes <i>nuc</i>
Testado <i>in vitro</i>?	Sim. Linhagens RN4220 e USA300	Sim. Linhagens RF122 e CTH96	Sim. Linhagens RF122 e ATCC 6538
Testado <i>in vivo</i>?	Sim. Teste infecção cutânea, costas de camundongos. Linhagem <i>S. aureus</i> RN4220.	Sim. Teste infecção cutânea, costas de camundongos. Linhagem <i>S. aureus</i> CTH96.	Sim. Teste infecção tecido mole e ósseo, fêmur de camundongos. Linhagem <i>S. aureus</i> ATCC 6538.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 1. Legenda: NR* = não relatado a linhagem de *S. pyogenes*.

Tabela 2 - Fluxograma de testes e experimentos dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Referência (Ano); Nacionalidade	Etapas do Método Experimental (Fluxograma Sinóptico)
BIKARD et al. (2014); Estados Unidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Criação fago modificado; 2. Teste de eficácia na eliminação de genes de resistência específicos, <i>in vitro</i>, versus performance de fármacos; 3. Teste de eficácia na eliminação de plasmídeos, na bactéria, responsáveis por perpetuar e transferir a virulência; 4. Teste de eficácia de ação do bacteriófago criado, possuído duas sequencias como alvo; 5. Teste eficácia do fago criado em modelo de infecção cutânea, <i>in vivo</i>; versus performance de fármacos;
PARK et al. (2017); Estados Unidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Criação fago modificado; 2. Teste de eficácia na eliminação de gene responsável pela virulência (genes <i>nuc</i>); 3. Teste eficácia do fago criado em modelo de infecção cutânea, <i>in vivo</i>; 4. Modificações específicas no genoma do fago criado, visando aumentar o espectro de infecção e diminuição da virulência e toxicidade; 5. Teste para verificar eficácia das modificações, <i>in vitro</i>.
COBB et al. (2019); Estados Unidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Criação de um nova linhagem de <i>S. aureus</i> modificada, capaz de expressar GFP, visando facilitar as medições qualitativa e quantitativa dos resultados; 2. Utilização do fago modificado criado por Park et al., 2017 para teste de eficácia na eliminação de biofilme bacteriano, em comparação com a eficácia de fármacos existentes, <i>in vitro</i>; 3. Criação de um modelo de estudo e teste, da viabilidade de tratamento, do tecido mole e ósseo, infectado por linhagem de <i>S. aureus</i> formadora de biofilme bacteriano

Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 Principais achados e perspectivas futuras

4.4.1 Bikard (2014)

Em Bikard (2014) o bacteriófago utilizado e modificado, foi o Φ NM1. Dentro dos ensaios *in vitro*, o bacteriófago engenheirado conseguiu, de forma bem sucedida, eliminar/clivar as regiões no genoma bacteriano da linhagem RN4220 de *S. aureus* onde estavam localizados os genes *mecA* e *aph-3*. Os genes foram clivados com alta especificidade, afetando apenas as bactérias alvo, levando-as à morte e não gerando danos colaterais às bactérias/células não alvo.

Ainda sobre os ensaios *in vitro*, além de ação efetiva e específica obtida na eliminação de trechos do genoma bacteriano, Bikard (2014) obteve sucesso na eliminação de DNA plasmidial. O bacteriófago construído Φ NM1, conseguiu eliminar por completo os plasmídeos alvos do teste, mais especificamente, os plasmídeos *pUSA02*, responsáveis por conferir e perpetuar a resistência a tetraciclina na linhagem, USA300 de *S. aureus*. Em seus testes, a remoção dos plasmídeos não levou as bactérias à morte, porém sensibilizou a linhagem a ação dos antibióticos.

Após tais resultados, Bikard (2014) testou a eficiência de ação do bacteriófago engenheirado ao possuir duas sequências alvo distintas dentro de *S. aureus*. Primeiro, testou como alvo dois genes diferentes no genoma bacteriano (gene *sek*, codificador de enterotoxina, e uma segunda porção do gene *mecA*). Em seguida, realizou o mesmo teste, porém agora com DNA plasmidial como alvo (plasmídeo *pUSA01* e *pUSA02*). Por fim, testou também a mistura de alvos entre DNA do genoma bacteriano e DNA plasmidial. Os resultados desses ensaios foram extremamente positivos, confirmando a capacidade do bacteriófago, de agir efetivamente ao se possuir dois alvos, e ainda eliminar 100% das linhagens resistentes, neutralizando sua habilidade de perpetuar a virulência, o que pode ser muito útil durante tratamentos de infecções onde existam cepas mutantes.

Bikard (2014) ao se utilizar de fagomídios na construção do bacteriófago modificado, relata uma limitação da técnica, que inviabiliza a utilização dos fagomídeos em experimentos futuros. Quando utilizado, impede a etapa de morte da bactéria por lise e, conseqüente liberação dos fagos engenheirados, o que torna sua utilização praticamente inviável, pois em

cenários de tratamento realista, não ideal, para que a técnica fosse efetiva, seriam necessárias quantias de fagomídeos maiores que a população bacteriana a ser combatida no tratamento.

Como próximos passos, Bikard (2014) sugere que essa etapa, onde ele se utilizou do fagomídeo, seja melhor investigada e que outras técnicas sejam exploradas, bem como ressalta a importância de se conhecer o genoma do fago por completo e explorar melhor diferentes modelos de transporte (ou carregadores) dos bacteriófagos até o local de infecção. Como última ressalva, comenta sobre a importância de explorar técnicas para ampliar o espectro de infecção do fago, já que esta é uma das grandes barreiras que limitam a terapia com bacteriófagos (GUO et al., 2021).

4.4.2 Park (2017)

Analisando Park (2017), vemos certa complementaridade, entre seus testes realizados e os próximos passos sugeridos por Bikard (2014). Os principais achados foram muito parecido com o encontrado por Bikard (2014), porém agora, através da deleção do gene *nuc*, o bacteriófago engenheirado eliminou, com 100% de eficácia e especificidades, as bactérias *S. aureus* alvo, sem gerar danos colaterais indesejados as demais células/bactérias.

Um teste interessante, *in vitro*, realizado por Park (2017), foi a tentativa de transpor uma das barreiras que mais limita a aplicação da fagoterapia, citada por Bikard (2014), que é a estreita gama de infecção do bacteriófago. Park (2017) promoveu ensaios que visavam modificar o gene *Tif*, o gene responsável por produzir as proteínas de calda do vírus, que por sua vez são as responsáveis pela ligação do bacteriófago com as proteínas específicas na membrana celular bacteriana (etapa de adsorção). As modificações foram feitas inserindo no genoma do fago Φ NM1, trechos do mesmo gene *Tif*, porém provindos de outros bacteriófagos. Ao inserir esses novos trechos exógenos, Park (2017) conseguiu efetivamente ampliar a gama de alvos de infecção do fago.

Além de modificações no gene *Tif*, Park (2017) buscou neutralizar os efeitos citotóxicos e inflamatórios, gerados na etapa de indução durante o processo de engenheiramento do fago, retirando trechos específicos no genoma do bacteriófago, como as regiões codificadoras de citotoxinas e superantígenos. Seus resultados foram

surpreendentemente positivos, neutralizando por completo os compostos citotóxicos e inflamatórios.

Ainda em seus testes e ensaios *in vitro*, Park (2017) analisa a capacidade de seus bacteriófagos engenheirados de eliminar bactérias *S. aureus* de superfícies contaminadas, utilizando discos de antibióticos sem adições de medicamentos. Os discos foram contaminados com as bactérias *S. aureus* e tratados com a solução de fagos engenheirados. Seus resultados foram positivos, revelando grande potencial da técnica ser utilizada para descontaminação de superfícies ou equipamentos hospitalares.

Com relação aos experimentos *in vivo*, mais especificamente na eliminação de infecções subcutâneas e contaminações superficiais na cútis de camundongos. Park (2017) relata descobertas sobre diferentes formas de se aplicar a solução contendo os fagos engenheirados, ou seja, diferentes transportadores (ou carregadores). Primeiramente, realiza testes entregando a solução de fagos modificados no local de infecção, através de injeção subcutânea, para avaliar sua ação antimicrobiana em infecções subcutâneas. Em seguida, utilizou solução de fagos misturada com água, e misturada posteriormente a hidrogel de alginato, ambas são utilizadas em testes de medição de sua eficiência na descontaminação da cútis de camundongos.

Dentre os três testes, os melhores resultados foram obtidos quando a solução de fagos engenheirados é misturada a uma solução de hidrogel, onde foram capazes de descontaminar por completo a cútis contaminada, por *S. aureus*, dos camundongos. A mistura da solução de fagos com a solução de hidrogel de alginato, criou um ambiente úmido e favorável para os fagos poderem agir e combater a infecção, resultando em melhoria expressiva da performance de sua ação como agente antimicrobiano.

Como próximos passos e perspectivas futuras, Park (2017) comenta que, mesmo que o fago modificado se mostrou apto para esterilização das superfícies infectadas (pele de camundongos), este não foi tão efetivo na eliminação da infecção por completo nas áreas intradermicamente infectadas. Portanto, para Park (2017) estudos futuros devem incluir, principalmente a ampliação da gama/espectro de infecção do fago, uma vez que foi observado resultados muito positivos nos ensaios envolvendo modificações no gene *Tif*; e baseado nos resultados promissores do hidrogel de alginato, deve-se analisar os meios de carregar a solução contendo os bacteriófagos engenheirados até as bactérias causadoras da infecção.

4.4.2 Cobb (2019)

No trabalho publicado de Cobb (2019), houve uma grande similaridade com Park (2017), pois os estudos e testes de Cobb (2019), são uma “continuação” dos estudos realizados por Park (2017).

Diferentemente dos demais trabalhos, onde as bactérias foram marcadas com GFP (*green fluorescent protein*, ou proteína fluorescente verde) partir de sua transformação com plasmídeos contendo o gene da proteína fluorescente, Cobb (2019) tenta criar uma nova linhagem modificada da bactéria *S. aureus*, inserindo a sequência codificadora para GFP no genoma da bactéria. Sua tentativa foi bem sucedida, possibilitando visualização em tempo real da proliferação e morte bacteriana, durante os testes e tratamentos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Um dos principais objetivos para Cobb (2019), foi o estudo da eficiência dos bacteriófagos modificados por Park et al., 2017 em biofilmes bacterianos. Cobb (2019) buscou comparar primeiramente, *in vitro*, a eficiência dos bacteriófagos versus a eficiência de fármacos utilizados como último recurso em tratamentos de infecções severas por *S. aureus*, como a vancomicina e a fosfomicina. Esse teste está de acordo com alguns relatos da literatura, que mostram que o tratamento com fármacos de alto peso molecular, como a vancomicina, em biofilme bacteriano de *S. aureus* não são tão efetivos quanto à fosfomicina, que por possuir peso molecular menor age de forma mais efetiva contra o biofilme (POEPPL et al. 2014; TRAUTMANN et al., 1992; WANG et al., 2018). Cobb (2019) desenhou os testes para que constituíssem 3 tratamentos diferentes, o primeiro tratamento consistia na ação do bacteriófago modificado sozinho, o segundo na ação do fármaco sozinho, e o terceiro na ação combinada de bacteriófago mais fármaco. Os resultados dos bacteriófagos modificados mostraram que sua performance como agente antimicrobiano ainda não supera a dos fármacos.

Após os testes *in vitro* primários, Cobb (2019) prossegue para os ensaios *in vivo*, onde manteve sua estratégia de 3 tratamentos para medir a performance do bacteriófago, seja sozinho ou em conjunto com o fármaco, versus a performance do fármaco sozinho. Os testes *in vivo* envolveram a criação de uma metodologia experimental, onde se induziu osteomielite

em camundongos, através da inserção de um parafuso cirúrgico previamente contaminado com *S. aureus*, em seus fêmures. Quando removido, a lesão foi tratada com as 3 distintas soluções (bacteriófago sozinho, fármaco sozinho e bacteriófago mais fármaco). Como esperado, a fosfomicina obteve os melhores resultados, eliminando mais bactérias no tratamento. Porém, os resultados da combinação fármaco mais bacteriófago também foram significativos, atingindo números significativamente estatísticos.

A metodologia experimental *in vivo* utilizada por Cobb (2019), é em suma, um de seus objetivos no trabalho. Seu modelo de estudo proposto permitiu analisar os resultados de performance do fago engenheirado, no tratamento de osteomielite e infecção de tecido mole, ambos ao mesmo tempo, causadas por *S. aureus*. A performance durante os testes, pôde ser avaliada tanto qualitativamente quanto quantitativamente, de forma rápida, e até em tempo real. Assim, seu modelo de estudo *in vivo* proposto, pode ser considerado bem sucedido, e servir de base ou inspiração para desenvolvimento de estudos futuros.

Os próximos passos propostos por Cobb (2019), se resumem a explorar melhor tratamentos que se utilizem de combinações de fagos modificados com antibióticos. Sugerem-se que a combinação de ambos é uma maneira de tornar o tratamento a infecções bacterianas menos prejudicial ao paciente, diminuindo efeitos colaterais gerados pelo uso exclusivo e contínuo dos fármacos, além de que, ao mesmo tempo, diminui a taxa de proliferação da resistência bacteriana. Os autores destacam a grande importância de direcionar o foco de estudos para encontrar transportadores mais eficientes para os fagos, pois utilizando da solução de hidrogel de alginato, proposta por Park (2017), embora os resultados fossem positivos, encontrou-se dificuldades relacionadas a concentração máxima da solução de fagos que pôde ser utilizada em tratamento. Cobb (2019) também cita a necessidade de melhor compreensão do período/tempo de tratamento, como outro importante aspecto nos estudos futuros, pois em seus experimentos foi utilizada uma janela de tratamento restrita.

5) DISCUSSÃO

5.1 Bikard (2014)

Seguindo a ordem cronológica de publicação dos artigos, o primeiro a ser publicado foi a pesquisa de Bikard (2014). Dentre os poucos artigos encontrados e selecionados para essa revisão, Bikard (2014) foi o primeiro a realizar de forma bem sucedida o engenheiramento de um bacteriófago, no qual foi-se inserida um sistema CRISPR-Cas9 tipo II programável, capaz de atacar especificamente regiões do genoma bacteriano de *S. aureus* e neutralizar sua atividade microbiana.

No processo de engenheiramento do fago foi utilizado um fagomídeo. A utilização do fagomídeo nos estudos e testes realizados por Bikard (2014), permitiu a inserção da maquinaria de CRISPR-Cas9 exógena no genoma do fago (MELNIKOV et al., 1984), de forma que, após um ensaio de transdução na linhagem alvo bacteriana de *S. aureus*, o fago foi formado e passou a carregar tanto a sequência codificadora da Cas9 e sua maquinaria de edição genética, quanto trechos específicos do bacteriófago, permitindo assim a criação de um bacteriófago modificado capaz de infectar a linhagem alvo de *S. aureus* sem que este seja combatido por seu sistema CRISPR-Cas9 de defesa "imunológica" contra material genético exógeno.

Embora a utilização do fagomídeo tenha sido bem sucedida, apresentando construções finais estáveis e possuindo baixas taxas de recombinação e mutação, a técnica carrega consigo algumas limitações. O tamanho da sequência ou conjunto de sequências exógenas comportadas pelo fagomídeo pode ser considerado um dos fatores limitantes. Regiões chave para a correta formação, replicação e sobrevivência do bacteriófago, ocupam boa parte do espaço no genoma viral, restringindo o tamanho das sequências que podem ser inseridas em seu genoma, e com a utilização de fagomídeo para mediar esse processo, o espaço restante disponível para inserção de sequências exógenas se torna ainda mais restrito (NAFISI et al., 2018). Estudos buscaram aprimorar técnicas de biologia sintética que permitem enovelar de forma controlada fagomídeos, de maneira a ampliar o limite de pares de bases que podem ser carregadas por estes (NAFISI et al., 2018), sendo esta uma pequena amostra do avanço da técnica e do espaço que a técnica possui para ser aprimorada.

Apesar desses avanços, Bikard (2014) relata um segundo fator limitante a respeito da utilização dos fagomídeos. Sua utilização no processo impede que as bactérias alvo sejam mortas por lise de sua parede celular, logo, para tratamentos bem sucedidos *in vivo*, seriam necessárias quantidades de fagomídeos suficientes ou até maiores que a população bacteriana na infecção, o que, para Bikard (2014), inviabiliza o uso dos fagomídeos no processo de

criação dos bacteriófagos modificados para uma terapia ou tratamento com alta efetividade (BIKARD et al., 2014)

Apesar dos fatores limitantes citados acima, Bikard (2014) proporcionou descobertas extremamente relevantes, tanto a técnica de criação do bacteriófago modificado quanto para sua ação e eficiência como agente antimicrobiano. Em seus ensaios *in vitro*, Bikard (2014) conseguiu eliminar 100% da resistência a antibióticos de linhagens de *S. aureus*, deletando com sucesso os genes *mecA* e *aph-3* (responsáveis por gerar resistência à ampicilina e canamicina, respectivamente), juntamente com 100% de eliminação dos plasmídeos responsáveis por propagar a virulência das linhagens de *S. aureus*. Seus resultados comprovam o potencial que a terapia com bacteriófagos modificados possui, ao mostrar que a técnica é capaz de neutralizar as bactérias alvo de forma seletiva, sem afetar a microbiota a seu redor, podendo ser expandida para atingir um maior número de cepas bacterianas e até mesmo guiar a nuclease Cas9 e sua maquinaria para mais de um alvo ao mesmo tempo.

5.2 Park (2017)

Prosseguindo com a ordem cronológica de publicação dos trabalhos, o seguinte artigo publicado, foi o de Park (2017). Neste estudo, os autores buscaram aprimorar os experimentos realizados por Bikard (2014).

A primeira notável diferença entre os trabalhos, está na escolha do bacteriófago a ser modificado e utilizado para experimentos. No trabalho de Bikard (2014), o fago utilizado foi o Φ NM1, e não há relato explícito de sobre como foi selecionado. Enquanto para Park (2017) o fago utilizado foi o Φ SaBov, e seu método de escolha foi baseado na capacidade do fago em produzir uma quantidade maior de réplicas do seu material genético após a lise da bactéria hospedeira (ao final de seu ciclo lítico induzido). Park (2017) procurou estudar sobre a interação que o fago Φ SaBov possuía com a linhagem de bactérias escolhida para a realização de seus testes e experimentos (linhagem de *S. aureus* RF122). A linhagem de *S. aureus* RF122 interage muito bem o fago Φ SaBov, e após o processo de indução durante a

criação do bacteriófago modificado, acaba transferindo genes para o genoma do fago que facilitam seu posterior enovelamento do material genético, explicando assim sua maior quantidade de réplicas bem sucedidas após finalização do ciclo lítico induzido durante o processo de engenhamento (HERRON-OLSON et al., 2007; MOON et al., 2016).

A segunda notável diferença, está nas etapas iniciais de criação do bacteriófago modificado. Ao invés do fagomídeo, Park (2017) optou por implementar o sistema programável de CRISPR-Cas9 no genoma do bacteriófago, através da construção de vetor de transporte (*shuttle vector*), capaz de recombinar homologamente com uma região não codificante identificada no genoma viral (PARK et al., 2017), de modo a evitar a etapa de transdução necessária para a inserção do fagomídeo no bacteriófago. A etapa de transdução gera um vetor viral final, que conterà trechos da bactéria alvo, o que pode dificultar a enrolação ou empacotamento de seu material genético (PARK et al., 2017), ou até mesmo espalhar material genético virulento da bactéria alvo para demais, durante o processo de transdução generalizada ou restrita, através de elementos genéticos móveis (MGE, *mobile genetic elements*) (PENADÉS et al., 2015; PIRNAY et al., 2015), aumentando assim as chances do tratamento falhar.

Em seus testes e estudos *in vitro*, Park (2017) obteve resultados muito parecidos com o relatado por Bikard (2014). Em seus testes iniciais controlados, *in vitro*, Bikard (2014) comprovou que o fago engenheirado é capaz de atacar mais de uma sequência alvo ao mesmo tempo dentro de seu organismo alvo, sejam essas sequências de seu genoma, plasmidiais, ou até mesmo ambas ao mesmo tempo, mantendo sua eficácia e eliminando 100% das bactérias ou 100% dos plasmídeos alvo. Park (2017) testou em seus ensaios, diferentes alvos no genoma da bactéria, assim como Bikard et al., 2014, e obteve os mesmos resultados. Park (2017), ao se deparar com os mesmos resultados, levanta a hipótese de que a ineficácia do bacteriófago em tratamento, não está diretamente ligada ao fago modificado ou em sua capacidade de atingir a região alvo no genoma, mas sim aos métodos e maneiras de se transportar o mesmo até as bactérias alvo, garantido que todas serão de fato infectadas.

Os próximos testes realizados por Park (2017) tiveram como objetivo encontrar esclarecimentos para a hipótese levantada. Logo, em seus testes *in vivo*, Park (2017) analisou a performance do bacteriófago engenheirado em diferentes cenários com diferentes formas de transporte dos fagos até as bactérias alvo. O primeiro teste *in vivo* realizado por Park (2017), teve o objetivo de analisar a eficácia do tratamento com os fagos engenheirados, em uma

infecção subcutânea por *S. aureus*, em camundongos. Após a injeção subcutânea de uma solução contendo as bactérias *S. aureus* nas costas de camundongos, foi injetada uma segunda solução, agora contendo os fagos modificados. Os resultados obtidos mostraram alta eficácia no tratamento com os fagos modificados. Foram capazes de eliminar cerca de 80% da infecção (PARK et al., 2017), indicando que, quando a solução é aplicada de forma subcutânea e localizada, a ação antimicrobiana é alta, porém ainda incapaz de erradicar por completo a infecção (PARK et al., 2017).

Em seu segundo teste *in vivo*, Park (2017) testa a capacidade dos fago modificados em esterilizar a cútis de camundongos que foi superficialmente contaminada com bactérias *S. aureus*. Aqui foram testadas duas diferentes maneiras de adicionar a solução de fagos à pele contaminada. A primeira consistia em aplicar a solução de fagos com um spray de água, e a segunda, a solução foi aplicada misturada a uma solução de hidrogel. No primeiro cenário, após a análise e contagem de bactérias na região, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa, e isso ocorreu devido a pele do camundongo se secar de forma muito rápida, faltando água para que os processos de transcrição e tradução ocorressem (PARK et al., 2017). No segundo cenário, o ambiente criado pela presença do hidrogel, manteve a região hidratada tempo o suficiente para que a maquinaria de CRISPR-Cas9 seja expressa, sendo assim capaz de descolonizar a área da cútis dos camundongos contaminada com *S. aureus* (PARK et al., 2017).

Os resultados aqui comprovam e reforçam a necessidade de explorar melhor os meios de transporte do fago até seu local de ação, ao invés das sequências que serão alvo. Ao mesmo tempo, comprovam que o fago engenheirado pode ser uma excelente alternativa para limpeza e esterilização de superfícies e equipamentos hospitalares, bem como de embalagens e equipamentos na indústria farmacêutica e alimentícia (PARK et al., 2017).

Outros dois pontos importantes no trabalho realizado por Park (2017), foram a realização de tentativas de ampliação do espectro de infecção do fago e a remoção de trechos do seu genoma que codificam citotoxinas e superantígenos. Ambas tentativas foram feitas visando a aplicação dos bacteriófagos como uma alternativa viável aos antibióticos no futuro.

Uma das barreiras primárias que limitam a fagoterapia é a estreita faixa de hospedeiros que os fagos possuem (GUO et al., 2021). Para ampliação da faixa de hospedeiros de do fago ΦSaBov, foram feitas modificações na região do gene *Tif*, em seu genoma, substituindo

regiões gene através de recombinações homólogas, por regiões do mesmo gene, porém provindas de bacteriófagos diferentes. Essa modificação permite ao bacteriófago ampliar seu espectro de infecção, não se tornando mais restrito a um único hospedeiro.

Durante o processo de criação do fago engenheirado, na etapa de lise da bactéria e liberação dos fagos modificados, normalmente são lançados no ambiente algumas citotoxinas e superantígenos, que podem vir a causar danos em células ou bactérias vizinhas ou gerar resposta inflamatória severa, e até perpetuar genes de virulência e/ou resistência da bactéria (MOON et al., 2015). Em seus ensaios, Park (2017) conseguiu de forma bem sucedida remover regiões responsáveis pela produção tanto das citotoxinas quanto dos superantígenos. Em suas medições após etapa de lise da bactéria no processo de criação do vírus modificado, não foram detectados traços da presença de moléculas citotóxicas ou causadoras de inflamação.

Mesmo não sendo pioneiro nos testes que visam ampliar a gama de hospedeiros do bacteriófago, Park (2017) obteve resultados positivos em seus testes com *S. aureus*, indicando que no campo da fagoterapia, focada na bactéria *S. aureus*, existe grande espaço para evolução e conseqüente transposição de barreiras que atualmente limitam o tratamento. Park (2017) também obteve resultados fomentadores em seus testes *in vivo*, que em sua visão, direcionam o caminho dos estudos futuros para melhor entendimento sobre os meios de se transportar os bacteriófagos até as bactérias alvo.

5.3 Cobb (2019)

Finalizando a ordem cronológica de publicação dos artigos, temos o estudo realizado por Cobb (2019). Este foi o estudo mais recente publicado, dentre aqueles selecionados para essa revisão. Cobb (2019) traz em seus ensaios e experimentos, uma abordagem um pouco diferente dos dois primeiros artigos, abordando um cenário real de infecção, os autores buscam conclusões mais avançadas sobre a terapia fágica em infecções por *S. aureus*.

Cobb (2019) utilizou linhagens de *S. aureus* capazes de formar biofilme bacteriano, para conseguir avaliar a verdadeira eficácia e potencial que os bacteriófagos possuem ao combater as infecções bacterianas de *S. aureus*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para realizar a avaliação mais precisa da performance do bacteriófago no tratamento de infecções, os autores

realizaram testes *in vitro* e *in vivo* com a linhagem de bactérias *S. aureus* alvo ATCC 6538 de 3 maneiras diferentes. O primeiro tratamento consistiu na ação do bacteriófago modificado sozinho, o segundo consistia na ação dos fármacos sozinhos, e o terceiro consistia na ação combinada de bacteriófago mais fármaco.

Em seus primeiros testes *in vitro*, Cobb (2019) mostra que a ação da vancomicina, um dos antibióticos mais usados como último recurso no tratamento de infecções graves causada por *S. aureus* (GUO et al., 2020; LOWY et al., 2003; WEIGEL et al., 2003; MCGUINNESS et al., 2017), teve efeito quase nulo no biofilme bacteriano. Os resultados mostraram que, mesmo com concentrações 50 vezes maiores que as recomendadas, o fármaco não foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de bactérias viáveis. Em contrapartida, a fosfomicina, em concentrações cerca de 10 vezes menores que a vancomicina, foi capaz de diminuir significativamente ou até completamente a quantidade de bactérias viáveis. Seus resultados foram parecidos com os encontrados em estudos que analisaram ambos fármacos e suas eficácias (COBB et al., 2019; POEPPL et al. 2014; TRAUNTMANN et al., 1992). De forma geral, em seus primeiros experimentos *in vitro*, todos os 3 tratamentos levaram a uma diminuição significativa da quantidade de bactérias e do biofilme bacteriano.

Nos testes *in vivo*, Cobb (2019) desenvolveu e propôs um modelo próprio de estudo da ação do bacteriófago contra a linhagem de *S. aureus* formadora de biofilme. Cobb (2019) contaminou parafusos de implantes ósseos com a cepa ATCC 6538, e os inseriu cirurgicamente no fêmur de camundongos. A execução desse modelo consiste em, primeiramente, contaminar os parafusos cirúrgicos, mergulhando-os em solução de meio de cultivo contendo as bactérias *S. aureus* por cerca de 5 a 10 minutos. Após mergulhado na solução, o parafuso é descansado para secagem, por mais alguns minutos. Antes que prosseguisse para inserção do parafuso no fêmur dos camundongos, processos prévios de contagem bacteriana foram realizados no parafuso após secagem, para assim ter uma estimativa da carga bacteriana que eles carregavam. Depois do período de 7 dias após os parafusos terem sido cirurgicamente inseridos nos camundongos, estes são retirados, e no local da lesão gerada, foi adicionado soluções de hidrogel de alginato contendo os 3 distintos tipos de tratamento (fago sozinho, fosfomicina sozinha e fago mais fosfomicina). Depois de 24h após as soluções terem sido aplicadas à lesão, os camundongos foram sacrificados e amostras ósseas e teciduais foram recolhidas para análise e contagem bacteriana. Seu modelo de estudo *in vivo* proposto, gera tanto a infecção do tecido mole quanto a infecção do tecido

ósseo (osteomielite, causada por *S. aureus*) no camundongo, o que permite avaliação da eficácia de tratamento que o bacteriófago possui contra ambos estilos de infecção, ao mesmo tempo que permite avaliar a sua performance contra o biofilme bacteriano também gerado na infecção (COBB et al., 2019).

Os resultados obtidos por Cobb (2019) nos testes *in vivo* mostram que o tratamento com a fosfomicina sozinha obteve os melhores resultados, sendo o único tratamento capaz de eliminar bactérias do tecido ósseo, e ainda eliminando o maior número de bactérias nas amostras de tecido mole recolhidas. Porém, os resultados da combinação fármaco mais bacteriófago também foram efetivos, atingindo números parecidos e estatisticamente significativos, em comparação com o tratamento que se utilizava do fármaco sozinho.

Ainda nos testes *in vivo*, Cobb (2019) relata algumas dificuldades encontradas em seus testes, a principal delas diz respeito a utilização do hidrogel de alginato como transportador dos bacteriófagos. Apesar de servir como um excelente carregador dos bacteriófagos até as bactérias alvo, sua utilização acabou por limitar a concentração de bacteriófagos que pôde ser adicionada ao tecido mole e ósseo lesionados pelo parafuso (DE MESY BENTLEY et al., 2017). Outra possível limitação dos testes realizados por Cobb (2019) está relacionada ao tempo de tratamento adotado. Em seu modelo de estudo proposto, a solução contendo fármaco, bacteriófago, ou ambos associados, agiram na infecção por apenas 24h, antes da eutanásia dos camundongos. Esse curto período de tratamento, pode ter limitado os resultados de seus testes, uma vez que no tratamento de osteomielite é comum que a duração do tratamento seja mais prolongados (NELSON et al., 2002).

Por fim, Cobb (2019), com seus testes e resultados, ampliou os conhecimentos sobre a fagoterapia no tratamento de infecções geradas por *S. aureus*, e abriu portas para novos estudos cada vez mais avançados. Como próximos passos para estudos futuros, Cobb (2019) ressalta, assim como Park (2017) e Bikard (2014), a importância de aprofundar os estudos acerca dos carregadores e transportadores dos bacteriófagos, e vai além, ao demarcar a importância de se compreender e estudar melhor sobre as doses/concentrações das soluções de fagos utilizadas nos tratamentos, e a duração dos tratamentos, dado que estes foram os fatores limitantes encontrados em seus experimentos.

6) CONCLUSÃO

Após estudo e análise dos presentes artigos selecionados para essa revisão sistemática, primeiramente, baseado nos resultados dos ensaios *in vitro*, podemos concluir que ao se utilizar bacteriófagos modificados para combater bactérias *S. aureus*, estes são capazes de efetivamente eliminar as bactérias alvo, atuando como agente antimicrobiano específico, não afetando demais células e/ou colônias bacterianas indesejadas. Somado a isso, não só notamos um cenário muito promissor a respeito de modificações no genoma de fagos, como também observamos que existem diversas modificações estruturais possíveis de serem realizadas para aprimorar o seu efeito de ação, tornando o tratamento um potencial sucessor para os tratamentos convencionais com antibióticos e contribuindo para a diminuição do aumento das cepas bacterianas resistentes. Com relação aos resultados dos ensaios *in vivo*, os antibióticos ainda são os retentores da performance mais eficiente contra a atividade microbiana de *S. aureus*. Todavia, os achados relatados em todos os 3 artigos apontam uma direção promissora para os estudos futuros. Os próximos passos relatados para evolução da técnica, são principalmente, a respeito do número de doses e suas concentrações, período de tratamento, modificações pontuais no genoma viral, carregadores, e entendimento de sua ação em associação com fármacos. Ainda que existam alguns contratempos que impedem a técnica de avançar para testes clínicos, seu potencial foi comprovado por meio dos testes e experimentos *in vivo* realizados.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WHO, 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ABEDON, Stephen T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66-85, 2011.

ANDERS, Carolin et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 569-573, 2014.

ARCHER, Nathan K. et al. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.

ARSHAD, Mohammad. 4-[(1E)-3-(Substituted-phenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl] benzenesulfonamide: design, computational, synthesis, characterization and antibacterial assessment. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 9, n. 2, p. 35-40, 2018.

BARBU, E. Magda; CADY, Kyle C.; HUBBY, Bolyn. Phage therapy in the era of synthetic biology. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 10, p. a023879, 2016.

BEAN, Jessica E. et al. Triggered release of bacteriophage K from agarose/hyaluronan hydrogel matrixes by Staphylococcus aureus virulence factors. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 24, p. 7201-7208, 2014.

BECKER, Karsten et al. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1434-1439, 2003.

BIEN, Justyna; SOKOLOVA, Olga; BOZKO, Przemyslaw. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. **Journal of pathogens**, v. 2011, 2011.

BIKARD, David et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1146-1150, 2014.

BOUCHER, Helen W.; COREY, G. Ralph. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_5, p. S344-S349, 2008.

CHANISHVILI, N. et al. Phages and their application against drug-resistant bacteria. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 7, p. 689-699, 2001.

CHANISHVILI, Nina. Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the Soviet and post Soviet experiences. **Current Drug Delivery**, v. 13, n. 3, p. 309-323, 2016.

CHANISHVILI, N. Biological Means Against Bio-Terrorism: Phage Therapy and Prophylaxis Against Pathogenic Bacteria. **Biodefence**, p. 125-133, 2011.

CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CLOKIE, Martha RJ et al. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31-45, 2011.

COBB, Leah H. et al. CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection. **PLoS One**, v. 14, n. 11, p. e0220421, 2019.

DA SILVA GRILLO, Vinicius Tadeu Ramos et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, 2013.

DE MESY BENTLEY, Karen L. et al. Evidence of Staphylococcus aureus deformation, proliferation, and migration in canaliculi of live cortical bone in murine models of osteomyelitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 5, p. 985-990, 2017.

DIEP, Binh An et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **The Lancet**, v. 367, n. 9512, p. 731-739, 2006.

DOMINGO-CALAP, Pilar; DELGADO-MARTÍNEZ, Jennifer. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. **Antibiotics**, v. 7, n. 3, p. 66, 2018.

EDGAR, Rotem et al. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 3, p. 744-751, 2012.

EDWARDS, Andrew M.; MASSEY, Ruth C. How does Staphylococcus aureus escape the bloodstream?. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 184-190, 2011.

FRIEDEN, Tom. Antibiotic resistance threats in the United States. **Centers Dis Control Prev**, v. 114, 2013.

GARDETE, Susana et al. Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836-2840, 2014.

Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.

GOERING, Richard et al. **Mims' Medical Microbiology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2018.

GÓRSKI, Andrzej et al. Phage therapy: Current status and perspectives. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 459-463, 2020.

GUO, Dingming et al. Genetic and chemical engineering of phages for controlling multidrug-resistant bacteria. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 202, 2021.

GUO, Yunlei et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 107, 2020.

HAGENS, Steven et al. Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3817-3822, 2004.

HAGENS, S.; BLÄSI, U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. **Letters in applied microbiology**, v. 37, n. 4, p. 318-323, 2003.

HERRON-OLSON, Lisa et al. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. **PloS one**, v. 2, n. 10, p. e1120, 2007.

HILLE, Frank et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.

HOOIJMANS, Carlijn R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC medical research methodology**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

HUANG, David B. et al. In vitro activity of iclaprim against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nonsusceptible to daptomycin, linezolid, or vancomycin: a pilot study. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2017, 2017.

HU, Yu et al. Comparative expression analysis of two thermostable nuclease genes in *Staphylococcus aureus*. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 3, p. 265-271, 2012.

JOHNSON, C. et al. Bacteriophage encapsulation in poly (ethylene glycol) hydrogels significantly reduces bacteria numbers in an implant-associated infection model of bone repair. In: **Igarss**. 2014. p. 281.

KASMAN, Laura M.; PORTER, La Donna. Bacteriophages. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2021.

KISHOR, Chandan et al. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. **The Indian journal of medical research**, v. 143, n. 1, p. 87, 2016.

KREISWIRTH, Barry N. et al. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 709-712, 1983.

LE, Shuai et al. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68562, 2013.

LOWY, Franklin D. et al. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

LIMA, Camila Correa; BENJAMIM, Sandra Cristina Calixto; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, p. 105-113, 2017.

LIU, Dan et al. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1268, 2021.

LUEPKE, Katherine H. et al. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.

LU, Timothy K.; COLLINS, James J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11197-11202, 2007.

LU, Timothy K.; COLLINS, James J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4629-4634, 2009.

MCGUINNESS, Will A.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269, 2017.

MEILE, Susanne et al. Engineering therapeutic phages for enhanced antibacterial efficacy. **Current opinion in virology**, v. 52, p. 182-191, 2022.

MELNIKOV, Anatolij A. et al. Lambda phagemids and their transducing properties. **Gene**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 1984.

MONTEIRO, Rodrigo et al. Phage therapy: going temperate?. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 4, p. 368-378, 2019.

MOON, Bo Youn et al. Mobilization of genomic islands of *Staphylococcus aureus* by temperate bacteriophage. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151409, 2016.

MOON, Bo Youn et al. Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2015.

MORADPOUR, Zahra et al. Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer-independent promoter for biocontrol of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 296, n. 1, p. 67-71, 2009.

NAFISI, Parsa M.; AKSEL, Tural; DOUGLAS, Shawn M. Construction of a novel phagemid to produce custom DNA origami scaffolds. **Synthetic Biology**, v. 3, n. 1, p. ysy015, 2018.

NELSON, Carl L. et al. The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, n. 4, p. 643-647, 2002.

NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. **Journal of hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 369-372, 2008.

NLM, A platform for biomedical discovery and data-powered health : National Library of Medicine strategic plan 2017-2027 / report of the NLM Board of Regents, 2018

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

O'RIORDAN, William et al. A comparison of the efficacy and safety of intravenous followed by oral delafloxacin with vancomycin plus aztreonam for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections: a phase 3, multinational, double-blind, randomized study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 5, p. 657-666, 2018.

PARK, Joo Youn et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

PARVEZ, Md Anowar Khasru et al. Healthcare-associated (HA) and community-associated (CA) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Bangladesh—Source, diagnosis and treatment. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 473-478, 2018.

PECORARO, Vincent L. **Peptide, Protein and Enzyme Design**. Academic Press, Capítulo 3, 2016.

PENADÉS, José R. et al. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. **Current opinion in microbiology**, v. 23, p. 171-178, 2015.

PIRNAY, Jean-Paul et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. **Pharmaceutical research**, v. 32, n. 7, p. 2173-2179, 2015.

POEPPL, Wolfgang et al. Efficacy of fosfomycin compared to vancomycin in treatment of implant-associated chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rats. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5111-5116, 2014.

PRINCIPI, Nicola; SILVESTRI, Ettore; ESPOSITO, Susanna. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 513, 2019.

PTASHNE, Mark. Lambda's switch: lessons from a module swap. **Current Biology**, v. 16, n. 12, p. R459-R462, 2006.

RAHIMI, Fateh; SHOKOOHIZADEH, Leili. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2018.

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

SAKR, Adèle et al. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2419, 2018.

SANTOS, André Luis dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS, Neusa de Queiroz. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SEO, Keun Seok et al. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Infection and immunity**, v. 75, n. 1, p. 260-269, 2007.

SHENGJIAN, Y. U. A. N.; YINGFEI, M. A. Advances and applications of phage synthetic biology. **Synthetic Biology Journal**, v. 1, n. 6, p. 635, 2020.

SOUZA, Glauco R. et al. Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: the effect of cis-and trans-acting factors. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2242, 2008.

TRAUTMANN, M. et al. Intracellular bactericidal activity of fosfomicin against staphylococci: a comparison with other antibiotics. **Infection**, v. 20, n. 6, p. 350-354, 1992.

TURNER, Nicholas A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019.

WANG, Feng et al. Insights into key interactions between vancomycin and bacterial cell wall structures. **ACS omega**, v. 3, n. 1, p. 37-45, 2018.

WEI, Junwei et al. Phage Therapy: Consider the Past, Embrace the Future. **Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 7654, 2020.

WEIGEL, Linda M. et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569-1571, 2003.

YEH, Ting-Kuang et al. Bacteriophages and phage-delivered CRISPR-Cas system as antibacterial therapy. **International journal of antimicrobial agents**, p. 106475, 2021.

YEHL, Kevin et al. Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis. **Cell**, v. 179, n. 2, p. 459-469. e9, 2019.