



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**BACTERIÓFAGOS E INFEÇÃO: UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho submetido por
Bárbara Guerra Nunes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BACTERIÓFAGOS E INFEÇÃO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho submetido por
Bárbara Guerra Nunes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Francisco Salvado

outubro de 2017

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Salvado, que aceitou orientar esta tese, me motivou, deu o apoio necessário e sempre se mostrou disponível.

Aos meus pais, que me incentivaram e sempre estiveram prontos a ouvir e a ajudar durante todo o curso.

À minha prima, porque partilhámos muitos momentos durante o curso e porque sem você fazer a tese não ia ser igual.

À minha parceira de box, pelos dois anos magníficos de clínica, os mais importantes do curso.

Resumo

Hoje em dia lidamos cada vez mais com infeções por parte de bactérias patogénicas resistentes à maior parte, ou até mesmo todos os agentes antimicrobianos disponíveis. Este facto pode ser crítico quando se tratam de doentes imunossuprimidos. Assim sendo, a medicina está a regressar à era pré-antibióticos, desenvolvendo métodos anti-infeção alternativos, sendo esta uma das prioridades da medicina moderna e da biotecnologia.

Antes da descoberta dos antibióticos, já era sugerido que as infeções bacterianas poderiam ser prevenidas e até mesmo tratadas com a administração de bacteriófagos.

A palavra bacteriófago deriva do grego *phagein*, que significa devorar. Assim, o bacteriófago “devora” ou seja, mata bactérias, provocando a sua lise.

A terapia fágica apresenta várias vantagens em relação aos antibióticos, por isso, esta vertente está a ser cada vez mais estudada e investigada.

Palavras-chave: bacteriófagos; infeção; antibióticos; bactérias

Abstract

Nowadays we are increasingly dealing with infections from pathogenic bacteria resistant to most, or even all available antimicrobial agents. This fact can be critical when it comes to immunosuppressed patients. As such, medicine is returning to the pre-antibiotic era, developing alternative anti-infection methods, which is a top priority in modern medicine and biotechnology.

Before the discovery of antibiotics, it was already suggested that bacterial infections could be prevented and even treated with bacteriophage administration.

The word bacteriophage is derived from the Greek *phagein*, which means to devour. Thus, the bacteriophage "devours" or kills bacteria, causing their lysis.

Phage therapy has several advantages over antibiotics, so this is being increasingly studied and investigated.

Key-words: bacteriophages; infection; antibiotics; bacteria

Índice Geral

1. Introdução	13
1.1. O que são Bacteriófagos	13
1.2. Classificação Taxonómica	15
2. Desenvolvimento	19
2.1. História dos Bacteriófagos	19
2.2. Ciclo de Vida	20
2.2.1. Fagos Líticos.....	22
2.2.2. Fagos Lisogénicos	23
2.3. Principais Características dos Fagos e das Proteínas dos Fagos não Líticos	25
2.4. Mecanismo de Ação	28
2.5. Segurança	30
2.6. Principais Aplicações dos Bacteriófagos em Patologia Médica.....	31
2.6.1. Ação em Infecções	33
2.6.2. Infecções Orais	35
2.7. Falhas na Eficácia da Terapia Fágica.....	39
2.7.1. Especificidade dos bacteriófagos.....	42
2.7.2. Imunogenicidade dos bacteriófagos.....	43
2.7.3. Lise da célula bacteriana.....	44
2.8. Perspectivas de Futuro na Terapia Fágica.....	45
3. Conclusão	47
4. Bibliografia.....	49

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação em diagrama de um bacteriófago (Adaptado de Hanlon, 2007)	14
Figura 2 - Ilustração de bacteriólise induzida por fagos. (1) Adsorção e injeção de DNA; (2) Replicação de DNA; (3) Produção da cabeça e cauda; (4) Síntese de holina e lisina; (5) Empacotamento de DNA; (6) Conclusão da partícula do fago; (7) Disruptura da parede celular e liberação de produtos; (8) Circulação do DNA fágico; (9) Integração do DNA fágico no genoma do hospedeiro. (Adaptado de Matsuzaki et al., 2005).....	21
Figura 3 - Ciclo lítico de um bacteriófago (Adaptado de Hanlon, 2007)	23
Figura 4 - Modo de ação dos principais agentes antimicrobianos e proteínas fágicas (Adaptado de Drulis-Kawa et al., 2012).....	29
Figura 5 - Representação esquemática dos fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam a terapia fágica (Adaptado de Oliveira et al., 2015).....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 –Principais famílias dos bacteriófagos (Adaptado de Hanlon, 2007).....	17
Tabela 2 - Principais características dos fagos líticos e das proteínas de fagos não líticos comoo agentes antimicrobianos (Adaptado de Drulis-Kawa et al., 2012)	27
Tabela 3 –Estudos sobre terapia fágica em humanos e animais (Adaptado de Inal, 2003)	32
Tabela 4 –Alguns dos problemas com os estudos sobre terapia fágica e como podem ser solucionados (Adaptado de Alexander Sulakvelidze, Zempira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001).....	40

Lista de Abreviaturas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PFU – Unidades Formadoras de Placa

pH – Potência de Hidrogênio

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

1. Introdução

Os fagos são dez vezes mais numerosos do que as bactérias no ambiente. Este facto faz com que sejam a forma de vida mais abundante no planeta. São mais frequentemente encontrados em meio aquático, mas são também encontrados em meios com bactérias. Os fagos co-existiram com as bactérias durante os 3-4 bilhões de anos de existência de vida no planeta. (Hanlon, 2007)

Antes da descoberta dos antibióticos, foi sugerido que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas e até mesmo tratadas com a administração de bacteriófagos. Apesar dos estudos clínicos com bacteriófagos não terem sido vigorosos nos Estados Unidos e Europa Ocidental, os fagos continuaram a ser utilizados na União Soviética e no Leste Europeu. (Alexander Sulakvelidze, Zempira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Existem investigações que se centram nas aplicações dos bacteriófagos no que toca a prevenção e tratamento de doenças infecciosas. Na área da medicina dentária, existem resultados que interessam no tratamento de infecções piogénicas. (Inal, 2003)

1.1. O que são Bacteriófagos

Bacteriófagos, ou fagos, são vírus que conseguem infetar células bacterianas. Estes vírus podem ser encontrados em qualquer meio onde esteja o hospedeiro bacteriano. (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek, Maciejewska, Delattre, & Lavigne, 2012)

Já foram descobertos mais de 5500 tipos de bacteriófagos. Cada um dos tipos é capaz de infetar um ou vários tipos de bactérias. São também parasitas obrigatórios da célula bacteriana e mostram vários ciclos de vida: lítico, lisogénico, pseudolisogénico e infecções crónicas. (Drulis-Kawa et al., 2012)

Os bacteriófagos são classificados em famílias, tendo em conta a sua morfologia e tamanho. Aproximadamente 96% dos fagos possuem cauda, mas existem também fagos filamentosos e pleomórficos. (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski, 2011)

O virião do fago consiste em dois componentes básicos, o ácido nucleico (cadeia dupla ou simples de DNA ou RNA) e um invólucro proteico. Alguns possuem também lipídios como componente do invólucro ou de parede lipídica. (Jończyk et al., 2011)

O principal interesse na aplicação de fagos como antimicrobianos está focado nos fagos com cauda lítica, que representam três famílias de *Caudovirales*. A família *Myoviridae* possui a maior cabeça de cápside (aproximadamente 150 nm) e cauda contrátil. A família *Siphoviridae* possui uma cabeça relativamente pequena (entre os 50 e 60 nm, aproximadamente) e uma cauda longa, flexível e não contrátil. A família *Podoviridae* possui uma cápside pequena (entre os 50 e 60 nm, aproximadamente) e uma cauda curta. Também existem relatos de aplicação de fagos cúbicos como o phi174 e Qb ou filamentosos como o M13 e Pf3. (Drulis-Kawa et al., 2012)

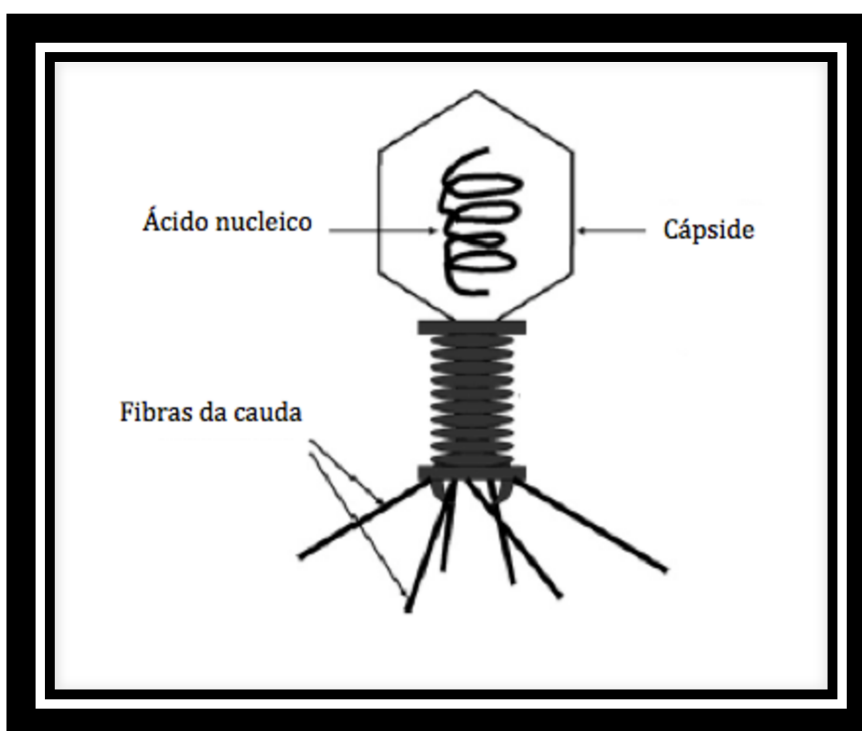


Figura 1 - Representação em diagrama de um bacteriófago (Adaptado de Hanlon, 2007)

1.2. Classificação Taxonómica

As primeiras classificações surgiram aquando do aparecimento dos primeiros tipos de fagos, porém, só em 1940 é que a classificação tornou-se rigorosa, uma vez que foi possível medir os componentes estruturais dos fagos com auxílio do microscópio eletrónico. (Ackermann, 2007)

A partir de 1960 foi possível adicionar o material genético à classificação taxonómica dos fagos. (Ackermann, 2007)

A classificação taxonómica dos fagos tem intuito prático. É impossível memorizar propriedades de 5000 fagos, e não possui utilidade. A classificação é feita para haver reunião de dados, resumir e categorizar informação, e também para simplificar, através da criação de grupos. Isto permite uma identificação simples e precisa. A classificação deve, também, explicar a relação evolutiva entre os fagos. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

Mais especificamente, a classificação visa o ensino, a identificação de novos fagos, deteção de relação entre fagos, a manutenção de uma base de dados e coleções de fagos, identificação de fagos com propriedades terapêuticas e industriais e identificação de fagos prejudiciais na biotecnologia e indústria da fermentação, para posterior erradicação. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

A classificação é também um pré-requisito para as pesquisas recentes, genómica comparativa, porque facilita as conclusões acima do nível de vírus individual. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

Bacteriófagos infetam *Eubacteria* e *Archaea*, por esse motivo, são classificados como “vírus de procariontes”. Estes são capazes de infetar mais de 140 géneros de bactérias, incluindo, aeróbias, anaeróbias, formadores de exosporos e endosporos, cianobactérias, espiroquetas, micoplasmas e clamídias, rebentos de bactéria, bactérias deslizantes, ramificadas, acasadas, halófilas e metanogénicas extremas, e *Archaea* hipertermofílica (crescimento a 100°C). (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

Partículas similares ao Coliphage 17 também foram encontrados em endosimbiontes bacterianos de paramecia e insetos. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

A estrutura, físico-química e propriedades biológicas dos fagos são heterogêneas, o que sugere que a sua origem é polifilética. Viriões possuem caudas, poliédricos, filamentosos e pleomórficos. As famílias de fagos são listadas desta forma por conveniência. A maioria destas famílias contém DNA de dupla cadeia, contudo, ssDNA, ssRNA ou dsRNA também são encontrados em pequenos grupos. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

Todos os fagos de DNA possuem apenas uma molécula de DNA. Vários fagos possuem envelopes lipídicos ou vesículas internas. Mais de 5000 fagos foram observados no microscópio eletrônico. Os fagos são a maior categoria estudada, por este método. Eles são classificados em 1 ordem, 13 famílias e 31 géneros. A família é definida pelo ácido nucleico e morfologia geral do virião. Apesar de haver 40 critérios para a classificação, não existem critérios universais para o género e espécie. (Kutter & Sulakvelidze, 2004)

A classificação taxonómica vai sofrendo modificações devido às atualizações que surgem. (Hanlon, 2007)

FAMÍLIA	MORFOLOGIA	GENOMA
<i>Corticoviridae</i>	Cápsula icosaédrica Camada lipídica	Cadeia dupla de DNA circular
<i>Cystoviridae</i>	Cápside icosaédrica Lípidos Invólucro	Cadeia dupla de RNA linear segmentado
<i>Fuselloviridae</i>	Sem cápside Pleomórfico Lípidos	Cadeia dupla de DNA circular super-helicoidal
<i>Inoviridae</i>	Simetria Helicoidal Forma de bastão	Cadeia simples de DNA circular

<i>Leviviridae</i>	Cápside quase icosaédrica	Cadeia simples de RNA linear
<i>Lipothrixviridae</i>	Filamentos Invólucro Lípidos	Cadeia dupla de DNA linear
<i>Microviridae</i>	Cápside icosaédrica	Cadeia simples de DNA circular
<i>Myoviridae</i>	Cauda contrátil	Cadeia dupla de DNA linear
<i>Plasmaviridae</i>	Pleomórfico Invólucro Lípidos Sem cápside	Cadeia dupla de DNA circular super-helicoidal
<i>Podoviridae</i>	Cauda curta não contrátil	Cadeia dupla de DNA
<i>Rudiviridae</i>	Bastões helicoidais	Cadeia dupla de DNA
<i>Siphoviridae</i>	Cauda longa não contrátil	Cadeia dupla de DNA
<i>Tectiviridae</i>	Cápside icosaédrica Vesícula lipoproteica interior	Cadeia dupla de DNA

Tabela 1 –Principais famílias dos bacteriófagos (Adaptado de Hanlon, 2007)

2. Desenvolvimento

2.1. História dos Bacteriófagos

Existe controvérsia no que toca à descoberta dos bacteriófagos. Em 1896, Ernest Hankin, um bacteriologista britânico, reportou a presença de atividade antibacteriana (contra *Vibrio cholerae*) observada nas águas do Ganges, na Índia, e sugeriu que uma substância não identificada (que passou por filtros de porcelana finos e era lábil ao calor), era responsável por este fenómeno e pela limitação do alastramento das epidemias de cólera. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Dois anos depois, Gamaleya, um bacteriologista russo, observou um fenómeno semelhante, trabalhando com *Bacillus subtilis*. Vários outros investigadores também observaram estes fenómenos, porém, nenhum deles explorou os seus resultados e conclusões, até Frederick Twort, um bacteriologista treinado de Inglaterra, reintroduzir o assunto quase 20 anos após a descoberta de Hankin. Devido a dificuldades financeiras, Twort não prosseguiu nas suas investigações. Após mais 2 anos, os bacteriófagos foram oficialmente descobertos por Felix d'Herelle, um microbiologista Francês-Canadense do Institut Pasteur em Paris. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

A descoberta e redescoberta dos bacteriófagos por d'Herelle é frequentemente associada ao surto de desintéria hemorrágica na tropa francesa, em Maison-Laffitte em Julho-Agosto de 1915, apesar de d'Herelle ter observado o fenómeno primeiro em 1910 (estudou meios microbiológicos de controle de um epizoótico de gafanhotos no México). (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Vários soldados foram hospitalizados e d'Herelle conduziu uma investigação sobre o surto. Nestes estudos d'Herelle realizou filtrados de amostras fecais livres de bactérias e misturou, incubando com estirpes de *Shigella* isoladas dos pacientes. As misturas foram inoculadas em animais (como meio de desenvolvimento de uma vacina contra a desintéria bacteriana) e num meio de agar, para posteriormente se observar o

crescimento da bactéria. No agar, foram observadas zonas transparentes pequenas. D'Herelle publicou a descoberta depois da apresentação na reunião da Academia de Ciências. D'Herelle sabia a natureza do fenómeno, e disse que era um vírus capaz de parasitar bactérias. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

O nome “bacteriófago” foi proposto por d'Herelle. Este nome foi formado por “bacteria” e “phagein” (comer ou devorar em Grego), o que implicava que estes fagos “comiam ou devoravam” as bactérias. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

2.2. Ciclo de Vida

Os bacteriófagos podem ter dois tipos de ciclo de vida: virulento ou temperado. Os fagos virulentos provocam a lise rápida e a morte da célula bacteriana hospedeira. Os fagos temperados passam parte do seu ciclo de vida num estado inativo, chamado prófago. No ciclo lisogénico, o DNA viral geralmente é integrado no DNA da célula hospedeira, mas pode também existir como plasmídeo. O DNA do prófago é replicado quando o genoma da célula hospedeira replica, assim, as células filhas vão herdar o DNA viral. Os fagos temperados possuem pouco valor no que toca a terapia fágica. (Hanlon, 2007)

O vírus encontra-se com o hospedeiro bacteriano durante o movimento e liga-se através de locais receptores que podem estar localizados em vários componentes da superfície celular. Estes componentes podem ser proteínas, oligossacáridos, ácido teicóico, peptidoglicano e lipopolissacáridos. Os locais receptores podem estar presentes na cápsula celular, no flagelo ou nos pili. A ligação começa por ser reversível, e depois passa a irreversível. (Hanlon, 2007)

O material genético do fago é transmitido ao hospedeiro. Ocorre depois a injeção do genoma do fago para a célula bacteriana. A injeção pode ocorrer através de vários mecanismos, que dependem da morfologia do vírus, mas geralmente envolve a contração da cauda e formação de um buraco na parede celular da bactéria. Muitas das

bases presentes no DNA do fago são quimicamente modificadas para conferir proteção contra o ataque por restrição celular e nucleases. (Hanlon, 2007)

O genoma viral é transcrito pela RNA polimerase da célula hospedeira, produzindo mRNA que tem efeito sobre o metabolismo da bactéria, estimulando a produção de novos componentes virais. Estes componentes juntam-se, formando um virião. (Hanlon, 2007)

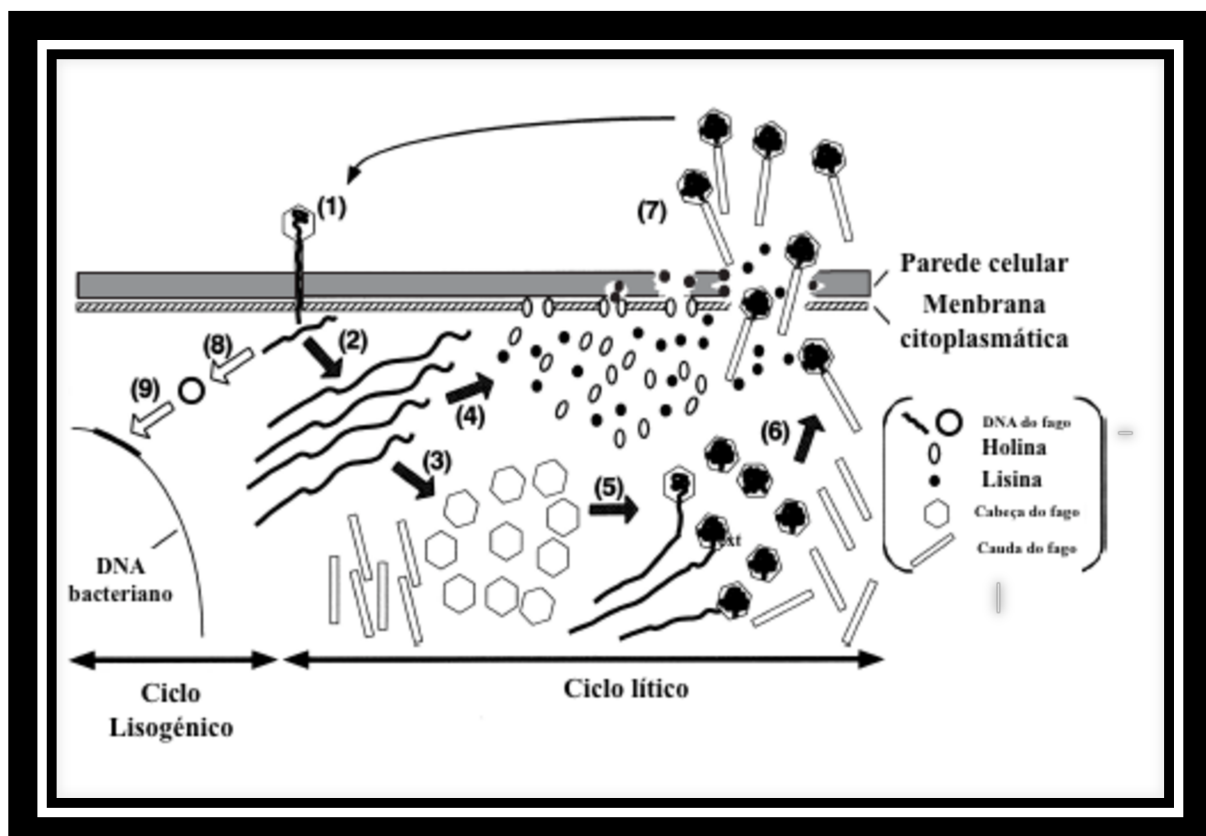


Figura 2 - Ilustração de bacteriólise induzida por fagos. (1) Adsorção e injeção de DNA; (2) Replicação de DNA; (3) Produção da cabeça e cauda; (4) Síntese de holina e lisina; (5) Empacotamento de DNA; (6) Conclusão da partícula do fago; (7) Disruptura da parede celular e liberação de produtos; (8) Circulação do DNA fágico; (9) Integração do DNA fágico no genoma do hospedeiro. (Adaptado de Matsuzaki et al., 2005)

2.2.1. Fagos Líticos

A maioria dos fagos de dupla cadeia de DNA desenvolveram enzimas que atacam o peptidoglicano bacteriano. Estas enzimas podem ser lisozimas (possuem como alvo ligações glicosídicas), endopeptidases (possuem como alvo ligações peptídicas) ou amidases (possuem como alvo ligações amida). Estas enzimas líticas são chamadas enzimas muralíticas, ou endolisinas, e são produzidas dentro do citoplasma, porém, necessitam de outra enzima para atravessar a membrana citoplasmática e atingir o substrato. Esta enzima é uma holina, que quebra a membrana, permitindo que a lisina degrade o peptidoglicano. A holina controla o tempo de lise celular e da libertação o produto do fago. (Drulis-Kawa et al., 2012)

As holinas são pequenas proteínas hidrofóbicas que contém de um a três domínios transmembranares. Assim, estas são classificadas segundos estes domínios. As holinas Classe I possuem três domínios transmembranares com o N-terminal no periplasma e C-terminal em direção ao citoplasma. As holinas Classe II possuem dois domínios transmembranares no N-terminal e o C-terminal no periplasma. As holinas Classe III possuem um domínio transmembranar e um domínio periplasmático muito grande. (Drulis-Kawa et al., 2012)

Alguns fagos possuem morfologia filamentosa. Estes fagos conseguem sair da célula hospedeira por extrusão, através da parede celular, sem causar destruição do hospedeiro. Estes fagos não são relevantes em terapia. O período de tempo entre a adsorção e a lise da célula hospedeira e libertação do produto viral é considerado período de latência. Os fagos capazes de infetar estão presentes na célula hospedeira antes da lise, e podem ser libertados da célula com auxílio de clorofórmio. O período de tempo desde a adsorção até ao aparecimento do primeiro fago induzido pelo clorofórmio é chamado de período eclipse. (Hanlon, 2007)

A partir de uma única célula bacteriana, podem ser libertadas 100 partículas virais. Cada uma destas partículas é capaz de infetar uma célula bacteriana. Os ciclos de infecção podem continuar até a morte de todas as células bacterianas susceptíveis. (Hanlon, 2007)

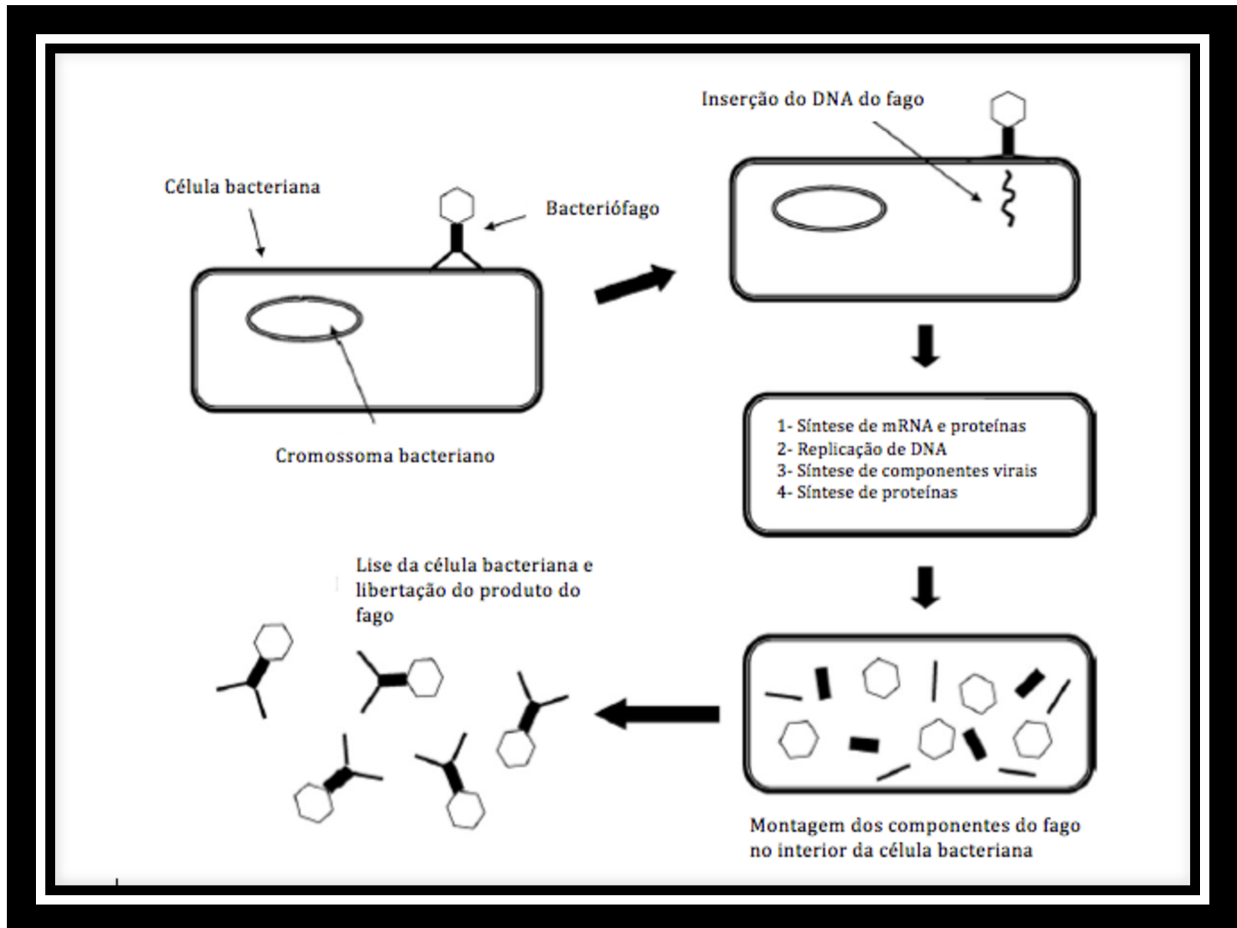


Figura 3 - Ciclo lítico de um bacteriófago (Adaptado de Hanlon, 2007)

2.2.2. Fagos Lisogénicos

Os fagos temperados são vírus que não entram automaticamente no ciclo lítico, mas integram o seu DNA no DNA da célula hospedeira. As células bacterianas são chamadas lisogénicas. Quando o DNA bacteriano replica, o DNA do fago replica ao mesmo tempo, assim, as células filha vão conter DNA viral (prófago). As células sofrem múltiplos ciclos de divisão, e ocasionalmente uma sofrerá lise e libertará um fago. (Hanlon, 2007)

Alternativamente, a população de células lisogénicas pode ser induzida para provocar lise por stress. Esta indução pode consistir em tratamento com agentes mutagénicos ou exposição a luz ultravioleta. Alguns fagos temperados podem alternar entre crescimento lisogénico e lítico, sob influência de altas temperaturas e fase estacionária. (Hanlon, 2007)

O prófago direciona a síntese de uma proteína repressora que bloqueia a transcrição dos seus genes e de bacteriófagos relacionados. A presença de um prófago pode conferir à célula bacteriana imunidade contra a infeção por outros fagos. (Hanlon, 2007)

As bactérias lisogénicas podem possuir vantagens em termos de aquisição de genes que conferem patogenicidade ou virulência aumentada. Quando um prófago escapa da regulação pelo repressor, o seu DNA é libertado e pode começar um ciclo lítico. Porém, a excisão de DNA do prófago é pouco preciso e os genes bacterianos adjacentes ao DNA do prófago podem ser incorporados no DNA do fago infeccioso e transferido para as células hospedeiras. Este processo é chamado transdução e é responsável pela transferência horizontal de genes entre células bacterianas. (Hanlon, 2007)

2.3. Principais Características dos Fagos e das Proteínas dos Fagos não Líticos

CARACTERÍSTICAS	FAGO	PROTEÍNAS DE FAGOS NÃO LÍTICOS
Toxicidade Seletiva	Propagação no hospedeiro bacteriano	Activo apenas em metabolismos microbianos específicos
Espectro Antimicrobiano	Estreito Muito específico, geralmente apenas para uma espécie bacterina Não existem preparações para patogêneos intra-celulares	Estreito ou largo
Influência na Flora Normal	Sem influência Erradicação da estirpe alvo	Pouca influência na flora intestinal
Efeitos Colaterais Graves no Hospedeiro	Endotoxinas e outras toxinas libertadas durante a lise da célula	Endotoxinas e outras toxinas libertadas durante a lise da célula
Eficiência na Morte de Bactérias	Bacteriolítico Morte dependente do título do fago Eficácia de virulência: multiplicidade de infecção, tamanho de rutura, taxa de crescimento Eficaz nas células em crescimento	Bacteriostático/ Bacteriolítico Morte dependente da concentração Concentração mínima inibitória Eficaz nas células em crescimento e nas células que não estão em crescimento

<p>Penetração nos Tecidos, Concentração, Dose, Tempo de Administração</p>	<p>Não definido</p> <p>Tamanho e estrutura da proteína da cápside afeta a concentração sistêmica regulada pela clearance do sistema retículo-endotelial e pelos mecanismos de defesa imune</p> <p>Agente auto-replicante</p> <p>A concentração aumenta no local de infecção</p>	<p>Não definido</p> <p>Fluxo sanguíneo para os tecidos</p> <p>A estrutura química afeta a penetração, a proteína plasmática de ligação e a degradação por proteólise – concentração eficaz</p> <p>A concentração no local de infecção está relacionada com a concentração sistêmica e circulação sanguínea</p>
<p>Estabilidade</p>	<p>Não existem dados suficientes</p>	<p>Relativamente não estáveis</p>
<p>Formulações</p>	<p>Filtrados líquidos de fagos, comprimidos, fórmulas para aplicação local</p>	<p>Injeções, aerosóis, fórmulas para aplicação local</p>
<p>Vias de Administração</p>	<p>Via parentérica (infecções sistêmicas)</p> <p>Via oral (infecções gastro-intestinais)</p> <p>Local (infecções tópicas)</p>	<p>Via parentérica (infecções sistêmicas)</p> <p>Via oral limitada pela proteólise</p> <p>Local (infecções tópicas)</p>
<p>Desenvolvimento de Resistência</p>	<p>Vertical – mutação e seleção</p> <p>Aquisição de fago temperado</p> <p>Baixos níveis de resistência induzida</p>	<p>Vertical – mutação e seleção</p> <p>Baixos níveis de resistência induzida</p>
<p>Terapia com Múltiplos Fármacos</p>	<p>Cocktail de fagos (3-5) ou combinação fago-</p>	<p>Terapia combinada proteína-proteína; fago-</p>

	antibiótico Prevenção do aparecimento de resistência Espectro de atividade ampliado Possível efeito sinérgico	proteína; antibiótico- proteína; fago-proteína Prevenção do aparecimento de resistência Espectro de atividade ampliado Possível efeito sinérgico
Desenvolvimento de Novas Preparações	Isolamento fácil e rápido de novos fagos	Desenvolvimento in silico pela exploração de bases de dados de proteínas Análise de genomas de fagos
Erradicação do Biofilme	Penetração na estrutura do biofilme relativamente eficaz por degradação de exopolissacáridos (enzimas)	Penetração na estrutura do biofilme por degradação de exopolissacáridos (enzimas)
Fabricação	Limitações na densificação e purificação. Existe necessidade de adoção de métodos em larga escala	Relativamente simples Péptidos recombinantes ou análogos sintéticos Adoção de métodos em larga escala

Tabela 2 - Principais características dos fagos líticos e das proteínas de fagos não líticos como agentes antimicrobianos (Adaptado de Drulis-Kawa et al., 2012)

2.4. Mecanismo de Ação

As publicações existentes descrevem que os fagos entram na corrente sanguínea dos animais de laboratório (após dose única via oral) dentro de 2 a 4 horas, e são encontrados nos órgãos internos (fígado, baço, rins, etc) em aproximadamente 10 horas. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Os fagos podem permanecer no organismo humano por períodos de tempo de até 7 dias. Porém, para os fagos líticos poderem ser utilizados, são necessárias mais pesquisas para obter dados farmacológicos rigorosos sobre fagos líticos, incluindo estudos toxicológicos. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Quanto à sua atividade bactericida, pensa-se que os fagos terapêuticos matam a bactéria alvo, replicando-se dentro desta e provocando lise da célula hospedeira (ciclo lítico). No entanto, estudos subsequentes revelaram que nem todos os fagos replicam de forma similar, e que existem diferenças nos ciclos de replicação dos fagos líticos e lisogênicos. A definição recente da sequência completa do fago T4, e muitos anos de pesquisa sobre o mecanismo de replicação do fago T4 revelaram que a lise da bactéria hospedeira pelo fago lítico é um processo complexo, que consiste numa cascata de eventos que envolvem vários genes reguladores e estruturais. Como o fago T4 é um fago lítico típico, é possível que vários fagos terapêuticos actuem com uma cascata semelhante, contudo, é possível que alguns fagos terapêuticos possuam genes únicos não identificados ou mecanismos responsáveis pela sua habilidade de provocar lise na sua bactéria alvo. Por exemplo, um grupo de autores do Eliava Institute of Bacteriophage Microbiology and Virology identificou e clonou um gene responsável do fago anti-*Salmonella*, ou parte dele, pela atividade letal deste fago sobre as estirpes hospedeiras *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Em outro estudo foi descrito um mecanismo que protege o DNA do fago das defesas restrição-modificação na estirpe hospedeiras *S. aureus*. Estes estudos podem elucidar e podem ser úteis para a engenharia genética otimizar as preparações de fagos terapêuticos. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

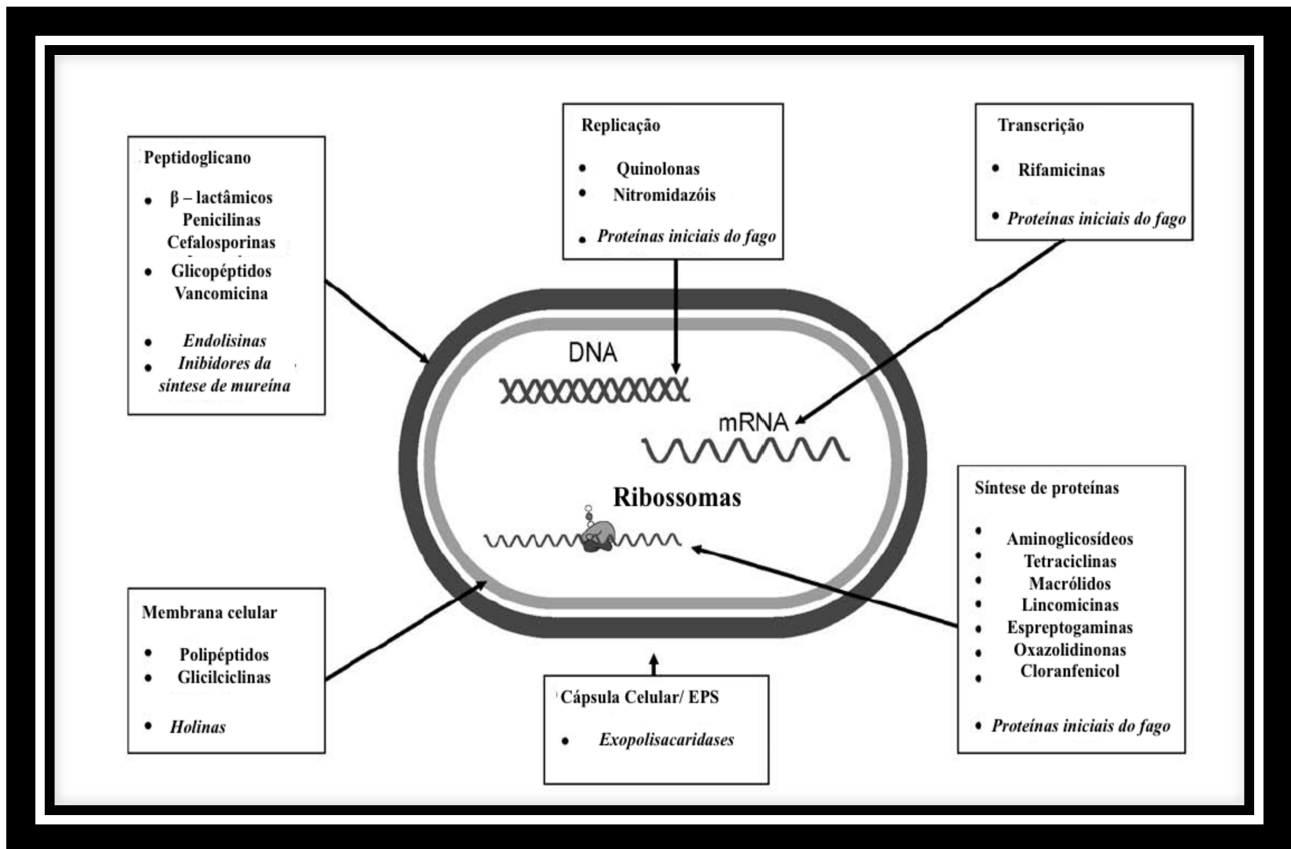


Figura 4 - Modo de ação dos principais agentes antimicrobianos e proteínas fágicas (Adaptado de Drulis-Kawa et al., 2012)

2.5. Segurança

Do ponto de vista clínico, os fagos parecem ser inócuos. Existe uma longa história de uso de fagos como agentes terapêuticos na Europa Oriental e na antiga União Soviética (e mesmo antes da era Antibiótico, nos Estados Unidos), via oral (comprimido ou formulações líquidas - 10^5 a 10^{11} PFU/dose), via retal, local (pele, olhos, ouvido, mucosa nasal, etc), tampões, soluções para lavagem, cremes, aerosóis ou injeções intrapleurais e via intravenosa. Durante este período não houve relatos de complicações graves associadas ao uso dos fagos terapêuticos. (Alexander Sulakvelidze, Zempira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

Devido à sua aparente segurança, nos Estados Unidos, o fago phi X174 tem sido utilizado para monitorizar a função da imunidade humoral em pacientes com deficiência de adenosina deaminase e para determinar a importância de moléculas associadas à superfície na modulação da resposta imune humana. Além disso, os fagos são extremamente comuns no meio ambiente e são regularmente ingeridos com a comida. Apesar disto, o melhor é assegurar a segurança destes agentes, antes de utilizá-los como terapia. É importante assegurar que eles não realizam transdução generalizada e possuam sequências de genes homólogas com genes de resistência a antibióticos, genes para toxinas codificados por fagos e genes para fatores de virulência de bactérias. (Ochs et al., 1992)

2.6. Principais Aplicações dos Bacteriófagos em Patologia Médica

Na Europa de Leste, a partir de 1930, os bacteriófagos foram utilizados com sucesso tanto para fins curativos como profiláticos. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

Este sucesso aconteceu devido à seleção cuidadosa dos fagos e monitorização da sua eficácia, que foi efetuada em pacientes, individualmente. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

Primeiramente, a bactéria foi isolada, juntamente com um ou mais fagos eficazes. O fago é produzido, purificado e administrado ao paciente. O efeito do tratamento é monitorizado. Se não ocorreu a morte das bactérias, é feita uma segunda seleção, produção e administração dos fagos. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

INFEÇÃO	AGENTE CAUSAL	RESULTADOS
Infeção supurativa da pele	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiela</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	31 pacientes 23 casos com melhoria
Variadas	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiela</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	A imunogenicidade do fago não dificultou a terapia
Gastrointestinal Cabeça PESCOÇO Pele	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiela</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i>	550 pacientes 506 casos tratados com sucesso
Infeção supurativa	<i>Staphylococcus</i> Gram-negativo	Administração oral 56 casos tratados com sucesso 47 casos – fagos no sangue 9 casos – fagos na urina
Brucelose	<i>Brucella abortus</i>	
Conjuntivite	<i>Enterococcus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.</i>	1340 pacientes

Dermatite Faringite Rinite	<i>aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	360 tratados com fagos (86% de melhoria clínica) 404 tratados com antibióticos (48% com melhoria clínica) 576 tratados com uma combinação dos dois (83% de melhoria clínica)
Asma infecciosa infantil		
Abcesso subfrênico recorrente	<i>E.coli</i>	Paciente recebeu alta após 33 dias sem abcesso
Meningite cerebrospinal	<i>K. pneumoniae</i>	Após terapia antibiótica sem sucesso, recém-nascidos foram tratados com fagos via oral, com sucesso
Furunculose recorrente	<i>Staphylococcus</i>	
Diarréia em bezerros	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> foi eliminado do trato digestivo dos bezerros, leitões e cordeiros
Septicemia, Meningite em galinhas e bezerros	<i>E.coli</i>	Foram tratados com fagos que se multiplicaram no sangue

Tabela 3 –Estudos sobre terapia fágica em humanos e animais (Adaptado de Inal, 2003)

2.6.1. Ação em Infecções

Do ponto de vista terapêutico, apenas os fagos líticos são necessários para a lise de bactérias patogénicas. Estes persistem, libertando produtos que conseguem migrar para vários locais do corpo. Apesar do aumento do interesse na terapia fágica, ainda existem bactérias patogénicas para as quais ainda não foram encontrados fagos. Estas bactérias não ameaçam a saúde pública, porém, baixas dosagens podem causar doenças fatais.(Oliveira, Sillankorva, Merabishvili, Kluskens, & Azeredo, 2015)

2.6.1.1. Feridas e infeções da pele

Feridas e infeções da pele provocam a rutura deste órgão, que representa uma barreira natural. Esta rutura faz com que haja susceptibilidade a infeções. No caso de feridas crónicas, podem ser utilizadas soluções tópicas (pomadas, cremes ou loções) de fagos líticos. Para tratar feridas crónicas purulentas é feita a irrigação por injeção, ligaduras embebidas ou polímeros biodegradáveis em forma de libertação contínua. O maior desafio no tratamento de infeções da pele é o desenvolvimento de meios de distribuição dos bacteriófagos para células de mamíferos. Apesar disto, existem agentes patogénicos intracelulares que possuem uma forma temporária extracelular. Deste modo, estes estão acessíveis aos fagos, e nestes casos, a terapia fágica mostra-se eficaz. (Oliveira et al., 2015)

2.6.1.2. Infeções do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital

A colonização das membranas mucosas é uma potencial porta de entrada para infeções severas. Apesar de haver uma grande gama de fagos eficazes, existem agentes patogénicos envolvidos em infeções do trato respiratório superior e inferior que ainda não estão cobertos pela terapia fágica, tais como as bactérias responsáveis pela difteria, bronquite e pneumonia. Em infeções sensíveis, os fagos podem ser administrados por meio de inalação de aerossóis.(Oliveira et al., 2015)

O tratamento de infeções gastrointestinais com fagos apresenta vantagens em relação aos antibióticos, na medida em que os fagos não eliminam a flora intestinal.

Apesar desta vantagem, os fagos são sensíveis ao pH baixo do trato gastrointestinal, devendo ser administrados na forma de comprimidos revestidos. (Oliveira et al., 2015)

Para o tratamento de infecções nosocomiais do trato urogenital ainda não foram descobertos fagos eficazes. O tratamento de infecções urogenitais com fagos é semelhante aos métodos convencionais que envolvem aplicação de antibiótico. Neste caso, é utilizada uma combinação de catéteres revestidos com hidrogénio e fagos. No caso da vaginite, os fagos podem ser aplicados em tampões ou produtos de higiene íntima. Para além destas aplicações, os fagos podem também eliminar bactérias responsáveis por infecções transmitidas sexualmente, tais como cancroide, clamídia, gonorréia, sífilis e granuloma inguinal. (Oliveira et al., 2015)

2.6.1.3. Bacterémia e Septicémia

A presença de bactérias na corrente sanguínea (bactericémia), pode levar a septicémia. Infecções locais como a pneumonia, infecções da bexiga, trato urinário ou pele também podem se tornar sistémicas. Existem vários agentes patogénicos capazes de causar infecções sistémicas, e estes podem ser eliminados com administração de fagos. Os métodos de administração mais utilizados são via intravenosa e parentérica, fornecendo fagos suficientes para eliminar as bactérias da corrente sanguínea. A aplicação transdérmica também pode ser utilizada, e pode resolver problemas associados com a administração sistémica de fagos. (Oliveira et al., 2015)

2.6.2. Infecções Oraís

Segundo Bachrach *et al.* (2003), a presença de bacteriófagos na saliva humana e a capacidade de isolá-los passado um ano sugere que os fagos podem ter um papel ativo importante na cavidade oral. (Bachrach, Leizerovici-Zigmond, Zlotkin, Naor, & Steinberg, 2003)

Em medicina dentária o *Enterococcus faecalis* é um dos principais microorganismos associados a periodontite apical crônica após tratamento endodôntico fracassado. (Khalifa et al., 2016)

O *Enterococcus faecalis* provoca fracasso no tratamento endodôntico devido a microinfiltração de restaurações, exposição pulpar direta em casos de rutura de barreira física, e do sulco gengival, que atinge a câmara pulpar através do ligamento periodontal. Após a penetração nos túbulos dentinários, o canal radicular comporta-se como um reservatório de bactérias, que as protege do sistema imunitário. Estas bactérias causam infecções intracanales constantes, doenças endodônticas e periapicais refratárias ou persistentes. Elas podem também aderir ao colagénio dentinário (componente orgânico major da dentina), invadir os túbulos dentinários, e assim, suportar o desbridamento do canal dentário. (Khalifa et al., 2016)

Para além disto, foi encontrada relação entre contaminação por *Enterococcus faecalis* e periodontite, onde a prevalência foi encontrada em canais radiculares com periodontite apical, necessitando de retratamento endodôntico, ou na saliva. (Khalifa et al., 2016)

O tratamento endodôntico tem como objetivo erradicar bactérias do canal radicular e túbulos dentinários por remoção mecânica de tecidos infetados e tratamento químico com soluções antisépticas tais como hipoclorito de sódio e clorhexidina (preparação químico-mecânica). Apesar destes procedimentos, a contaminação bacteriana, maioritadamente por *Enterococcus faecalis*, é evidente nos túbulos dentinários. Uma das desvantagens do desbridamento do canal radicular é a incapacidade de prevenção de reinfeção que pode surgir dos túbulos dentinários previamente infetados. (Khalifa et al., 2016)

Apesar do facto das infeções endodônticas serem de natureza polimicrobiana, o ambiente do canal radicular favorece a sobrevivência de *Enterococcus faecalis*. (Khalifa et al., 2016)

A infeção oral por *Enterococcus* é comum, e é restrita ao canal dentário. Apesar do facto destes microorganismos representarem uma pequena parte da flora inicial, os *Enterococos faecalis* são isolados como cultura pura ou componente major da flora do canal dentário com tratamento endodôntico fracassado. Isto deve-se ao facto desta espécie sobreviver sob stress ambiental, à sua resistência a medicação e aos irrigantes utilizados no tratamento endodôntico e também à sua capacidade de invadir os túbulos dentinários do canal e permanecer viável. (Love, 2001)

Este microorganismo consegue persistir e sobreviver em condições extremas, tais como os ambientes do tracto gastrointestinal e canais radiculares, meios alcalinos e inanição de glicose. (Khalifa et al., 2016)

Os fagos de *Enterococcus faecalis* são muito prevalentes na saliva humana, o que sugere que os fagos podem controlar a população oral de *Enterococcus faecalis*, restringindo os seus surtos ao canal dentário, que é uma localização relativamente protegida e isolada. (Bachrach et al., 2003)

Nos canais radiculares, o *Enterococcus Faecalis* fica protegido do sistema imunitário e dos antibióticos. Durante o tratamento endodôntico são utilizados vários antisépticos e antibióticos a fim de erradicar as bactérias intracanalares, entre eles o hidróxido de cálcio e pastas antibióticas. Assim é feito o controle das bactérias antes do selamento do canal. (Khalifa et al., 2016)

Apesar de todos estes cuidados, ainda são visíveis células viáveis de *Enterococcus Faecalis* após tratamento endodôntico, independentemente do uso destes antisépticos e antibióticos. (Khalifa et al., 2016)

O *Enterococcus Faecalis* é difícil de tratar no tracto gastrointestinal e em outros locais devido ao facto de possuir muitas estirpes resistentes a antibióticos. Além disto, o

uso aumentado de antibióticos em meio hospitalar provoca disbiose, ou seja, altera as microbiotas do trato gastrointestinal, o que leva a alterações no sistema imunitário local. Este microorganismo aloja-se no trato gastrointestinal, o que faz com que este seja a fonte primária dos organismos responsáveis por infecções por enterococcus. (Khalifa et al., 2016)

Cada vez mais existe resistência por parte das bactérias (Fines, Perichon, Reynolds, Sahm, & Courvalin, 1999). A cavidade oral possui um fácil acesso, o que permite que a terapia fágica possa ser utilizada como meio de prevenção de fracassos no tratamento endodôntico. (Bachrach et al., 2003; Nakai et al., 1999)

2.6.2.1. Ação dos Bacteriófagos em Biofilmes

Biofilmes são compostos por agregados de células, eucarióticas ou procarióticas, rodeados por uma matriz extracelular de substância polimérica. Esta matriz é produzida pelas células do biofilmes, e é constituída por açúcares de cadeia longa, DNA e outras macromoléculas de natureza variável. As bactérias do biofilme podem apresentar resistência a agentes como biocidas e antibióticos. (Harper et al., 2014)

Estas camadas de bactérias atuam juntas de forma cooperativa, e estão fisiologicamente e mecanicamente protegidas dos antibióticos. Estas bactérias estão mais protegidas do que as células planctônicas. Isto deve-se ao facto da maioria dos agentes antimicrobianos serem incapazes de penetrar nos biofilmes. Estes agentes apenas conseguem erradicar bactérias das camadas de periferia, e assim que o seu efeito acaba, as demais bactérias das camadas protegidas conseguem formar novas camadas de biofilme. (Khalifa et al., 2016)

A matriz do biofilme constitui uma barreira a todos os agentes. Alguns agentes são parcialmente bloqueados, por exemplo por isolamento de tobramicina. Outros agentes conseguem penetrar a matriz do biofilme, como é o caso da ofloxacina e ácido paracético. Diferentes condições (gasosas e estratificações de nutrientes) levam a diferentes estados celulares, e à existência de zonas diferentes dentro do biofilme. (Harper et al., 2014)

Pensa-se que a aparente resistência ou re-crescimento de bactérias no biofilme provém da presença de células persistentes metabolicamente inativas. A atividade metabólica limitada e o crescimento lento destas bactérias pode prevenir a ação de muitos antibióticos. Estas células podem voltar a ser ativas após o stress, o que leva a que o biofilme volte a crescer após o tratamento. (Harper et al., 2014)

O biofilme está associado à grande maioria das infeções bacterianas. Os biofilmes estão ligados a muitos relatos de resistência a antibióticos em uso clínico. Esta resistência pode-se verificar *in vivo* mesmo quando as células estão susceptíveis aos antibióticos, fora do biofilme. Assim, estas aparentem ser sensíveis quando não é formado o biofilme. (Harper et al., 2014)

A destruição de biofilmes por bacteriófagos é muito mais eficiente comparada com a destruição por antibióticos. Os fagos conseguem infetar bactérias presentes na camada superior do biofilme e replicar, deste modo, existe formação de novos bacteriófagos, que penetram nas camadas do interior do biofilme, infetando as restantes bactérias. A replicação dos fagos leva à erradicação das bactérias do biofilme. Foram feitas experiências com fagos, simples, cocktails de fagos e combinação de fagos com antibióticos contra os biofilmes. Estes testes eliminaram com sucesso os biofilmes bacterianos do local de infeção ou reduziram notavelmente a contagem bacteriana. (Khalifa et al., 2016)

Para além disto, a dispersão do biofilme pode ser feita através da modificação do bacteriófago, para que este expresse uma enzima de degradação de biofilme durante a infeção. (Khalifa et al., 2016)

2.7. Falhas na Eficácia da Terapia Fágica

Um dos principais obstáculos na documentação da validade da terapia fágica foi a escassez de estudos controlados com grupos placebo. (Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

PROBLEMA	DESCRIÇÃO	SOLUÇÃO/ABORDAGEM NECESSÁRIA
Espectro reduzido de hospedeiros dos fagos.	Devido à alta especificidade dos fagos, foram obtidos resultados negativos por causa do fracasso na selecção de fagos líticos para as espécies de bactérias alvo.	Determinação da susceptibilidade do agente etiológico antes de utilizá-los de modo terapêutico, ou usar cocktails polivalentes de fagos que provoquem a lise da maioria das estirpes do agente etiológico.
Pureza insuficiente nas preparações fágicas	Os primeiros fagos terapêuticos provocavam a lise em bruto das bactérias hospedeiras, e possuíam contaminantes (incluindo endotoxinas) que podem ter contrabalançado o efeito dos fagos.	Cromatografia com troca de iões, centrifugação de alta velocidade e outras técnicas modernas de purificação podem ser utilizadas para obter preparações de alta pureza.
Pouca estabilidade/viabilidade das preparações fágicas	Algumas preparações comerciais foram suplementadas com mercúrio ou agentes oxidantes, ou tratadas com calor para garantir esterilidade. Muitos destes tratamentos podem	Técnicas de purificação avançadas podem ser utilizadas para purificar as preparações e garantir um meio sem bactérias. A viabilidade e título dos fagos deve ser determinada antes da sua utilização para fins

	inactivar os fagos, resultando em preparações fágicas ineficientes.	terapêuticos.
Divulgação exagerada da eficácia de preparações fágicas comerciais	Exemplo: Enterophagos foi comercializado como sendo eficaz contra a infecção do vírus do herpes, urticária e eczema. Os fagos são incapazes de combater as infecções citadas acima.	As preparações fágicas devem ser acompanhadas por informação suportada sobre a sua eficácia contra bactérias patogénicas específicas, efeitos colaterais, entre outros.
Fracasso no estabelecimento de provas científicas da eficácia da terapia fágica	A maior parte dos estudos clínicos sobre terapia fágica foram conduzidos sem grupo controlo placebo. Quando este grupo foi utilizado, os dados foram analisados subjectivamente.	Estudos duplamente cego placebo com fagos líticos altamente purificados. Análise de resultados baseada em observações clínicas e análise laboratorial.

Tabela 4 –Alguns dos problemas com os estudos sobre terapia fágica e como podem ser solucionados (Adaptado de Alexander Sulakvelidze, Zempira Alavidze, J. Glenn Morris, 2001)

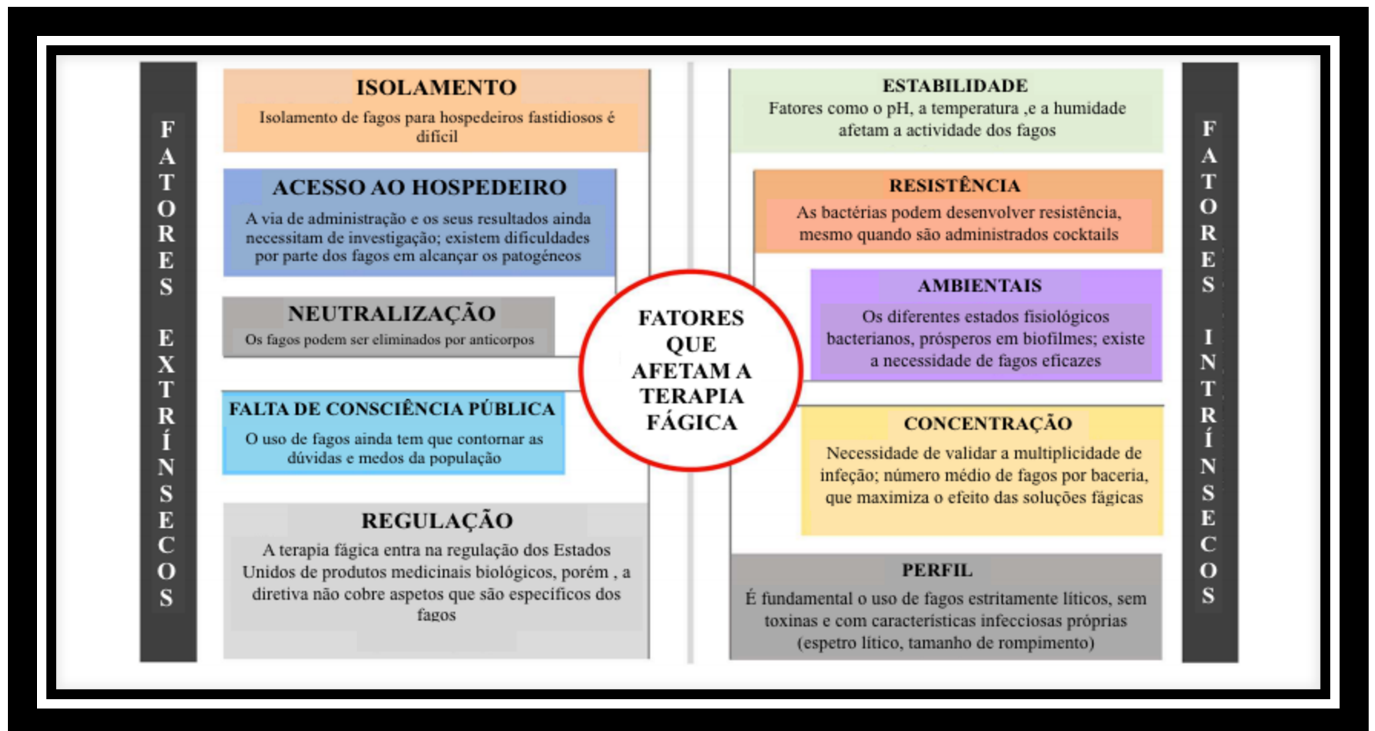


Figura 5 - Representação esquemática dos fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam a terapia fágica (Adaptado de Oliveira et al., 2015)

2.7.1. Especificidade dos bacteriófagos

A maior parte dos antibióticos utilizados são de largo espectro e provocam a morte de várias bactérias diferentes. Assim, bactérias que são benéficas também são mortas, especialmente aquelas que residem no trato intestinal. Isto constitui uma desvantagem da aplicação de antibióticos em relação aos bacteriófagos, uma vez que estes possuem uma elevada especificidade para o seu hospedeiro. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

Para aplicações terapêuticas, a alta especificidade pode ser uma desvantagem, uma vez que é necessária uma combinação e/ou ajuste entre o hospedeiro e o fago. Mutações ou alterações na bactéria alvo podem levar a perda de reconhecimento e interação específica entre o fago e o seu hospedeiro. Neste caso, é necessário fazer uma seleção de fagos ou usar cocktails para assegurar a eficiência do tratamento. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

A perda de especificidade relatada em vários estudos foi rara. Após a infecção, a lise geralmente dá-se de forma muito rápida, por vezes dentro do intervalo de tempo de trinta minutos. A amplificação exponencial do fago resulta num rápido declínio da população de bactérias alvo. Existe pouco espaço para adaptação por parte da bactéria. A terapia fágica geralmente tem duração limitada. Em alguns casos, algumas bactérias sobreviveram ao tratamento inicial com bacteriófagos. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

No caso do aparecimento de bactérias resistentes, pode ser isolado um novo fago da coleção pré-existente, utilizando as bactérias sobreviventes. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

2.7.2. Imunogenicidade dos bacteriófagos

Os bacteriófagos podem provocar reação imunológica em mamíferos e são degradados no fígado e no baço. Estas reações ocorrem numa fase tardia, o que faz com que não existam efeitos negativos sérios ao nível do tratamento. Em 1987, Kucharewicz-Krukowska e Slopek analisaram a imunogenicidade do fago anti-*Staphylococcus*, comparando titulações de anticorpos hemaglutinantes e neutralizantes antes e depois ds terapia fágica. A maior parte dos doentes não apresentou anticorpos antifago durante o tratamento. Em apenas dois casos foram encontradas altas titulações de anticorpos antifago. Estes autores concluíram que a imunogenicidade deste tipo de fagos não impede a terapia. (Kucharewicz-Krukowska & Slopek, 1987)

Segundo Weber-Dabrowska *et al.* (2003), a produção de anticorpos específicos para fagos faz parte da resposta do corpo contra a infeção bacteriana e da multiplicação de fagos que a acompanha. (Weber-Dąbrowska, Mulczyk, & Górski, 2003)

Os efeitos imunogénicos dos fagos são fracos na maior parte dos casos, e ocorrem após o término da terapia fágica. (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2003)

2.7.3. Lise da célula bacteriana

As infecções bacterianas geralmente levam a reações inflamatórias que podem provocar complicações sérias em pacientes sépticos. As endotoxinas são um fator importante obtenção da resposta inflamatória contra a infecção. As endotoxinas podem ser libertadas através dos fragmentos da parede celular das bactérias Gram-negativas ou através da lise bacteriana provocada por antibióticos ou bacteriófagos. Alguns estudos relataram que os fagos líticos aumentaram a sobrevivência em doentes com septicemia. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

2.8. Perspectivas de Futuro na Terapia Fágica

O interesse na terapia fágica e nos bacteriófagos levou a um desenvolvimento da investigação aplicada de modo a aumentar a sua eficácia. Com as técnicas de biologia molecular atuais e conhecimento do genoma dos fagos, estes podem ser projetados para uma melhor eficácia, maior gama de hospedeiros, entre outros. (Vlugt & Verbeek, n.d.)

Merril *et al.*, (1996) descreveu a seleção de fagos mutantes capazes de sobreviver durante muito mais tempo no sangue de rato. Anteriormente, pensava-se que a rápida eliminação dos fagos do sistema circulatório limitava a eficácia da terapia fágica, por anticorpos dirigidos aos fagos ou pelo sistema retículo-endotélio. (Merril et al., 1996)

3. Conclusão

Os bacteriófagos estão cada vez mais a ser estudados, porém, são necessários mais estudos para testar a sua eficácia. Estes microorganismos podem ser muito úteis no combate a infecções, e possuem vantagens em relação aos antibióticos.

Os bacteriófagos possuem múltiplas aplicações na área de patologia médica, atuando em diversos tipos de infecção. Isto pode ser bastante benéfico para a medicina, uma vez que as bactérias cada vez resistem aos antibióticos, e são necessários novos meios de combate.

Na medicina dentária, os fagos podem ser bastante úteis na prevenção de periodontite apical crónica após tratamento endodôntico fracassado e em toda a área da periodontologia, sobretudo em zonas de difícil acesso e/ou com componente de bactérias resistentes a antibióticos.

Apesar de todos estes benefícios e vantagens, os bacteriófagos ainda necessitam de ser mais estudados e são necessários mais testes e ensaios para avaliar a sua eficácia e segurança no tratamento de infecções.

4. Bibliografia

- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*. <http://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Alexander Sulakvelidze, Zemphira Alavidze, J. Glenn Morris, J. (2001). Minireview: Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-650-657. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Bachrach, G., Leizerovici-Zigmond, M., Zlotkin, A., Naor, R., & Steinberg, D. (2003). Bacteriophage isolation from human saliva. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1), 50–53. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01262.x>
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A., & Lavigne, R. (2012). Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 699–722. <http://doi.org/10.2174/138920312804871193>
- Fines, M., Perichon, B., Reynolds, P., Sahn, D. F., & Courvalin, P. (1999). VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2161–2164. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000139107>
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>
- Harper, D., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... Morales, S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284. <http://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Inal, J. M. (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51, 237–244. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00105>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol*, 56(September 2010), 191–200. <http://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Khalifa, L., Shlezinger, M., Beyth, S., Hourri-Haddad, Y., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, N., & Hazan, R. (2016). Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *Journal of Oral Microbiology*.

- <http://doi.org/10.3402/jom.v8.32157>
- Kucharewicz-Krukowska, A., & Slopek, S. (1987). Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 35(5), 553–561. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023465782&partnerID=tZOtx3y1>
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. New York. <http://doi.org/10.1201/9780203491751>
- Love, R. M. (2001). Enterococcus faecalis - A mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*, 34(5), 399–405. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00437.x>
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., ... Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211–219. <http://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Merril, C. R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N. C., Creed, G. J., Zullo, S., & Adhya, S. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3188–3192. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3188>
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T., & Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(1), 33–41. <http://doi.org/10.3354/dao037033>
- Ochs, H. D., Buckley, R. H., Kobayashi, R. H., Kobayashi, a L., Sorensen, R. U., Douglas, S. D., ... Hershfield, M. S. (1992). Antibody responses to bacteriophage phi X174 in patients with adenosine deaminase deficiency. *Blood*, 80(5), 1163–1171.
- Oliveira, H., Sillankorva, S., Merabishvili, M., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2015). Unexploited opportunities for phage therapy. *Frontiers in Pharmacology*. <http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00180>
- Vlugt, R. a a Van Der, & Verbeek, I. M. (n.d.). Bacteriophages : therapeutics and alternative applications. *Fruits*.
- Weber-Dąbrowska, B., Mulczyk, M., & Górski, A. (2003). Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplantation*

Proceedings, 35(4), 1385–1386. [http://doi.org/10.1016/S0041-1345\(03\)00525-6](http://doi.org/10.1016/S0041-1345(03)00525-6)