

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTERÍÓFAGO

NAIARA MACHADO DE ALCÂNTARA

UBERLÂNDIA – MG
DEZEMBRO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Padronização de extração de DNA de bacteriófago

Naiara Machado de Alcântara

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

“Monografia apresentada ao Instituto de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.”

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Padronização de extração de DNA de bacteriófagos

Naiara Machado de Alcântara

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA – MG
DEZEMBRO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Padronização de extração de DNA de bacteriófago

Naiara Machado de Alcântara

Aprovado pela Banca Examinadora em: 01 /12 / 2017 Nota: _____

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia, 01 de dezembro de 2017

Dedico esse trabalho a todos aqueles que estiveram ou estão próximos a mim, me ajudando a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Doutor Jonny Yokosawa por me orientar com excelência, sempre com paciência e respeito, sendo um grande contribuinte para meu crescimento intelectual e acadêmico.

À Universidade Federal de Uberlândia por me proporcionar experiências que carregarei para toda vida.

Ao corpo docente do Laboratório de Virologia por proporcionar sempre o melhor ambiente de trabalho possível.

À técnica Doutora Thelma pela paciência, disponibilidade e por compartilhar comigo seu vasto conhecimento laboratorial enquanto o experimento era realizado.

Ao Laboratório de Microbiologia por disponibilizar as amostras utilizadas, e ao Laboratório de Biofísica por permitir o uso do equipamento do mesmo.

À banca avaliadora, pela leitura crítica e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À memória da minha mãe Claudia, por ter sempre me apoiado e me impulsionado a ser a melhor pessoa possível, e mesmo não estando presente agora, foi a base para a minha entrada na vida acadêmica. Ao meu pai Onésio, que sempre me foi um exemplo de dedicação e responsabilidade. Ao meu irmão Gustavo, pelo carinho e apoio no decorrer das adversidades.

Aos meus amigos por me apoiarem nos momentos de dificuldade e por participarem constantemente dos momentos mais memoráveis da minha vida.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem se tornado cada vez mais recorrente, tornando-se um grave problema para a saúde pública. Isso tem sido um estímulo para o estudo de novas formas de tratamento, seja com outras substâncias antimicrobianas, ou com terapias alternativas, como a terapia com fagos. Esta é tida como uma forma de controle biológico, utilizando bacteriófagos que são vírus que infectam de maneira específica as células bacterianas. Esse trabalho utilizou do bacteriófago modelo T4 na infecção da bactéria *Escherichia coli* cepa B4. Assim, cultivou-se o vírus na bactéria hospedeira e, após a eliminação do DNA e RNA bacteriano, o vírus foi concentrado utilizando polietilenoglicol/NaCl. Em seguida, o vírus foi lisado utilizando proteinase K/SDS e o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio, seguido de precipitação com acetato de sódio/isopropanol. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70%, ressuspenso em tampão Tris-EDTA e submetido à eletroforese em gel de agarose. Esse protocolo foi base para mais dois outros protocolos testados, com alterações na concentração e incubação do PEG, e alteração do tempo de incubação para precipitação com acetato de sódio e isopropanol. Utilizando o protocolo C obtido após as alterações, observou-se DNA com massa molecular acima de 20 Kbp. Assim, será possível obter DNA de outros bacteriófagos, para caracterização e avaliação do seu potencial na lise de células bacterianas.

Palavras-chaves: bacteriófago. DNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bacteriófagos.....	1
1.2. Infecção por bacteriófagos.....	2
1.3. Possíveis aplicações dos bacteriófagos.....	2
1.4. Bacteriófagos T4.....	3
1.5. Replicação do bacteriófago T4.....	4
1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.7. Resistência a antibiótico.....	7
1.8. Justificativa.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Amostras.....	10
3.2. Obtenção de colônias isoladas das amostras bacterianas.....	10
3.3. Preparo de alíquota de estocagem.....	10
3.4. Teste do protocolo A de extração de DNA de bacteriófagos.....	10
3.5. Teste do protocolo B de extração de DNA de bacteriófagos.....	11
3.6. Teste do protocolo C de extração de DNA de bacteriófagos.....	12
3.7. Análise do material genético do bacteriófago.....	14
3.8. Indução do ciclo lítico em bacteriófagos de <i>P. aeruginosa</i>	14
3.9. Preparo de estoque de bacteriófagos.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Extração e purificação do DNA em bacteriófagos T4.....	15
4.2. Indução do ciclo lítico dos bacteriófagos em <i>P. aeruginosa</i>	18
5. CONCLUSÃO.....	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacteriófagos

Os bacteriófagos ou fagos representam uma das mais abundantes formas biológicas encontradas na natureza (BRUSSOW; HENDRIX, 2002). Eles estão em ambientes variados e exercem grande influência sobre a biosfera. Fagos são capazes de predação entre 4 e 50% de bactérias produzidas diariamente em uma ampla gama de nichos biológicos, conduzir ciclos geoquímicos globais e são o reservatório de maior diversidade genética na Terra (SUTTLE *et al.*, 2005).

Os fagos podem medir entre 24 e 200 nanômetros, quanto a sua estrutura, possuem capsídeo (cabeça), que pode ser de forma icosaédrica, cúbica, filamentosa ou pleomórfica, e também apresentam cauda, que é utilizada como parâmetro na sua classificação taxonômica (ACKERMANN *et al.*, 2005).

Assim como todos os vírus, eles não possuem metabolismo próprio, logo, são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, precisam de um hospedeiro para se multiplicar. Uma característica dos fagos que os distingue dos outros vírus é a capacidade de infectar somente organismos procariotos e, portanto, são vírus que não causam nenhum efeito prejudicial ao homem e aos animais (HENRIQUEZ *et al.*, 2008).

Os fagos são constituídos por ácido nucléico (DNA ou RNA) inserido no interior de uma camada de proteína ou lipoproteína. O ácido nucleico pode ser de cadeia dupla (ds) ou de cadeia simples (ss), dependendo do vírus (HENRIQUEZ *et al.*, 2008).

1.2. Infecção por bacteriófagos

Na infecção do hospedeiro, os bacteriófagos se replicam e podem apresentar-se como virulentos (ciclo lítico) ou temperados (ciclo lisogênico). A morte da célula hospedeira ocorre

quando os bacteriófagos que apresentam o ciclo líticos replicam-se no interior da célula (HAGENS; LOESSNER *et al.*, 2007) e causam sua lise para liberar os fagos recém-formados (SKURNIK; STRAUCH, 2006).

Já nos fagos de ciclo lisogênicos, o material genético do bacteriófago pode ser integrado ao da bactéria, porém esse processo é reversível. Neste ciclo há o silenciamento da expressão de genes do fago. Resumidamente, após ser integrado ao genoma bacteriano, o vírus passa a ser denominado profago. Este pode sofrer indução se a célula for submetida à ação de raios ultravioleta ou outro estresse físico-químico. Assim, o vírus, que antes estava inserido no genoma bacteriano, passa para o ciclo lítico (MARKINEGORIAYNOFF *et al.*, 2004).

1.3. Possíveis aplicações dos bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus relativamente específicos para determinado hospedeiro e esta especificidade permite o biocontrole da bactéria de interesse (HENRIQUEZ *et al.*, 2008), tornando-os agentes ideais para aplicações destinadas a terapia de infecções causadas por bactérias resistentes a diversos antibióticos.

Ao contrário da resistência bacteriana aos quimioterápicos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar as barreiras do hospedeiro à infecção. Isto leva a um equilíbrio evolutivo, permitindo a proliferação de bacteriófagos e hospedeiros (CARRILLO *et al.*, 2005).

Segundo pesquisadores, a eficiência dos bacteriófagos pode se limitar pela presença de células bacterianas não hospedeiras. Nesse caso, o controle biológico pode tornar-se ineficiente. Além de, fatores genéticos e ambientais também podem influenciar na interação bacteriófago-hospedeiro, reduzindo a sua eficácia como agente antimicrobiano (JOERGER *et al.*, 2003).

A terapia de fagos, também conhecida como fagoterapia é uma forma de controle biológico, baseada em vírus específicos de bactérias. Ela foi inicialmente proposta em 1917, por Félix d'Herelle, no Instituto Pasteur (Paris, França), mas o interesse nessa aplicação foi reduzido significativamente quando os antibióticos foram descobertos (FRUCIANO; BOURNE, 2007).

Os bacteriófagos podem também oferecer vantagens em relação às terapias convencionais por estarem presentes no mesmo habitat que seus hospedeiros (CONNERTON *et al.*, 2011). Contudo, os fagos não são muito utilizados terapeuticamente devido a problemas relacionados com pureza insuficiente das preparações fágicas, fraca estabilidade ou viabilidade das preparações e falta de compreensão da heterogeneidade e do modo de ação dos fagos.

Dessa forma, os estudos de formas terapêuticas envolvendo fagos foram retomados devido a existência de bactérias resistentes a antibióticos como a *Pseudomonas aeruginosa* (KIM *et al.*, 2012). Muitos fagos de *P. aeruginosa* foram isolados, sendo em sua maioria das famílias de fagos de DNA de cadeia dupla (LI *et al.*, 2010).

Vários estudos têm sido realizados para se caracterizar bacteriófagos que infectam *P. aeruginosa*, com o objetivo de se desenvolver um tratamento com base no uso de um isolado do bacteriófago ou uma mistura de diferentes bacteriófagos, aumentando o espectro de atividade do tratamento (CEYSSENS; LAVIGNE, 2010; BRÜSSOW, 2012; CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013; KRYLOV *et al.*, 2013).

1.4. Bacteriófagos T4

Os bacteriófagos T4 são vírus cujo o hospedeiro é a enterobactéria gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*). Esse vírus tem uma estrutura relativamente complexa, sendo composto por uma cabeça icosaédrica proteica que envolve um DNA linear de fita dupla (que se apresenta enovelado), com função de protegê-lo, e uma cauda helicoidal longa que, em sua

porção final, é ligada a uma placa-base com seis fibras da cauda, que garante aderência à parede celular da bactéria (Figura 1) (MADIGAN *et al.*, 2016).

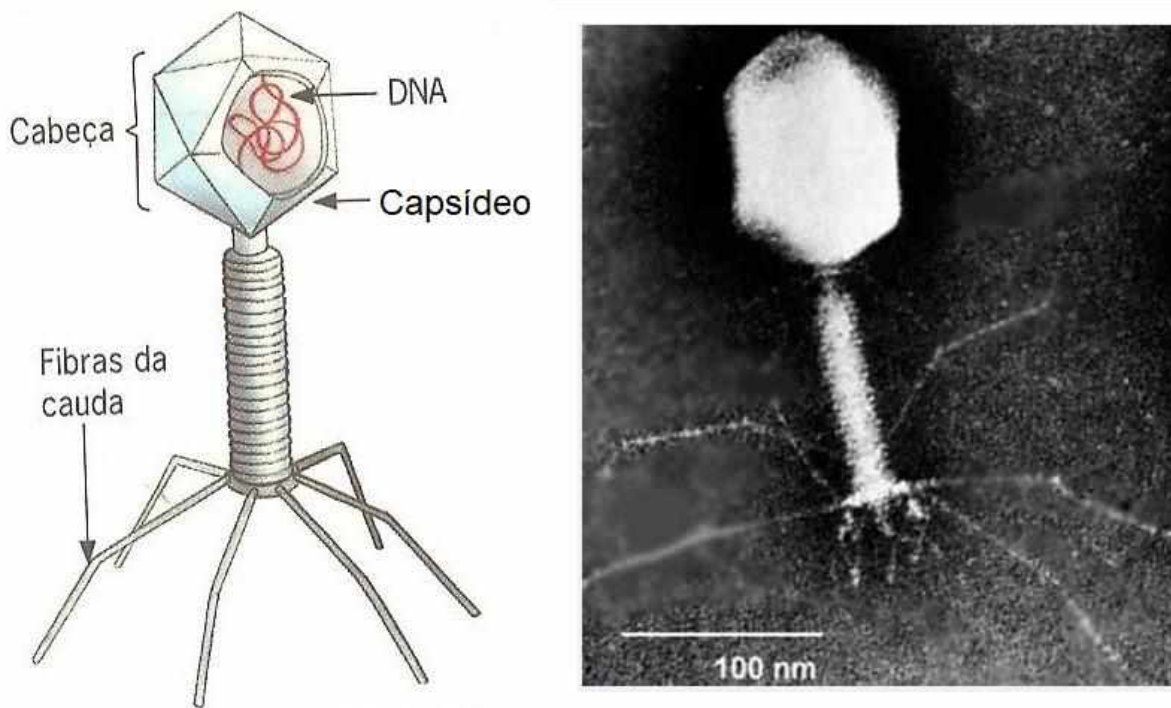


Figura 1: Imagem esquemática da estrutura de um bacteriófago do lado esquerdo, e uma foto de microscopia eletrônica do bacteriófago T4 do lado direito. (Alterada)

Fonte: <http://profkaren.blogspot.com.br/2013/03/virologia-1.html>

O bacteriófago T4 é transportado pela água ou ar, até que se encontre com uma bactéria *E. coli* viva, a qual será sua hospedeira.

1.5. Replicação do bacteriófago T4

No ciclo replicativo viral (Figura 2), as fibras da cauda desses vírus reconhecem como receptores os polissacarídeos do lipopolissacarídeo (LPS) da camada externa de bactérias gram-negativas. Essas fibras da cauda sofrem retração, proporcionando que o cerne da cauda entre em contato com a parede celular do hospedeiro.

Em seguida, é secretada uma enzima similar às lisozimas que abre um poro na parede celular por onde o bacteriófago injetará seu DNA diretamente no citoplasma bacteriano, abandonando

o capsídeo no exterior. O DNA no interior da cabeça do bacteriófago está sob alta pressão, assim como o interior da bactéria está sofrendo a força das pressões osmóticas, fazendo com que a injeção de DNA do fago demore alguns minutos para se completar (MADIGAN *et al.*, 2016).

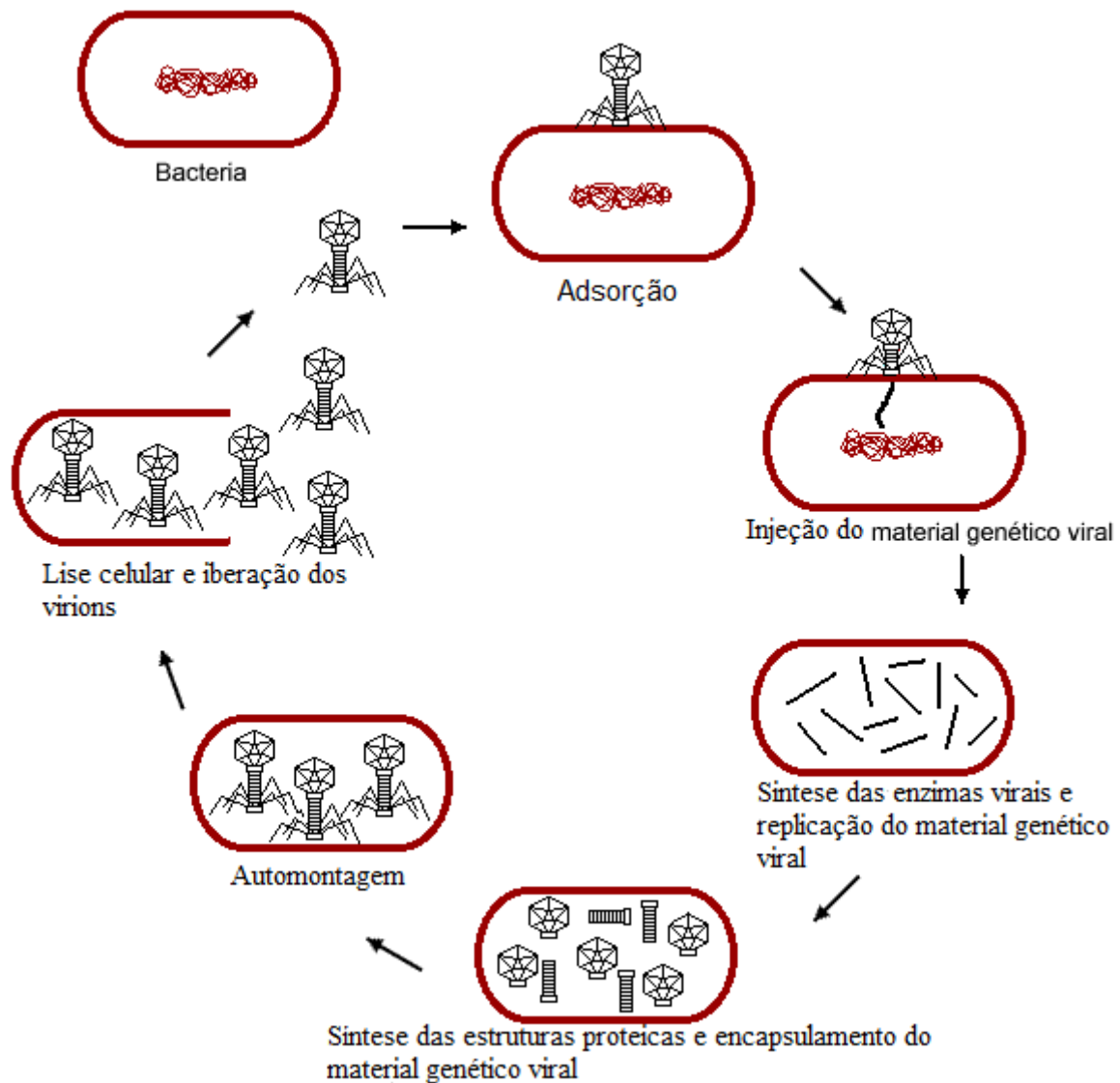


Figura 2: Esquema do ciclo de replicação viral. (Traduzida)

Fonte: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos.htm>

O bacteriófago T4 é um vírus de DNA complexo, sendo que esse codifica sua própria DNA polimerase A, além de produzir todas as oito proteínas que formam seu próprio complexo replissomo para facilitar a síntese do genoma do fago. Além disso, acredita-se que o genoma

deste vírus sofre permutação, ou seja, seu genoma parece ser linearizado pela abertura em porções diferentes de genomas circulares idênticos, já que se observa em uma população de vírions provenientes de um único vírus genomas com um mesmo conjunto de genes, porém dispostos em ordem diferentes, além de ter um genoma com extremidades redundantes, ou seja, algumas sequências são duplicadas em ambas as pontas da molécula de DNA (MADIGAN *et al.*, 2016).

Com o material genético viral dentro da célula procariota hospedeira, acontece a reprogramação das atividades biológicas da mesma, voltando a maquinaria celular para a produção de novos vírus. Após um minuto da infecção, já se dá início à transcrição dos genes fágicos. Em aproximadamente quatro minutos, tem-se a tradução do RNA mensageiro viral, gerando as proteínas do replissomo viral, partindo então para a replicação do DNA viral (MADIGAN *et al.*, 2016).

O genoma do T4 é replicado como uma unidade, depois várias unidades genômicas são sintetizadas gerando um concatâmero. Durante o empacotamento do DNA, o concatâmero não é clivado em sequências específicas, mas em segmentos longos o suficiente para preencher a cabeça de fagos geradas. Os fagos podem modificar seus ácidos nucleicos como medida de proteção contra enzimas da bactéria hospedeira. No caso do fago T4, acontece a substituição da citosina pela base 5-hidroximetilcitosina (MADIGAN *et al.*, 2016).

O DNA do T4 é forçosamente bombeado para um capsídeo pré-montado utilizando um motor de empacotamento movido a energia. O motor é descartado e a cabeça do capsídeo é selada. Só então são adicionadas as fibras da cauda e outros componentes do vírion por automontagem. O genoma do fago codifica duas proteínas para romper os obstáculos da liberação, que são a membrana citoplasmática e a camada de peptideoglicano, causando a lise do hospedeiro.

Para cada célula hospedeira infectada, podem ser gerados, aproximadamente, 100 vírions em uma faixa de tempo de 25 minutos, até a lise do hospedeiro e liberação do vírus no meio externo. Sendo assim, o fago T4 é um bacteriófago de ciclo lítico (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os bacteriófagos T4 são comumente utilizados como base para estudo da replicação do genoma viral (MADIGAN *et al.*, 2016), podendo ser usado como modelo para melhorar o entendimento sobre vírus ainda pouco conhecidos, como os fagos de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa não fermentativa baciliforme, pode ser encontrada no solo e na água de diversos ambientes, sendo que a maior parte das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares (KONEMAN, 2001 & WINN, 2008).

É um patógeno humano oportunista comum, causador de infecções potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos (KERR; SNELLING, 2009). Em indivíduos imunocompetentes, *P. aeruginosa* é causa comum de otite média crônica e ceratite bacteriana (GOVAN; DERETIC, 1996).

1.7. Resistência a antibióticos

Diversas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a muitos antibióticos vêm sendo frequentemente encontradas em amostras hospitalares, tornando muito difícil o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* com antibióticos disponíveis atualmente (GISKE *et al.*, 2008; VEESENMEYER *et al.*, 2009).

O surgimento de patógenos resistentes aos antibióticos existentes tem impulsionado a busca por novos métodos microbicidas. Sendo assim, estudos indicam que o uso de bacteriófagos para lisar células bacterianas pode ser uma alternativa para esse tratamento (COATES; HU, 2007).

1.8. Justificativa

É consenso que a resistência bacteriana a antibióticos é um importante fator no aumento dos índices de mortalidade nos pacientes criticamente doentes (AZEVEDO *et al.*, 2005), e que as infecções por micro-organismos resistentes são um problema de saúde pública, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais (HAMBRAEUS *et al.*, 2006).

Neste contexto, destaca-se a importância clínica de *P. aeruginosa*, considerando seus níveis crescentes de resistência, relacionada à sua característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos e de carrear plasmídeos e outros elementos genéticos de resistência (LIVERMORE, 2002; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Diante disso, torna-se importante a pesquisa e o desenvolvimento de métodos alternativos e complementares para o tratamento de infecções por bactérias resistentes aos medicamentos convencionais.

Em estudo recente, foi relatado que bacteriófagos infectaram *Pseudomonas* que estavam se proliferando em biofilme (ALEMAYEHU *et al.*, 2012). Os biofilmes são comunidades microbianas ligadas à uma superfície com composição, estrutura, características e propriedades fenotípicas e bioquímicas distintas das suas congeneres de natação livre (MAH *et al.*, 2003).

Resultados semelhantes foram relatados por Hanlon *et al.* (2001), que observaram uma diminuição de 100 vezes do título de *P. aeruginosa* quando utilizaram fagos em grandes

quantidades. Além disso, o pré-tratamento de cateteres com um coquetel de fagos de *Pseudomonas* evitou a formação de biofilme (FU *et al.*, 2010).

Além do uso de fagos na terapia de doenças bacterianas, os bacteriófagos possuem diversas outras aplicações, como o uso como agente bactericida em alimentos (HUDSON *et al.*, 2005). O FSIS (*Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service* dos EUA) aprovou o uso de uma mistura de seis bacteriófagos específicos para o patógeno alimentar *Listeria monocytogenes* (ListShield™, fabricado pela empresa Intralytix Inc.). Essa mistura de fagos é utilizada em carnes e produtos de origem avícola.

Outra forma de aplicação alternativa ao uso direto de fagos como antimicrobianos é o uso de proteínas codificadas por eles. As endolisinas são responsáveis por degradar o peptídeoglicano, e as holinas rompem a membrana celular da célula infectada. Essas proteínas, portanto, demonstram ter uma significativa ação antibacteriana (YOUNG; BLÄSI, 1995; DRULIS-KAWA *et al.*, 2015).

Além disso, fagos com potencial de uso terapêutico necessitam ser caracterizados biologicamente e geneticamente antes que possam ser usados em testes clínicos. A caracterização genômica possibilita saber se o bacteriófago é unicamente lítico ou se apresenta a característica de se integrar ao genoma bacteriano, determinando sua eficácia de ação (GROTH; CARLOS, 2004; CHO *et al.*, 2002; GRAINGE; JAYARAM, 1999).

Mais de 50% dos produtos gênicos dos bacteriófagos são hipotéticos e não possuem uma função definida, em função da ausência de novos dados experimentais. Além disso, cerca de 50% das cepas bacterianas as quais possuem seu material genético sequenciado apresentam profagos em seu genoma, chegando a compor cerca de 20% do genoma da bactéria (KLUMPP *et al.*, 2013).

Por conseguinte, através dos estudos de genômica, podem-se esclarecer questões essenciais a respeito de mecanismos de infecção dos bacteriófagos, assim como informações sobre seu ciclo, o procedimento de replicação do material genético do mesmo e a evasão da defesa bacteriana por esses vírus (KLUMPP *et al.*, 2013).

Sendo assim, esse trabalho visa padronizar uma forma de extração de DNA que seja eficaz para obter o material genético de bacteriófagos. Para isso, será utilizado o bacteriófago T4, já que é o principal modelo de estudo de bacteriófagos. Com o protocolo padronizado, com uma eficiência na extração de DNA, poderá então ser usado na caracterização do genoma de outros fagos, tais como os de *P. aeruginosa*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar um protocolo de extração de DNA viral usando como modelo o bacteriófago T4.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter colônias isoladas de *Escherichia coli* para utilizar na replicação do bacteriófago T4;
- Realizar o cultivo dos bacteriófagos T4;
- Executar o protocolo de extração com base no uso de tratamento de proteinase K e fenol/clorofórmio;
- Fazer os ajustes necessários para obter o DNA dos fagos purificado;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram utilizados os estoques da cepa B4 de *E. coli* e do bacteriófago T4 do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Além disso, amostras de *Pseudomonas aeruginosa* infectadas com fagos, SPM 198/30, SPM 148/10 e SPM 175/50, foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Molecular da UFU, além da cepa de referência PAO-1 de *P. aeruginosa* (STOVER *et al.*, 2000).

3.2. Obtenção de colônias isoladas das amostras bacterianas

A amostra de *E. coli* B4 foi cultivada primeiramente em meio *Luria-Bertani* (LB) ágar para a obtenção de colônias isoladas. Essa colônia foi cultivada novamente em meio LB ágar 0,8%, e a nova colônia isolada dessa cultura foi cultivada em 1 mL de meio LB em um tubo de fundo cônico de 50 mL *overnight* (O/N) a 37°C, sob agitação. À cultura foram adicionados 4 mL de LB e a suspensão foi novamente incubada sob agitação a 37°C por 2 h. A cultura foi colocada em um recipiente com gelo, onde foi deixada por 10 min. O mesmo procedimento foi usado na obtenção de clones de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3. Preparo de alíquota para estocagem

Da cultura preparada por incubação O/N, 1 mL foi transferido para microtubo contendo glicerol para a concentração final de 10% e, após agitação, a suspensão foi estocada a -80°C.

3.4. Teste do protocolo A de extração de ácido nucléico de bacteriófago:

Para a extração de DNA de fago T4, uma alíquota da suspensão do clone de bacteriófago foi inoculada em 49 mL LB contendo 1 mL de uma diluição 1:10 da suspensão de *E. coli* B4 em fase exponencial de multiplicação e a cultura foi incubada O/N sob agitação à 37°C (LI *et al.*, 2010). A suspensão foi tratada com 500 µL de clorofórmio, incubada por 30 minutos e

centrifugada a 11000 xg por 15 min à 37°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo NaCl para 1 M.

Em seguida, outra centrifugação foi realizada e o sobrenadante transferido para um tubo contendo polietilenoglicol (PEG) 6000 para concentração de 10%. Após a dissolução do PEG, a mistura foi incubada O/N a 4°C. Novamente, o tubo será centrifugado a 11000 xg por 20 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 0,5 mL PBS. Para remoção do PEG, 1 vol clorofórmio foi adicionado ao tubo, seguido de agitação em vortex por 60 s e centrifugação a 11000 xg por 15min.

A fase superior foi transferida para novo microtubo e o tratamento com clorofórmio foi repetido, até que a camada de PEG formada na interfase entre o clorofórmio e a fase aquosa não era mais observada. À suspensão de bacteriófagos, foram adicionados MgCl₂, DNase I e RNase A para concentrações finais de 4,2 µM, 2 U/ml e 5 µg/ml, respectivamente, a fim de se remover ácidos nucleicos bacterianos.

Em seguida, EDTA pH 8,0 e SDS foram adicionados para 0,5 M e 10%, respectivamente, seguido de agitação e incubação a 68°C por 15 min. Proteinase K foi adicionada para 10 mg/ml, e a mistura foi incubada a 58°C por 2 h para a lise dos bacteriófagos. Um volume de fenol tamponado com Tris-HCl pH 8,0/clorofórmio (volume/volume) foi adicionado ao lisado e o tubo foi agitado por 60 s em vortex. Após agitação em vortex e centrifugação a 11000 xg por 10 min, a fase superior foi transferida para novo microtubo e o material genético foi precipitado por adição de 0,1 volume de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e 0,7 volume de isopropanol.

Após agitação por inversão, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, o precipitado (DNA) lavado com etanol 75% e ressuspenso com 20 µl de TE modificado (Tris-HCl 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 8,0). (Li *et al.*, 2010)

3.5. Teste do protocolo B de extração de DNA de bacteriófago

Para a extração de DNA de fago T4, uma alíquota da suspensão do clone de bacteriófago foi inoculada em 49 mL LB contendo 1 mL de uma diluição 1:10 da suspensão de *E. coli* B4 em fase exponencial de multiplicação e a cultura foi incubada O/N sob agitação à 37°C. A suspensão foi tratada com 500 µL clorofórmio, incubada por 30 minutos e centrifugada a 11000 xg por 15 min à 37°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo NaCl para 2 M.

Em seguida, outra centrifugação foi realizada e o sobrenadante transferido para um tubo contendo polietilenoglicol (PEG) 6000 para concentração de 20%. Após a dissolução do PEG, a mistura foi incubada por 48 h a 4°C. Novamente, o tubo será centrifugado a 11000 xg por 20 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 0,5 ml PBS. Para remoção do PEG, 1 vol clorofórmio foi adicionado ao tubo, seguido de agitação em vortex por 60 s e centrifugação a 11000xg por 15 min.

A fase superior foi transferida para novo microtubo e o tratamento com clorofórmio foi repetido, até que a camada de PEG formada na interfase entre o clorofórmio e a fase aquosa não era mais observada. À suspensão de bacteriófagos, foram adicionados MgCl₂, DNase I e RNase A para concentrações finais de 4,2 µM, 2 U/ml e 5 µg/ml, respectivamente, a fim de se remover ácidos nucleicos bacterianos.

Em seguida, EDTA pH 8,0 foi adicionado para 0,5 M, seguido de agitação e incubação a 68°C por 15 min. Proteinase K e SDS foram adicionados para 10 mg/ml e 10%, respectivamente, e a mistura foi incubada a 58°C por 2 h para a lise dos bacteriófagos. Um volume de fenol tamponado com Tris-HCl pH 8,0/clorofórmio (volume/volume) foi adicionado ao lisado e o tubo foi agitado por 60 s em vortex.

Após agitação em vortex e centrifugação a 11000 xg por 10 min, a fase superior foi transferida para novo microtubo e o material genético foi precipitado por adição de 0,1 volume de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e 0,7 volume de isopropanol. Após agitação por inversão, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, o precipitado (DNA) lavado com etanol 75% e ressuspenso com 20 µl de TE modificado (Tris-HCl 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.6. Teste do protocolo C de extração de DNA de bacteriófago

Para a extração de DNA de fago T4, uma alíquota da suspensão do clone de bacteriófago foi inoculada em 49mL LB contendo 1mL de uma diluição 1:10 da suspensão de *E. coli* B4 em fase exponencial de multiplicação e a cultura foi incubada O/N sob agitação à 37°C. A suspensão foi tratada com 500 µL de clorofórmio, incubada por 30 minutos e centrifugada a 11000 xg por 15 min à 37°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo NaCl para 2 M.

Em seguida, outra centrifugação foi realizada e o sobrenadante transferido para um tubo contendo polietilenoglicol (PEG) 6000 para concentração de 20%. Após a dissolução do PEG, a mistura foi incubada por 72 h a 4°C. Novamente, o tubo será centrifugado a 11000 xg por 20 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 0,5 ml PBS. Para remoção do PEG, 1 vol clorofórmio foi adicionado ao tubo, seguido de agitação em vortex por 60 s e centrifugação a 11000xg por 15 min.

A fase superior foi transferida para novo microtubo e o tratamento com clorofórmio foi repetido, até que a camada de PEG formada na interfase entre o clorofórmio e a fase aquosa não era mais observada. À suspensão de bacteriófagos, foram adicionados MgCl₂, DNase I e RNase A para concentrações finais de 4,2 µM, 2 U/ml e 5 µg/ml, respectivamente, a fim de se remover ácidos nucleicos bacterianos, sofrendo uma incubação de 1 h à 37°C.

Em seguida, EDTA pH 8,0 foi adicionado para 0,5 M, seguido de agitação e incubação a 68°C por 15 min. Proteinase K e SDS foram adicionados para 10 mg/ml e 10%, respectivamente, e a mistura foi incubada a 58°C por 2 h para a lise dos bacteriófagos. Um volume de fenol tamponado com Tris-HCl pH 8,0/clorofórmio (volume/volume) foi adicionado ao lisado e o tubo foi agitado por 60 s em vortex.

Após agitação em vortex e centrifugação a 11000 xg por 10 min, a fase superior foi transferida para novo microtubo e o material genético foi precipitado por adição de 0,1 volume de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e 0,7 volume de isopropanol. Após agitação por inversão, a mistura foi incubada à -20°C por 72 h. E então foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, o precipitado (DNA) lavado com etanol 75% e ressuspenso com 20 µl de TE modificado (Tris-HCl 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.7. Análise do material genético do bacteriófago:

Cerca de 2 µL da amostra do material genético obtido foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,4% em tampão TBE 0,5X a 100 V e o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.8. Cultivo e indução do ciclo lítico em bacteriófagos de *P. aeruginosa*

As amostras de *P. aeruginosa* previamente infectadas com bacteriófagos foram cultivadas em meio LB ágar, assim como uma amostra da cepa PAO-1, que não apresenta infecção, para controle. As placas foram cultivadas a 37°C por 4 h e a metade de cada placa foi exposta à luz UV por 7 s para indução do ciclo lítico dos bacteriófagos presentes nas bactérias. A cultura será incubada à temperatura ambiente O/N, para a confirmação da observação de lise. Neste caso, o procedimento será repetido, no entanto, expondo a placa inteira à luz UV, com a placa contendo PAO-1 tendo somente a metade exposta.

3.9. Preparo de estoque de bacteriófagos:

À cultura mencionada no tópico anterior, 2 mL de LB líquido foi adicionado à superfície do meio, seguido de incubação por 30 min à temperatura ambiente, sob agitação em plataforma. O sobrenadante foi transferido para um microtubo, no qual foram adicionadas duas gotas de clorofórmio. Após agitação e centrifugação, o novo sobrenadante foi transferido para outro tubo, o qual será estocado a -20°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e purificação do DNA em bacteriófagos T4

Inicialmente, realizou-se a extração do DNA de bacteriófago T4 utilizando um protocolo simplificado, por meio de digestão com proteinase K 10mg/mL e SDS 10%. Porém, ao analisar o perfil eletroforético, foi observada um arraste, que pode significar que o DNA obtido pode ter sido fragmentado no processo (Figura 3).

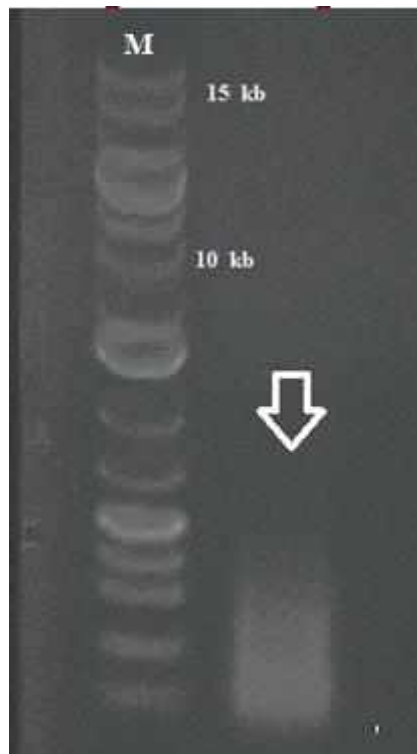


Figura 3: Eletroforese em gel da agarose com a amostra de DNA extraído de bacteriófago T4. A seta indica a banda formada pelo DNA do bacteriófago (amostra A). M: marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder Plus (Fermentas).

Para obter um resultado melhor, foram alterados alguns passos no protocolo descrito por Li et al. (2010), começando pela concentração de PEG 6000. Assim, após o tratamento da cultura de bacteriófago T4 com clorofórmio e adição de NaCl, a suspensão foi dividida em dois tubos. Em um, PEG 6000 foi adicionado para concentração final de 10% (LI et al., 2010) e no outro, para 20%, sendo o segundo com o melhor resultado, porém o perfil eletroforético ainda exibiu arraste. Além disso, as amostras com PEG foram incubadas por dois dias à 4°C. O polietilenoglicol já foi utilizado em outros trabalhos como o de Lewis et al., (1988), para a recuperação de vírus como o da hepatite A, apresentando resultados semelhantes aos desse trabalho.

Outra alteração foi que, logo após o tratamento com DNase I e RNase A, à amostra foi adicionado EDTA para concentração final de 0,5 M e a suspensão foi incubada por 15 minutos

a 68°C, antes de o bacteriófago ser lisado. Assim, a DNase I seria inibida e inativada antes/durante a liberação do DNA do bacteriófago, prevenindo sua degradação.

Além disso, após a adição de isopropanol e acetato de sódio à amostra, esta foi incubada a -20°C por 2 dias, para que fosse precipitada a maior quantidade possível de DNA. Com todas essas alterações pôde-se obter então uma amostra de DNA com menos fragmentação que pode ser observado por meio de uma banda de massa molecular acima de 20 Kpb no perfil eletroforético (Figura 4).

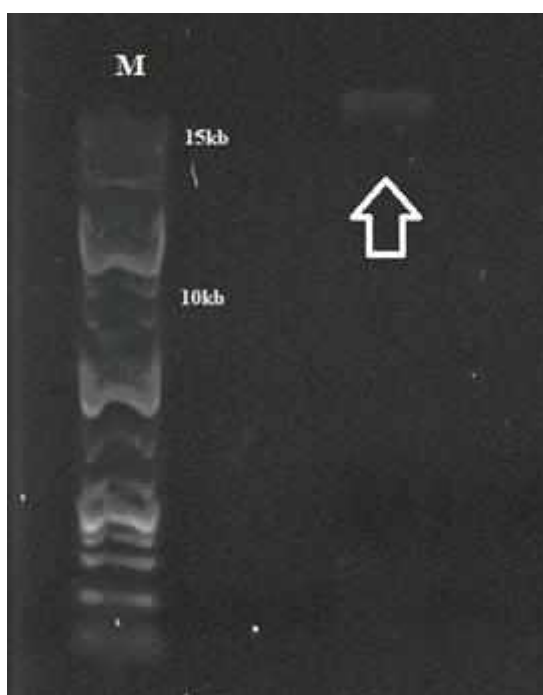


Figura 4: Eletroforese em gel da agarose com a amostra de DNA extraído de bacteriófago T4. A seta indica a banda formada pelo DNA do bacteriófago (amostra B). M: marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder Plus (Fermentas).

A precipitação de DNA com isopropanol e acetato de sódio é usada em outros trabalhos com resultados satisfatórios na concentração final da amostra, como no trabalho de Paiva et al., (2007). Podendo assim deduzir que essa alteração foi de importância significativa no resultado final.

Também foram feitos testes para verificar se meio de cultura sólido poderia ser utilizado. Assim, foram feitas duas culturas em meio com ágar e duas em meio líquido. Nos meios de cultura sólido, após a observação de lise confluyente, 2 mL de meio LB líquido foi colocado sobre cada cultura e as placas foram incubadas por 30 min em plataforma basculante. As suspensões foram divididas em dois, um para precipitação com PEG 6000 e o outro com tratamento diretamente com DNase I e RNase A. Neste caso, melhor resultado foi observado sem a precipitação com PEG (Figura 5), com qualidade semelhante ao perfil eletroforético da amostra obtida pela cultura em meio líquido na qual houve precipitação com PEG.

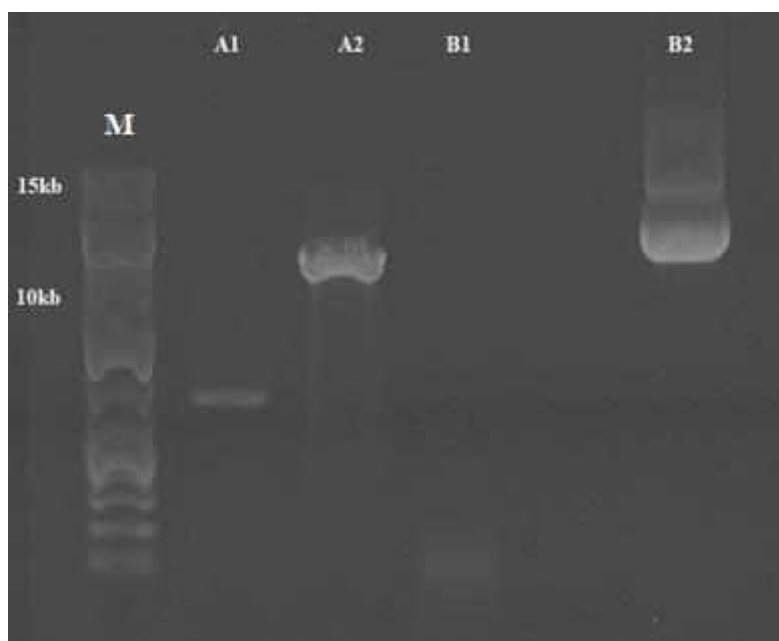


Figura 5: Padrão eletroforético das amostras de DNA de bacteriófago T4, nas quais, (A2) é relativo à cultura em meio sólido mais o tratamento com PEG, (A1) referente à cultura em meio sólido sem o tratamento com PEG, (B1) referente à cultura em meio líquido sem tratamento com PEG, e (B2) à cultura em meio líquido com tratamento com PEG.

Finalmente, foi realizado uma extração utilizando o protocolo C e o rendimento de DNA obtido foi superior (Figura 6).

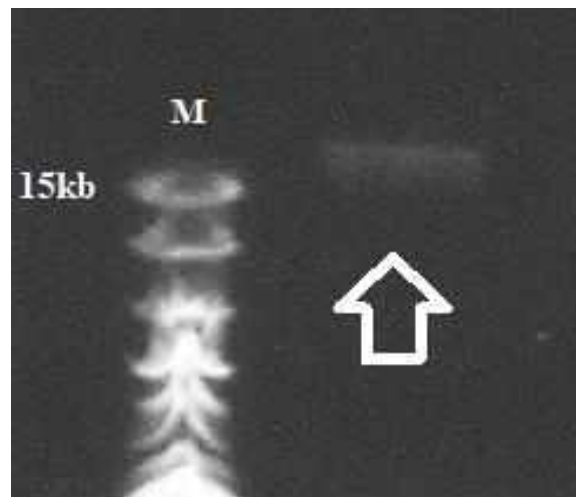


Figura 6: Eletroforese em gel da agarose com a amostra de DNA extraído de bacteriófago T4. A seta indica a banda formada pelo DNA do bacteriófago (amostra C). M: marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder Plus (Fermentas).

Para a liberação do material genético viral, foram usados o detergente SDS 10% e a proteinase K, que obtiveram resultados eficientes nesse estudo. Estudos anteriores utilizaram para a extração de DNA de material fixado e parafinado o detergente SDS e a digestão enzimática com proteinase K, verificando a validade dessas substâncias na extração do DNA (ISOLA et al., 1994).

O lisado contendo proteínas e ácidos nucleicos (DNA), existe a necessidade de separar os ácidos nucleicos das outras moléculas. O método mais utilizado para essa separação emprega os solventes orgânicos fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O princípio dessa separação é a diferença de solubilidade dos ácidos nucleicos e proteínas nestes solventes orgânicos, de forma que após a realização a porção de proteínas ficará condensada junto ao solvente, e os ácidos nucleicos ficaram suspensos no meio (ISOLA et al., 1994; BLOOM et al., 1990). No estudo foram usados os solventes fenol/clorofórmio, para tal fim.

No tratamento enzimático com a enzima *Kpn* I, observou-se um arraste no padrão eletroforético ao invés de bandas de DNA de 1,5 e 6 Kbp produzidos pela digestão. Tendo em vista que o genoma do bacteriófago T4 possui 169 Kbp, é possível que o processo de extração

de DNA, envolvendo agitação e centrifugação, assim como o processo de congelamento e descongelamento da amostra, para armazenamento e uso, podem ter gerado fragmentação das moléculas de DNA.

4.2. Indução do ciclo lítico dos bacteriófagos em *P. aeruginosa*

As placas com amostras de bacteriófagos de *P. aeruginosa* apresentaram lise na porção que foi exposta à luz UV, assim como as placas que foram completamente expostas (Figura 7), embora apresentassem colônias resistentes. Já a placa contendo a cepa PAO-1 (não infectada) não apresentou lise, até na extensão exposta à luz UV. Assim, pode-se concluir que a exposição de 7 segundos à luz UV foi capaz de ativar o ciclo lítico dos bacteriófagos da *P. aeruginosa*, já que a lise foi observada apenas nas placas com as bactérias infectadas.



Figura 7: Culturas de *P. aeruginosa* infectadas com fagos após a exposição à luz UV.

5. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos, conclui-se que o protocolo C foi o mais eficaz para obter o material genético de bacteriófago em boa quantidade. No entanto, devido à possível fragmentação do DNA durante os processos de sua extração e armazenamento, outras alterações poderão ser necessárias para melhorar a integridade dessas moléculas. Esse protocolo poderá

então ser usado na identificação e caracterização de fagos ainda não conhecidos, proporcionando o conhecimento sobre esse vírus, que possui tantas formas de aplicação na biotecnologia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ACKERMANN, H.W. Phages examined in the electron microscope. **Arch Virol.**, 152, 227-243, 2007
- ALEMAYEHU, D.; CASEY, P. G.; MCAULIFFE, O.; GUINANE, C. M.; MARTIN, J. G.; SHANAHAN, F.; COFFEY, A.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. **MBio.**, 3:e00029-12, 2012
- AZEVEDO, F.M. Micro-organismos multiresistentes. In: OLIVEIRA, A.C. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. 3. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2005.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.
- BRUSSOW, H.; HENDRIX, R.W. Phage Genomics: Small Is Beautiful. **Cell**, v. 108, p. 13 – 16, 2002.
- BRÜSSOW, H.; HENDRIX, R. W. Phage genomics: small is beautiful. **Cell**. 11;108(1):13-6. Jan. 2012.
- CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6554 – 6563, 2005.
- CEYSSENS, P-J & LAVIGNE, R. Bacteriophages of *Pseudomonas*. **Future Microbiol.**, 5, 1041-1055, 2010.
- CHAN, B. K.; ABEDON, S. T.; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiol.**, 8, 769-783, 2013.
- CHO, E. N. et al. Interactions between Integrase and Excisionase in the Phage Lambda Excisive Nucleoprotein Complex. **J Bacteriol**. 184(18): 5200–5203. Set. 2002.
- COATES, A.R., and HU, Y. 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **Br. J. Pharmacol**. 152(8): 1147–1154. doi:10.1038/sj.bjp.0707432. PMID: 17704820.
- CONNERTON, P.L.; TIMMS, A.R.; CONNERTON, I.F. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 255 – 265, 2011.
- DRULIS-KAWA, Z. et al. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. **Curr Med Chem**. 22(14): 1757–1773. Mai. 2015.
- FRUCIANO, D. E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 18, p. 19-26. 2007.
- FU, W.; FORSTER, T.; MAYER, O.; CURTIN, J. J.; LEHMAN, S. M.; DONLAN, R. M. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54, 397– 404, 2010.

GISKE, C.G., MONNET, D.L., CARS, O., and CARMELI, Y. 2008. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52(3): 813–821. doi:10.1128/AAC.01169-07. PMID:18070961.

GOVAN, J.R., and DERETIC, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol. Rev.** 60(3): 539–574. PMID:8840786.

GRAINGE, I.; JAYARAM, M. The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. **Mol Microbiol.** 33(3):449-56. Ago. 1999.

GROTH, A. C.; CALOS, M. P. Phage Integrases: Biology and Applications. **Journal of Molecular Biology.** v. 335. Issue 3. p. 667-678. Jan. 2004.

HAGENS, S. & LOESSNER, M. J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 76, 3, 513 – 519, 2007.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infections**, 64, 3, 217-223, 2006.

HENRIQUEZ, A.P.A.R. Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella* em avicultura. 2008, 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular). **Universidade de Aveiro**. Portugal. 2008.

HUDSON, J. A. et al. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **J Food Prot.** 68:426-437. 2005.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

JOERGER, R. D. 2003. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poult. Science*, 82:640-647.

KERR, K.G., and SNELLING, A.M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **J. Hosp. Infect.** 73(4): 338–344. doi:10.1016/j.jhin.2009.04.020. PMID:19699552.

KIM, SHUKHO, et al. "*Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA1Ø requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities." **Applied and environmental microbiology** 78.17 (2012): 6380-6385.

KLUMPP, J. et al. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. **Brief Funct Genomics**.12(4):354-65. Jul. 2013.

KONEMAN, E.W; ALLEN, S.D; JANDA, W.M; SCHRECHENBERGER, P.C; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico** 5ª Ed. Medsi, São Paulo, 2001.

KRYLOV, V.; SHABUROVA, O.; KRYLOV, S.; PLETENEVA, E. A Genetic Approach to the Development of New Therapeutic Phages to Fight *Pseudomonas aeruginosa* in Wound Infections. **Viruses**, 5, 15-53, 2013.

LEWIS, Gillian D., and THEODORE G. Metcalf. "Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples." **Applied and environmental microbiology** 54.8 (1988): 1983-1988.

LI, L.; YANG, H.; LIN, S.; JIA, S. Classification of 17 newly isolated virulent bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. **Can. J. Microbiol.**, 56, 925–933, 2010.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? **Clinical Infection Diseases**, 34, 5, 634-640, 2002.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAH, Thien-Fah et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 306-310, 2003.

PAIVA, Byanca Regina de et al. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. 2007.

SKURNIK, M. & STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, 296, 5–14, 2006.

STOVER CK, PHAM XQ, ERWIN AL, MIZOGUCHI SD, WARRENER P, HICKEY MJ, BRINKMAN FS, HUFNAGLE WO, KOWALIK DJ, LAGROU M, et al: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature** 2000, 406:959–964.

SUTTLE, C.A. Viruses in the sea, **Nature**, 437(7057), 356–361, 2005.

VEESENMEYER, J.L., HAUSER, A.R., LISBOA, T., and RELLO, J. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. **Crit. Care Med.** 37(5): 1777–1786. doi:10.1097/CCM.0b013e31819ff137. PMID:19325463.

YOUNG, R. BLÄSI, U. Holins: form and function in bacteriophage lysis. **FEMS Microbiol Rev.**17(1-2):191-205. Ago. 1995.