

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **A TERAPIA FÁGICA COMO ALTERNATIVA OU COMPLEMENTO À TERAPIA ANTIBIÓTICA NO COMBATE DAS BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS**

Trabalho submetido por  
**Alexandra Marques Ramos**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2024**



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **A TERAPIA FÁGICA COMO ALTERNATIVA OU COMPLEMENTO À TERAPIA ANTIBIÓTICA NO COMBATE DAS BACTÉRIAS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS**

Trabalho submetido por  
**Alexandra Marques Ramos**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Lucinda Janete da Silva Bessa**

**Novembro de 2024**



## **Agradecimentos**

A realização desta monografia representa não apenas o culminar de um percurso académico, como também o reflexo do apoio e da dedicação de várias pessoas que contribuíram para esta jornada. A todos, expresso a minha profunda gratidão pelo papel fundamental que tiveram na concretização desta etapa.

À **Professora Doutora Lucinda Janete da Silva Bessa**, minha orientadora, expresso o meu profundo agradecimento. A sua orientação, conhecimento e, acima de tudo, a paciência foram fundamentais para a realização desta tese. Agradeço pela sua disponibilidade, pelos conselhos valiosos e pelo rigor científico com que me guiou, dando-me o suporte necessário em cada etapa deste percurso.

Expresso a minha sincera gratidão à **Egas Moniz School of Health and Science** pelo ambiente académico de excelência que encontrei ao longo do meu percurso. Agradeço, igualmente, a todos os professores que me acompanharam durante o curso, cujos ensinamentos e dedicação foram fundamentais para o meu desenvolvimento académico e pessoal.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos **Daniela Grosa, Rodrigo Gonçalves e Diogo Ramos**. A vossa amizade, apoio incondicional e todas as memórias que construímos ao longo dos anos foram fundamentais para mim. Agradeço-vos por estarem sempre ao meu lado, nos bons momentos e nos desafios, tornando esta jornada ainda mais especial. Que esta amizade continue a acompanhar-nos por muitos mais momentos.

Aos amigos incríveis que tive a sorte de conhecer na Egas Moniz, **Afonso Palos, Catarina Nunes, Juliana Rodrigues, Marta Lourenço e Nuno Oliveira**, deixo o meu profundo agradecimento. A vossa amizade e o apoio incondicional tornaram este percurso único, preenchendo cada etapa com momentos especiais. Cada instante que partilhámos ficará para sempre guardado, e desejo, sinceramente, levar-vos comigo para o resto da vida, com todas as memórias e gargalhadas que vivemos juntos ao longo desta jornada.

À minha família, o meu mais profundo agradecimento. Aos meus avós, cuja presença na minha vida me inspirou e deu forças para alcançar os meus objetivos, deixando valores e ensinamentos que guardo com carinho. Aos meus tios, pelo apoio constante e por cada palavra de incentivo ao longo deste percurso, que sempre me deram segurança e conforto.

Aos meus primos, pela amizade e pelos momentos de alegria que trouxeram um equilíbrio essencial a esta jornada. Cada um de vocês contribuiu, de forma especial, para que este objetivo se tornasse uma realidade. Ter-vos ao meu lado foi, e sempre será, uma motivação imensurável.

Por fim, aos meus pais, **Carlos Ramos** e **Elsa Marques**, o meu agradecimento mais especial. Vocês são o meu maior exemplo e o meu apoio incondicional, e não tenho palavras suficientes para expressar o quanto gosto de vocês. A vossa força, dedicação e amor deram-me a coragem para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. Acreditaram em mim e apoiaram-me em cada passo, dando-me tudo o que precisei para alcançar esta etapa. A vossa presença tornou esta jornada possível, e é com imenso orgulho e gratidão que dedico esta conquista a vocês, que são e sempre serão a minha maior motivação.

*Com todo o meu carinho e gratidão,*

*Alexandra Ramos*

## Resumo

**Introdução:** Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos representa um dos maiores desafios globais em saúde pública. O uso inadequado e excessivo destes fármacos, associado à escassez de novas alternativas terapêuticas, tem agravado a situação. Perante este cenário, torna-se imperativa a criação de novas estratégias antibacterianas para combater infecções causadas por bactérias multirresistentes. Uma das abordagens mais promissoras é a terapia fágica, que utiliza bacteriófagos (vírus que infetam bactérias, replicam-se no seu interior e levam à sua destruição) para tratar infecções bacterianas. Embora descoberta há quase um século, a terapia fágica foi negligenciada na maioria dos países devido ao sucesso dos antibióticos. Contudo, com o aumento preocupante da resistência bacteriana, o interesse científico nos fagos tem ressurgido. Adicionalmente, inovações tecnológicas, como a engenharia genética para otimizar a eficácia dos fagos, têm impulsionado esta área de investigação.

**Objetivos:** Explorar as potencialidades da terapia fágica como alternativa ou complemento à terapia antibiótica no combate a bactérias resistentes; aprofundar as suas aplicações clínicas, bem como os desafios na produção, implementação e regulamentação.

**Métodos:** Esta revisão narrativa foi feita com recurso a uma pesquisa bibliográfica em várias bases de dados, nomeadamente no PUBMED, Scopus, Web Of Science, entre outras. Foram considerados maioritariamente artigos publicados entre 2010 e 2024.

**Conclusão:** A terapia fágica surge como alternativa promissora aos antibióticos, particularmente contra infecções por bactérias multirresistentes. Apesar dos avanços da engenharia genética que ampliam o seu potencial, persistem desafios na produção, regulamentação e aplicação clínica dos fagos. Esta abordagem inovadora exige investimento contínuo e rigor científico para assegurar uma implementação segura e eficaz no combate à resistência antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos, Infecções Bacterianas, Resistência Antibiótica, Terapia Fágica.



## **Abstract**

**Introduction:** Bacterial resistance to antibiotics is currently one of the biggest global public health challenges. The inappropriate and excessive use of these drugs, coupled with the scarcity of new therapeutic alternatives, has exacerbated the situation. Against this backdrop, it is imperative to create new antibacterial strategies to combat infections caused by multidrug-resistant bacteria. One of the most promising approaches is phage therapy, which uses bacteriophages (viruses that infect bacteria, replicate inside them and lead to their destruction) to treat bacterial infections. Although discovered almost a century ago, phage therapy has been neglected in most countries due to the success of antibiotics. However, with the worrying increase in bacterial resistance, scientific interest in phages has resurfaced. In addition, technological innovations, such as genetic engineering to optimize phage efficacy, have boosted this area of research.

**Objectives:** Explore the potential of phage therapy as an alternative or complement to antibiotic therapy in the fight against resistant bacteria; delve into its clinical applications, as well as the challenges in production, implementation and regulation.

**Methods:** This narrative review was carried out using a bibliographic search in various databases, including PUBMED, Scopus and Web of Science, among others. Most articles published between 2010 and 2024 were considered.

**Conclusion:** Phage therapy has emerged as a promising alternative to antibiotics, particularly against infections caused by multidrug-resistant bacteria. Despite advances in genetic engineering that expand its potential, challenges remain in the production, regulation and clinical application of phages. This innovative approach requires continuous investment and scientific rigor to ensure safe and effective implementation in the fight against antimicrobial resistance.

**Keywords:** Bacteriophages, Bacterial Infections, Antibiotic Resistance, Phage Therapy.



# Índice

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>II. DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Terapia Antibiótica .....</b>	<b>13</b>
1.1. Enquadramento Histórico .....	13
1.2. Resistência Bacteriana aos Antibióticos .....	13
1.2.1. Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana .....	14
1.2.2. Impacto na Saúde Pública.....	16
1.3. Limitações atuais da Terapia Antibiótica .....	19
1.4. Surgimento de Novas Terapêuticas Alternativas .....	19
<b>2. Terapia fágica: Uma Alternativa Promissora .....</b>	<b>20</b>
2.1. Bacteriófagos: Caracterização Geral e Abundância .....	20
2.2. Enquadramento Histórico da Terapia Fágica.....	21
2.3. Estrutura e Classificação dos Bacteriófagos .....	23
2.4. Ciclos de Vida dos Bacteriófagos .....	25
<b>3. Produção de Fagos para Uso Clínico.....</b>	<b>28</b>
3.1. Desenvolvimento de Bancos de Células e Fagos .....	29
3.2. Processo <i>Upstream</i> na Produção de Fagos .....	29
3.3. Processo <i>Downstream</i> na Produção de Fagos.....	31
3.4. Preparação final na Produção de Fagos.....	31
<b>4. Vantagens da Terapia Fágica .....</b>	<b>32</b>
4.1. Elevada Especificidade dos Fagos em Relação ao Hospedeiro Bacteriano .....	33
4.2. Eficácia Contra Bactérias Multirresistentes.....	33
4.3. Capacidade de Replicação no Local da Infecção – <i>auto-dosing</i> .....	34
4.4. Eficácia Contra Biofilmes Bacterianos .....	35
4.5. Capacidade de Coevolução com as Bactérias .....	36

4.6. Relação Custo-Efetividade Promissora .....	36
<b>5. Desafios e Limitações da Terapia Fágica e Potenciais Estratégias de Resolução</b>	<b>37</b>
5.1. Especificidade Limitada dos Fagos .....	37
5.2. Desenvolvimento de Resistência das Bactérias à Ação dos Fagos .....	39
5.3. Resposta Imunológica e Interações com o Hospedeiro .....	39
5.4. Desafios Regulamentares e Éticos na Implementação da Terapia Fágica.....	41
5.5. Questões de Produção, Controlo de Qualidade e Armazenamento.....	42
<b>6. Da Validação Científica à Aplicação Clínica da Terapia Fágica.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Inovações Tecnológicas na Terapia Fágica .....</b>	<b>47</b>
7.1. Engenharia Genética de Fagos .....	47
7.2. Nanotecnologia Aplicada à Terapia Fágica .....	49
<b>III. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estimativa do número de mortes por 100.000 habitantes devido a infeções por bactérias resistentes a antibióticos, por país, UE/EEE, 2020. Adaptado de (Merk et al., 2022) .....	18
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática das estruturas de bacteriófagos com cauda ( <i>Caudovirales</i> ). Adaptado de (Nobrega et al., 2018).....	23
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática dos ciclos replicativos dos bacteriófagos. Adaptado de (Davies et al., 2016).....	26
<b>Figura 4</b> - Visão geral do processo de produção de fagos. Adaptado de (João et al., 2021). .....	28
<b>Figura 5</b> - Engenharia genética de fagos através do sistema CRISPR-Cas. Adaptado de (Hussain et al., 2023). .....	49



## **Lista de Abreviaturas**

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**AMPs** - Péptidos Antimicrobianos

**ARN** - Ácido Ribonucleico

**APCs** - *Antigen Presenting Cells*

**BPPL** - Lista de Agentes Patogénicos Bacterianos Prioritários

**BRED** - *Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA*

**Cas9** - *CRISPR Associated Protein 9*

**CRISPR/Cas** - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated Protein*

**crRNA** – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats RNA*

**dsADN** - ADN de Cadeia Dupla

**dsARN** - ARN de Cadeia Dupla

**EPS** - Matriz de Substâncias Poliméricas Extracelulares

**EMA** - *European Medicines Agency*

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**ICTV** - Comité Internacional de Taxonomia de Vírus

**ITUs** - Infecções do Trato Urinário

**LPS** - Lipopolissacarídeos

**mAb** - Anticorpos Monoclonais

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

**NPs** - Nanopartículas

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PIB** - Produto Interno Bruto

**QS** - *Quorum sensing*

**RAM** - Resistência Antimicrobiana

**RBP**s – *RNA Binding Proteins*

**ssARN** - ARN de Cadeia Simples

**ssADN** – ADN de Cadeia Simples

**tracrRNA** - *Trans-activating CRISPR RNA*

## **I. INTRODUÇÃO**

Uma das mais revolucionárias descobertas científicas do século XX aconteceu quando, em 1928, o bacteriologista Alexander Fleming, fez a descoberta do que viria a ser o primeiro antibiótico da história, a penicilina (Hoff et al., 2008). Desde então, muitos antibióticos foram descobertos e utilizados com o objetivo de combater infecções causadas por bactérias, devido ao seu amplo espectro de ação e facilidade de produção em massa (Gordillo Altamirano & Barr, 2021).

Logo após a introdução dos antibióticos, constatou-se que as bactérias eram capazes de desenvolver mecanismos para resistir à sua ação. Com o tempo, verificou-se que o uso excessivo e incorreto desses medicamentos acelerou o surgimento de resistências bacterianas, fenômeno que ficou conhecido como resistência aos antibióticos (Davies & Davies, 2010).

Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS), destacou a resistência antimicrobiana (RAM) como uma das dez principais ameaças globais à saúde pública. Estima-se que tenha provocado cerca de 1,27 milhões de mortes a nível mundial, podendo este número aumentar para 10 milhões se esta tendência permanecer (Murray et al., 2022).

O crescente problema das resistências bacterianas incentivou a procura por novas abordagens terapêuticas capazes de erradicar bactérias multirresistentes responsáveis por infecções (O'Neill, 2016). A terapia com bacteriófagos, também conhecida como terapia fágica, destaca-se como uma das opções mais promissoras, sendo usada há várias décadas em países da Europa de Leste no tratamento de infecções bacterianas (Pelfrene et al., 2016).

Os bacteriófagos ou fagos, são vírus capazes de infetar e destruir bactérias, não afetando outras células ou organismos. Foram descobertos há mais de um século por Felix d'Herrelle e Frederick Twort (Salmond & Fineran, 2015). Na terapia fágica, os fagos devem ser preferencialmente líticos, destruir o hospedeiro bacteriano de forma eficaz e não causar quaisquer efeitos colaterais (Strathdee et al., 2023).

Embora a terapia com bacteriófagos tenha sido descoberta antes dos antibióticos, a ampla disponibilidade de antibióticos durante a Segunda Guerra Mundial, aliada à sua eficácia e segurança no combate a um amplo espectro de bactérias, levou ao abandono dos fagos no tratamento de infecções bacterianas (Bhargava et al., 2021). No entanto, recentemente, a terapia fágica tem vindo a ganhar novo destaque, sendo agora

considerada uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos (Pires et al., 2020). Com os recentes avanços na imunobiologia dos fagos, abriu-se uma nova perspectiva no seu uso terapêutico, permitindo a sua aplicação tanto em infecções bacterianas como virais. Apesar deste progresso, persistem ainda desafios importantes, nomeadamente a necessidade de desenvolver estudos clínicos mais robustos, que possam demonstrar a eficácia da terapia com bacteriófagos e permitir a sua implementação no combate à multirresistência bacteriana (Bhargava et al., 2021).

Assim, esta revisão narrativa tem como objetivo apresentar uma perspectiva geral da terapia fágica como alternativa ou complemento à terapia antibiótica no combate a bactérias resistentes, com base na pesquisa da literatura recente sobre o tema. Serão abordados tópicos como o aumento da resistência aos antibióticos, os princípios biológicos dos bacteriófagos, as vantagens e desvantagens da terapia fágica em comparação com a terapia antibiótica, as aplicações clínicas e os desafios da sua implementação e regulamentação futura, bem como novas estratégias tecnológicas, como os fagos geneticamente modificados, entre outros.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. Terapia Antibiótica

#### 1.1. Enquadramento Histórico

O percurso para a descoberta dos antibióticos, começou em 1928, quando o bacteriologista Alexander Fleming, observou que uma das suas culturas de *Staphylococcus* spp., tinha sido contaminada acidentalmente por um fungo. Este fungo, posteriormente identificado como *Penicillium notatum*, produzia uma substância capaz de inibir o crescimento das bactérias ao seu redor, a penicilina (American Chemical Society, 2024).

Em 1940, na Universidade de Oxford, Howard Florey e Ernst Chain, retomaram as pesquisas de Fleming e realizaram testes *in vivo* para reconhecer as propriedades antibacterianas da penicilina e a sua eficácia. Os resultados positivos possibilitaram o aperfeiçoamento das técnicas de produção em larga escala e permitiram, mais tarde, a sua utilização no controlo de infeções bacterianas durante a Segunda Guerra Mundial, representando assim um avanço significativo no domínio da medicina moderna (American Chemical Society, 2024).

Desde então, os antibióticos têm sido fundamentais para salvar milhões de vidas sendo utilizados em diversos domínios da prática clínica, como intervenções cirúrgicas, transplantes, oncologia e no tratamento infeções graves (Patil et al., 2021).

#### 1.2. Resistência Bacteriana aos Antibióticos

A resistência antimicrobiana (RAM) é considerada uma das principais ameaças para a saúde pública global. Este fenómeno surge quando um organismo patogénico como bactérias, vírus, fungos ou parasitas desenvolvem mecanismos para resistir aos efeitos terapêuticos de agentes antimicrobianos, aumentando o risco de contágio, mortalidade e gravidade de certas doenças (WHO, 2023).

O uso inadequado e excessivo de antibióticos, em humanos, animais e plantas, aliado à capacidade inerente de evolução das bactérias e à pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, favoreceu o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (Davies & Davies, 2010; WHO, 2014).

Devido ao crescimento exponencial da resistência antibiótica, que resultou no surgimento de bactérias multirresistentes, a OMS criou, em 2017, uma lista de agentes patogênicos bacterianos prioritários (BPPL). Tendo como objetivo orientar a investigação e o desenvolvimento de novos tratamentos para prevenir e controlar a disseminação de bactérias resistentes (WHO, 2017).

Em 2024, esta lista foi alvo de uma atualização para incluir as novas evidências e a evolução das resistências (WHO, 2024). Está dividida em três categorias prioritárias (média, alta e crítica), sendo que, na crítica, a mais urgente, estão incluídas bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenemos, Enterobactérias resistentes aos carbapenemos e cefalosporinas de terceira geração e também *Mycobacterium tuberculosis*, resistente à rifampicina. As bactérias de alta prioridade incluem *Salmonella Typhi* e *Shigella spp.*, com elevada incidência nos países em desenvolvimento, bem como *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*, que são bactérias frequentemente associadas aos serviços de prestação de cuidados de saúde. Destacam-se também *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecium* e *Salmonella* não tifóide, com resistências a múltiplos antibióticos. Na categoria de prioridade média estão incluídas bactérias como *Streptococcus* do Grupo A e B, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, que afetam com maior frequência populações vulneráveis, como idosos e crianças.

Como tal, é destacada a importância de uma abordagem global aos cuidados de saúde pública, visando incentivar e promover o acesso universal a serviços de saúde com qualidade e acessíveis para a prevenção, diagnóstico e tratamento adequado das infecções, com o objetivo de mitigar o impacto da resistência antimicrobiana na saúde pública.

### **1.2.1. Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana**

A resistência antimicrobiana (RAM) pode ter duas principais origens, a natural e a adquirida (Reygaert, 2018). A resistência natural está presente de forma inata numa espécie bacteriana devido à sua constituição genética e estrutura biológica. Esta pode ser classificada como intrínseca, se não resultar de exposição prévia a antibióticos ou induzida se for ativada quando a bactéria é exposta a um determinado antibiótico ou a outro agente antimicrobiano (Reygaert, 2018). Já a resistência adquirida, pode ser desenvolvida através mutações genéticas ou devido à transferência horizontal de genes,

ou seja, a bactéria adquire genes de resistência provenientes de outras bactérias (Boto & Martínez, 2011; Larsson & Flach, 2022).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos são estratégias utilizadas pelas bactérias para sobreviverem à ação dos antibióticos. Os principais mecanismos são: (1) Redução da permeabilidade da membrana; (2) Modificação do alvo; (3) Inativação enzimática; (4) Ativação de bombas de efluxo (Mancuso et al., 2021; Reygaert, 2018).

Relativamente à redução da permeabilidade, várias estruturas bacterianas influenciam a entrada de fármacos. A camada de lipopolissacarídeos (LPS) nas bactérias Gram-negativas funciona como uma barreira, conferindo resistência inata a vários agentes antimicrobianos. Da mesma forma, membranas externas ricas em lípidos facilitam a entrada de fármacos hidrofóbicos, mas limitam a penetração de compostos hidrofílicos (Blair et al., 2014; Reygaert, 2018). Nas bactérias Gram-positivas, a resistência intrínseca a determinados fármacos deve-se à dificuldade das moléculas polares em atravessar a parede celular, sendo que o espessamento dessa parede pode agravar essa resistência, dificultando ainda mais a entrada dos antibióticos (Miller et al., 2014; Reygaert, 2018). Nas bactérias Gram-negativas, mutações genéticas podem levar a uma diminuição das porinas (proteínas transmembranares) ou podem levar a alterações que afetam a sua seletividade e conseqüentemente dificultam a entrada dos fármacos (Reygaert, 2018). Além disso, a formação de biofilmes cria uma barreira física adicional, limitando a penetração eficaz dos agentes antimicrobianos nas células bacterianas (Mah, 2012).

Na inativação enzimática, as bactérias produzem enzimas que degradam os antibióticos ou que modificam a estrutura química, acrescentando grupos funcionais ao antibiótico, impossibilitando a molécula de se ligar ao seu alvo bacteriano (Blair et al., 2015).

A modificação do alvo é um mecanismo em que a bactéria tem a capacidade de alterar o local de ação ou a estrutura do alvo do antibiótico. Estas alterações podem ocorrer através de mutações, aquisição de genes que codificam um homólogo do alvo do fármaco, ou adição de grupos funcionais às moléculas-alvo, criando uma barreira física que impede a ação do fármaco (Blair et al., 2015; Reygaert, 2018).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas bacterianas. A sua ativação tem como objetivo expulsar o antibiótico do interior da célula ou do espaço intermembranar, impedindo que o antibiótico se acumule dentro da bactéria em concentrações suficientes para causar um efeito antibacteriano (Nishino et al., 2021).

Devido às diferenças na composição e morfologia das paredes celulares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, os mecanismos de resistência utilizados variam. As bactérias Gram-negativas utilizam todos os quatro principais mecanismos de resistência, incluindo o mecanismo que reduz a permeabilidade da membrana, já que possui LPS na sua membrana externa. Esta característica dificulta a entrada de substâncias na bactéria, tornando-as mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias Gram-positivas (Breijyeh et al., 2020; Reygaert, 2018).

### **1.2.2. Impacto na Saúde Pública**

O Fórum Económico Mundial reconheceu a resistência aos antibióticos como uma ameaça global que ultrapassa a capacidade de qualquer organização ou país de resolver de forma independente (World Economic Forum, 2018).

Os impactos desta crise afetam de forma significativa diversos domínios da sociedade. No setor da saúde, observa-se um aumento de hospitalizações, morbidade e mortalidade na população em geral, o que resulta, por conseguinte, num acréscimo de despesas diretas e indiretas em saúde (Ait Ouakrim et al., 2020; World Bank, 2017). Os custos diretos abrangem os recursos necessários para tratar ou lidar com a doença em si. Por sua vez, os custos indiretos referem-se à diminuição da oferta de mão de obra, da produtividade e dos rendimentos familiares associados à doença (World Bank, 2017; WHO, 2015). Os setores agrícola e da pecuária, podem também representar um grave risco para a saúde pública, devido à transmissão de bactérias resistentes aos humanos, seja através dos alimentos ou do contato direto com animais que carregam essas bactérias (McEwen & Collignon, 2018).

Consequentemente, verificou-se um declínio do Produto Interno Bruto (PIB) e das receitas fiscais, afetando de forma significativa a sociedade, economia e a sustentabilidade dos sistemas públicos de saúde (WHO, 2015).

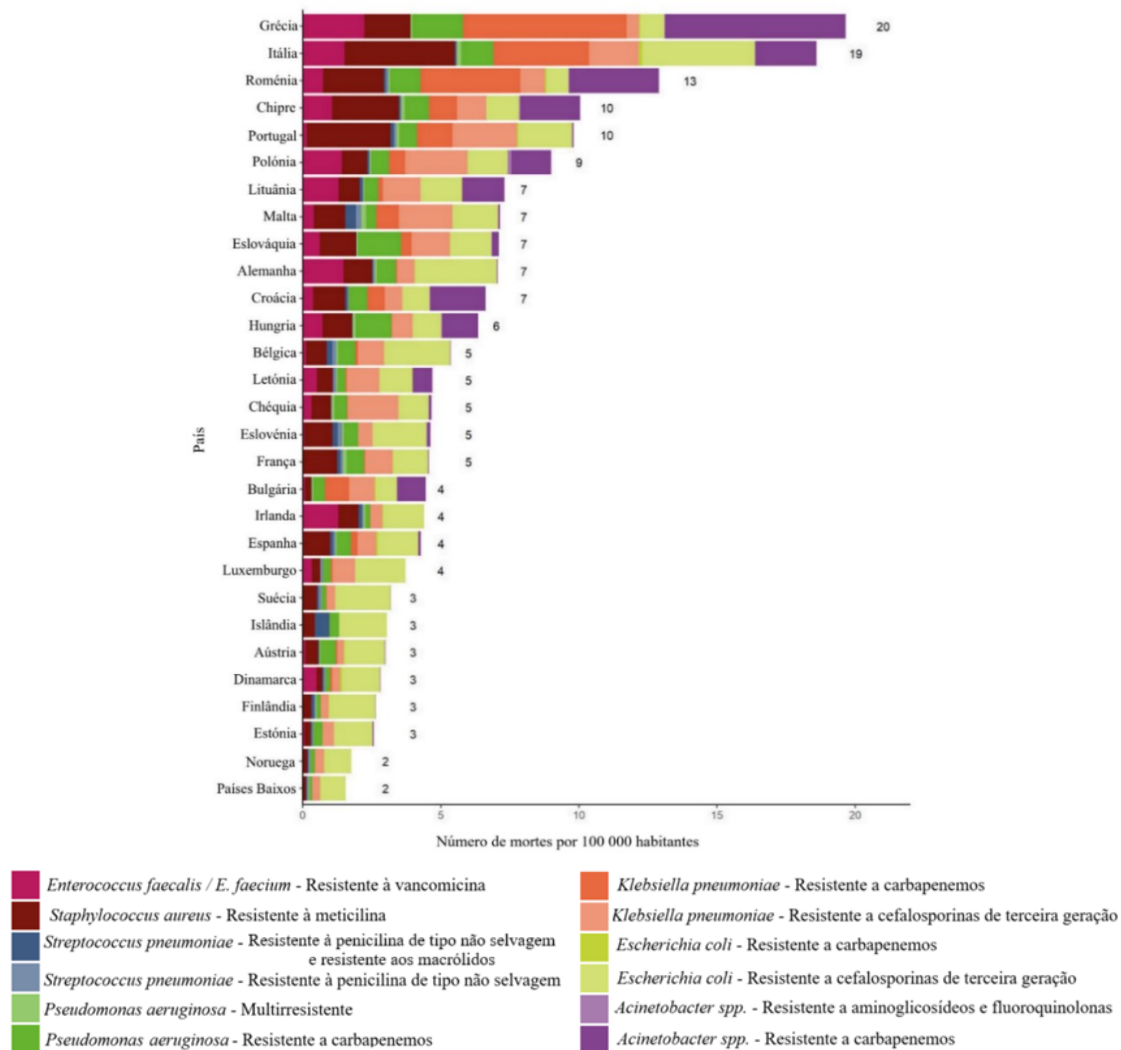
De acordo com um estudo recente, estimou-se que, em 2019, a resistência bacteriana aos antibióticos tenha sido diretamente responsável pela morte de 1,27 milhões de pessoas em todo o mundo e tenha contribuído para um total de 4,95 milhões de óbitos (Murray et al., 2022). Microrganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram responsáveis por mais de 929.000 dessas mortes (Murray et al., 2022).

Caso a atual tendência de utilização inadequada e excessiva de antibióticos se mantenha, e não sejam adotadas medidas eficazes, a OMS prevê que, até 2050, as infecções resistentes poderão causar a morte de cerca de 10 milhões de pessoas por ano (World Bank, 2017; O'Neill, 2016).

No cenário mais favorável, as simulações indicam que, até 2050, o PIB global anual poderá diminuir cerca de 1,1% em comparação com um cenário sem a presença de RAM, o que resultaria numa perda anual superior a um milhar de milhões de dólares após 2030 (World Bank, 2017).

Na União Europeia, o número de infecções por bactérias multirresistentes tem vindo a aumentar significativamente, tendo-se registado, aproximadamente 35813 mortes em 2020 (Merk et al., 2022). A maioria dessas infecções (70.9%) foi associada aos cuidados de saúde, com custos estimados de 1.5 mil milhões de euros por ano (Merk et al., 2022).

Ainda de acordo com Merk e colaboradores (2022), entre os países europeus, Portugal destaca-se com uma das taxas mais elevadas de mortalidade causada por infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Em 2020, essa taxa atingiu 10 mortes por 100.000 habitantes, superado apenas por países como Grécia, Itália e Roménia. As bactérias multirresistentes que mais contribuem para esta taxa de mortalidade em Portugal incluem *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemos, entre outras. Informação ilustrada na **Figura 1**.



**Figura 1** - Estimativa do número de mortes por 100.000 habitantes devido a infecções por bactérias resistentes a antibióticos, por país, UE/EEE, 2020. Adaptado de (Merk et al., 2022)

As evidências sobre o impacto da COVID-19 no aumento da resistência aos antibióticos ainda não são conclusivas, no entanto, sugerem que a pandemia possa ter acelerado a transmissão e o agravamento da resistência antimicrobiana, especialmente para bactérias Gram-negativas em ambientes hospitalares (Langford et al., 2023).

Fatores como a automedicação, a administração empírica baseada em diagnósticos incertos e a prescrição indiscriminada contribuíram de forma significativa para este fenómeno (Sulayyim et al., 2022).

Este cenário evidencia o impacto devastador das infecções por bactérias resistentes a antibióticos e a facilidade com que estas podem propagar-se, ameaçando a segurança da saúde global e a estabilidade económica mundial (Aslam et al., 2018).

### 1.3. Limitações atuais da Terapia Antibiótica

O uso incorreto e excessivo de antibióticos é o principal impulsionador do desenvolvimento de resistência bacteriana, que ao longo do tempo vai selecionando as bactérias resistentes, que assim se tornam predominantes em relação às suscetíveis (Aslam et al., 2018).

Apesar desta tendência crescente da resistência antimicrobiana, a investigação e o desenvolvimento de novos antibióticos não têm acompanhado a necessidade clínica, principalmente devido ao desinteresse por parte das grandes empresas farmacêuticas que desistiram de investir na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (O'Neill, 2016). Este desinteresse é explicado pela baixa rentabilidade dos antibióticos em comparação com outros medicamentos, como os utilizados no tratamento de doenças crônicas, pelos elevados custos de investigação e desenvolvimento, e pela complexidade do processo regulatório (Mohsen et al., 2020; Tacconelli et al., 2018; Weledji et al., 2017).

Além de poderem causar efeitos adversos significativos, como reações de hipersensibilidade, interações medicamentosas e toxicidade renal ou hepática, os antibióticos, especialmente os de amplo espectro, podem também destabilizar a flora comensal do organismo, criando condições favoráveis para que microrganismos patogênicos resistentes e oportunistas se estabeleçam e proliferem, como é o caso do *Clostridioides difficile* (Loc-Carrillo & Abedon, 2011; Malik et al., 2018; Weledji et al., 2017).

Dada a gravidade da situação, é essencial combinar o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos com a implementação de soluções já existentes e explorar novas estratégias que possam complementar ou substituir as terapêuticas atuais (WHO, 2023).

### 1.4. Surgimento de Novas Terapêuticas Alternativas

Novas abordagens antimicrobianas estão a ser exploradas. Entre as estratégias mais promissoras destacam-se os péptidos antimicrobianos (AMPs), inibidores de *quorum sensing* (QS), a utilização de nanopartículas (NPs), os anticorpos monoclonais (mAb) e a terapia fágica (Alaoui Mdarhri et al., 2022; Konwar et al., 2022).

Os AMPs são pequenas cadeias de aminoácidos e são uma parte fundamental do sistema imunológico inato de muitos organismos, como humanos, animais, plantas e até mesmo alguns microrganismos (Huan et al., 2020). Atuam contra diversos microrganismos através de mecanismos como a perturbação da integridade das

membranas celulares, interação com alvos intracelulares específicos e através da inibição da síntese de proteínas, ADN ou ARN (Alaoui Mdarhri et al., 2022; Alcayaga-Miranda et al., 2017).

Os inibidores de *quorum sensing* (QS), atuam bloqueando os sinais de comunicação entre bactérias, essenciais para coordenar atividades como a formação de biofilmes, produção de toxinas e fatores de virulência e a conjugação de ADN (Abisado et al., 2018; Wang et al., 2020).

As nanopartículas (NPs), que podem agir como agentes terapêuticos, destabilizando a membrana celular das bactérias, interferindo com a expressão de proteínas essenciais e perturbando a síntese de ADN. Podem também ser usadas como veículos de entrega de medicamentos, permitindo prolongar o tempo de retenção do fármaco no sangue e a administração precisa e controlada de antimicrobianos diretamente no local da infecção (Gupta et al., 2019).

A utilização de anticorpos monoclonais (mAb) que têm como alvo vários epítomos bacterianos e fatores de virulência, visam inibir a virulência dos organismos, sem criar pressões seletivas sobre os microrganismos que possam promover o desenvolvimento de resistência (Motley et al., 2019).

Por fim, a terapia fágica é considerada uma das mais relevantes no combate a infecções bacterianas, especialmente face ao contexto de crescente resistência aos antibióticos (Strathdee et al., 2023). Este tratamento utiliza bacteriófagos, que são vírus especializados para atacar exclusivamente determinadas bactérias patogênicas responsáveis pela infecção (Aranaga et al., 2022).

## **2. Terapia fágica: Uma Alternativa Promissora**

### **2.1. Bacteriófagos: Caracterização Geral e Abundância**

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são pequenos vírus capazes de infectar e eliminar bactérias sem causarem qualquer efeito negativo nas células humanas ou animais, uma vez que são altamente específicos e seletivos (Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018). Desempenham um papel crucial na manutenção do equilíbrio microbiano em diversos ecossistemas. Encontram-se em todos os habitats naturais,

incluindo ambientes aquáticos e terrestres, onde também se encontram os seus hospedeiros bacterianos (Matsuzaki et al., 2014).

Uma vez que evoluem mutuamente com as bactérias há cerca de 4 mil milhões de anos, são considerados os organismos mais antigos e abundantes do planeta, com um número estimado de  $10^{31}$  partículas presentes no ambiente (Beavogui et al., 2024; Mushegian, 2020).

Num ser humano adulto, estima-se que diariamente cerca de 31 mil milhões de fagos sejam translocados do intestino para o resto do corpo, desempenhando um papel importante na manutenção dos microbiomas (Nguyen et al., 2017).

## 2.2. Enquadramento Histórico da Terapia Fágica

A utilização de bacteriófagos como agentes terapêuticos para tratar infeções bacterianas começou na década de 1920, ainda antes da descoberta da penicilina por Alexander Fleming (Gu et al., 2012).

Em 1915, num artigo publicado na revista científica *The Lancet*, o microbiólogo britânico Frederick Twort terá relatado a observação de zonas sem crescimento bacteriano nas colónias de *Staphylococcus sp.*, durante a sua investigação focada no cultivo do vírus Vaccinia (Durbas & Machnik, 2022; Emrich & Richter, 2021). Twort não foi capaz de explicar o fenómeno observado, limitando-se a descrevê-lo como “lise bacteriana transmissível”, sugerindo que algo estava a destruir as bactérias (Chanishvili, 2012).

Dois anos mais tarde, em 1917, foi Félix d'Hérelle, microbiólogo no Instituto Pasteur em Paris, quem, de forma independente utilizou as observações iniciais de Twort para avançar significativamente na compreensão deste fenómeno (Emrich & Richter, 2021). Perante um surto de disenteria hemorrágica em soldados franceses, d'Hérelle ficou encarregado de descobrir a sua causa. Durante os seus estudos, d'Hérelle preparou filtrados bacterianos e misturou-os com estirpes de *Shigella* isoladas dos soldados infetados, incubando a mistura. Após a incubação, verificou que as estirpes de *Shigella* estavam a ser destruídas e conseguiu isolar o agente responsável por essa destruição, identificando-o como um vírus que infetava e eliminava as bactérias, ao qual deu o nome de bacteriófago (Chanishvili, 2012; Letarov, 2020).

Após a descoberta dos bacteriófagos, Félix d'Hérelle rapidamente reconheceu o seu potencial terapêutico para tratamento de infeções bacterianas (Emrich & Richter, 2021). Em 1919, demonstrou com sucesso a eficácia dos fagos no tratamento de galinhas

infetadas com *Salmonella gallinarum*, uma infecção responsável por significativas perdas econômicas para os avicultores franceses. Este êxito encorajou-o a expandir o uso dessa terapia em humanos (Letarov, 2020). Dois anos depois, d'Hérelle documentou a primeira evidência de sucesso da terapia fágica em humanos, num estudo no Hospital “des Enfants Malades”, em Paris, onde utilizou fagos específicos para *Shigella dysenteriae* no tratamento de pacientes com disenteria bacteriana (Chanishvili, 2012; Letarov, 2020).

Félix d'Hérelle, em colaboração com George Eliava, fundou o Instituto Eliava em Tbilisi, Geórgia, que se tornou num dos principais centros de investigação em bacteriófagos, permanecendo até hoje como uma referência mundial na investigação e aplicação da terapia fágica (Durbas & Machnik, 2022). Este centro teve um papel crucial na investigação e utilização de fagos nos países da Europa de leste, especialmente na Geórgia e na Polónia, onde a terapia com fagos continuou a ser desenvolvida (El-Shibiny & El-Sahhar, 2017). Paralelamente, nessa altura, a terapia com fagos foi investigada e aplicada em países como França e Estados Unidos, tendo sido utilizada tanto em estudos experimentais como em tratamentos de infeções bacterianas (Durbas & Machnik, 2022).

Contudo, após a Segunda Guerra Mundial, os antibióticos começaram a ganhar destaque por serem considerados mais práticos e eficazes no tratamento de infeções bacterianas, em comparação com os fagos, que necessitam de um alvo bacteriano específico. O crescimento da indústria farmacêutica também desempenhou um papel fundamental na diminuição do uso da terapia fágica, uma vez que os antibióticos, eram fáceis de produzir em grande escala, estáveis e simples de administrar, tornando-se a principal solução para combater infeções bacterianas e resultando em enormes lucros (Summers, 2012). Além disso, as tensões políticas entre os Estados Unidos e a União Soviética no período pós-guerra, juntamente com o sucesso dos antibióticos, resultaram no abandono da terapia fágica no Ocidente e fomentaram uma crescente desconfiança em relação à ciência desenvolvida nos países soviéticos, perpetuando o ceticismo sobre essa abordagem durante várias décadas e restringindo a sua utilização à União Soviética e a alguns países da Europa de Leste, como a Geórgia e a Polónia, onde o Instituto Eliava em Tbilisi e o Instituto Ludwik Hirszfild em Breslavia permanecem em atividade até hoje (Rohde et al., 2018; Summers, 2012; Torres-Barceló & Hochberg, 2016).

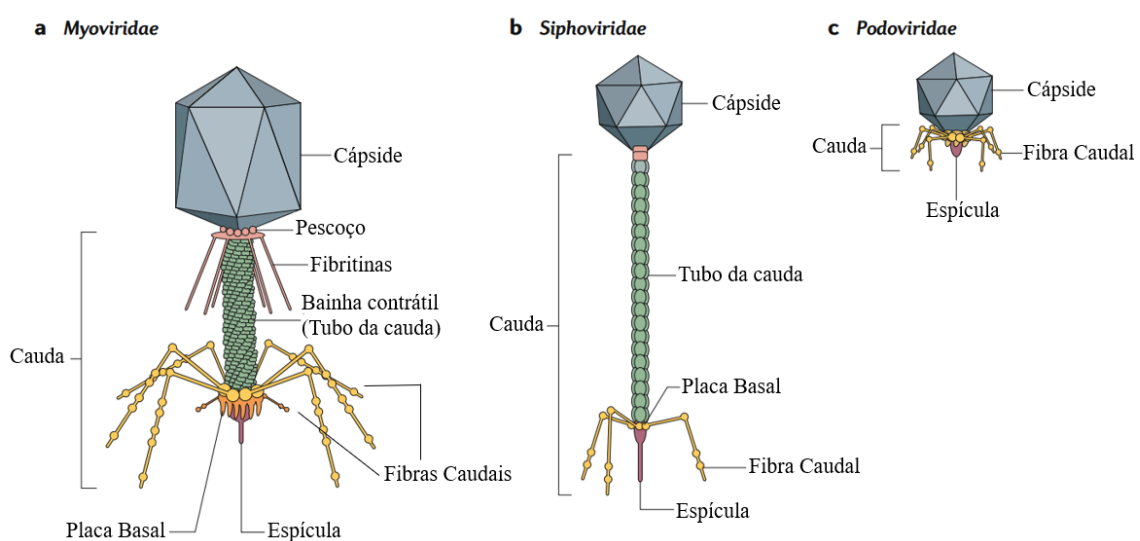
Recentemente, com o crescente aparecimento de bactérias patogénicas resistentes a múltiplos antibióticos, esta abordagem tem vindo a recuperar relevância. Paralelamente, os relatos bem-sucedidos do uso de fagos no tratamento de infeções bacterianas

multirresistentes e graves reforçam o seu potencial como uma abordagem terapêutica eficaz e promissora (Schooley et al., 2017).

### 2.3. Estrutura e Classificação dos Bacteriófagos

A estrutura dos bacteriófagos é altamente especializada para reconhecer, infectar e destruir as células bacterianas, sendo constituída por diferentes componentes que facilitam a sua função biológica (Hatfull et al., 2022; Nikolich & Filippov, 2020). Do ponto de vista morfológico, os bacteriófagos são compostos por dois elementos essenciais e comuns a todos eles: a cápside, uma estrutura proteica cuja função é proteger e garantir a estabilidade do material genético (que pode ser ADN ou ARN, de cadeia simples ou dupla) até que o fago consiga infectar a célula hospedeira; e o próprio material genético, que contém a informação necessária para a replicação do fago dentro da célula infetada (Harada et al., 2018; White et al., 2019).

Além destes elementos essenciais, muitos bacteriófagos possuem caudas cuja complexidade varia conforme o tipo de fago. Estas caudas podem ser compostas por proteínas de ligação aos recetores (RBPs) como fibras caudais, espículas e também por placas basais, que auxiliam no reconhecimento e fixação à célula hospedeira (Nobrega et al., 2018; Tavares, 2018). Em alguns fagos, há uma interface entre a cápside e a cauda, denominada pescoço, que assegura a ligação estrutural entre essas partes (Tavares, 2018) (**Figura 2**).



**Figura 2** - Representação esquemática das estruturas de bacteriófagos com cauda (Caudovirales). Adaptado de (Nobrega et al., 2018)

A classificação dos bacteriófagos desempenha um papel essencial após a sua descoberta, garantindo que sejam corretamente agrupados de acordo com características específicas. Esta classificação é supervisionada pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), que organiza os vírus em diferentes níveis taxonómicos (Adams et al., 2017). No caso dos bacteriófagos, a responsabilidade pela sua classificação incide sobre o Subcomité de Vírus de Bactérias e Arqueas, que utiliza uma série de propriedades dos fagos para proceder à sua classificação (Dion et al., 2020; Krupovic et al., 2021).

Inicialmente, a classificação dos bacteriófagos baseava-se principalmente em características morfológicas e na composição genómica (Adriaenssens & Rodney Brister, 2017). No entanto, com os avanços nas técnicas de sequenciação, essa abordagem evoluiu, passando a considerar aspetos como a composição molecular do genoma, a morfologia geral do fago, a estrutura da cápside e o espectro de hospedeiros, ou seja, o conjunto de bactérias que um fago é capaz de infetar (Dion et al., 2020; Zhu et al., 2022).

Os fagos podem ser classificados em quatro grupos principais com base no tipo de genoma que possuem: ADN de cadeia simples (ssADN), ADN de cadeia dupla (dsADN), ARN de cadeia simples (ssARN) e ARN de cadeia dupla (dsARN) (Dion et al., 2020; White et al., 2019).

Os bacteriófagos da ordem *Caudovirales*, que possuem genomas de ADN de cadeia dupla (dsADN), são os mais estudados cientificamente e prevalecem nos vários ecossistemas (Dion et al., 2020). São classificados de acordo com o tipo de cauda que possuem, estando organizados em três principais famílias: *Myoviridae*, que possuem caudas contráteis; *Siphoviridae*, com caudas longas e não contráteis; e *Podoviridae*, que possuem caudas curtas (White et al., 2019) (**Figura 2**).

As caudas dos bacteriófagos desempenham um papel fundamental no processo de infeção bacteriana e na especificidade do hospedeiro, com a sua estrutura a variar entre diferentes tipos de fagos, influenciando diretamente o mecanismo de infeção (Harada et al., 2018; Nobrega et al., 2018; White et al., 2019).

Relativamente à cápside, a sua forma nos bacteriófagos varia consoante a família a que pertencem. Nos fagos das famílias *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*, a cápside tem uma forma poliédrica, enquanto nos da família *Inoviridae*, a cápside apresenta-se de forma filamentosa e nos da *Plasmaviridae*, a cápside é pleomórfica, ou seja, sem uma forma fixa, adaptando-se ao ambiente (Ackermann, 2012).

A classificação taxonómica dos vírus, conforme estabelecida pelo ICTV, organiza os vírus em até 15 níveis taxonómicos, desde o reino até à espécie, sendo esta hierarquia revista continuamente para acomodar as descobertas de novos fagos e outros vírus (Simmonds et al., 2023).

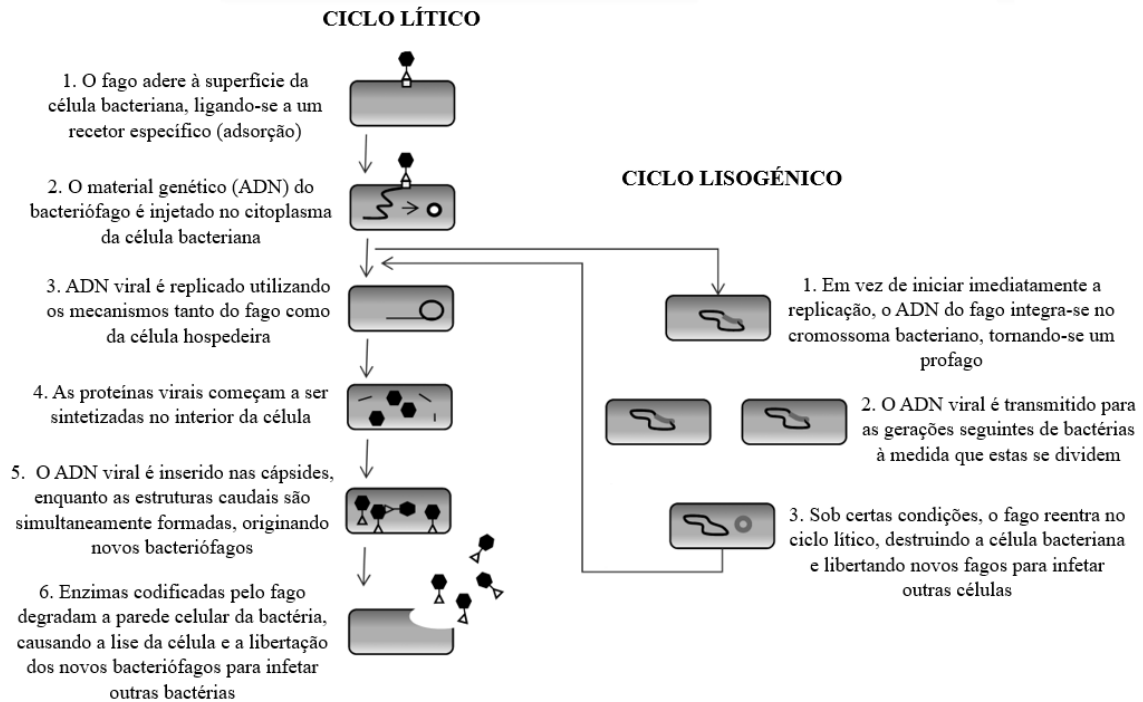
Em 2024, o ICTV implementou uma atualização, refletindo a diversidade crescente de vírus que têm sido identificados. Essa nova organização taxonómica inclui 6 reinos, 10 sub-reinos, 18 filos, 2 subfilos, 41 classes, 81 ordens, 11 subordens, 314 famílias, 200 subfamílias, 3522 géneros, 84 subgéneros e 14.690 espécies de vírus (<https://ictv.global/taxonomy>).

## 2.4. Ciclos de Vida dos Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que dependem da infeção de células hospedeiras para completar o seu ciclo de vida, encontrando-se em qualquer ambiente onde existam bactérias ou arqueas, pois dependem destas para se replicarem (Leprince & Mahillon, 2023; Rakhuba et al., 2010). Os fagos distinguem-se pela sua elevada especificidade, geralmente infetando apenas uma espécie bacteriana ou um número restrito de estirpes dentro dessa espécie (Nikolich & Filippov, 2020).

Para garantir a sua replicação, os fagos penetram nas células bacterianas, onde aproveitam os recursos do hospedeiro para sintetizar proteínas e replicar o seu material genético, culminando na produção de novos viriões, assegurando a continuidade do ciclo viral (Leprince & Mahillon, 2023; Rakhuba et al., 2010).

Os bacteriófagos podem seguir dois ciclos de vida distintos: o ciclo lítico e o ciclo lisogénico, sendo que a compreensão de ambos é fundamental para a sua aplicação terapêutica (Gordillo Altamirano & Barr, 2021) (**Figura 3**).



**Figura 3** - Representação esquemática dos ciclos replicativos dos bacteriófagos. Adaptado de (Davies et al., 2016)

Independentemente do ciclo de vida que o bacteriófago segue após infetar a bactéria, o processo inicial é sempre o mesmo: o fago primeiro reconhece e liga-se a recetores específicos na superfície da célula bacteriana (adsorção) e, de seguida, injeta o seu material genético no citoplasma da célula bacteriana hospedeira, o que dá início ao ciclo de replicação (Leprince & Mahillon, 2023).

No ciclo lítico, após o bacteriófago injetar o seu material genético na célula hospedeira, o bacteriófago assume o controlo de mecanismos celulares bacterianos como a transcrição, tradução e replicação, utilizando-os para replicar o seu próprio genoma e produzir proteínas virais, incluindo componentes estruturais (cápside e cauda) e enzimas líticas (Davies et al., 2016; Kortright et al., 2019).

Os fagos recorrem a duas proteínas principais para destruir a célula hospedeira: as holinas e as endolisinas, que juntas formam o sistema holina-lisina. As holinas têm a função de perfurar a membrana celular da bactéria para facilitar a entrada das endolisinas, que são responsáveis por degradar o peptidoglicano da parede celular bacteriana. Esta degradação enfraquece a parede, levando à rutura da célula e, por fim, à lise bacteriana (Cisek et al., 2017). Como resultado, os novos fagos formados são libertados no ambiente,

onde podem infectar outras bactérias e dar continuidade ao ciclo de infecção (Davies et al., 2016; Kortright et al., 2019).

Os bacteriófagos lisogênicos, também conhecidos como temperados, têm a capacidade de alternar entre o ciclo lítico e o ciclo lisogênico, dependendo das condições ambientais (Davies et al., 2016). No ciclo lisogênico, o material genético do fago é integrado no cromossoma da célula hospedeira, formando o profago, e é replicado juntamente com o ADN bacteriano durante cada divisão celular. Assim, o material genético do fago é mantido na célula hospedeira sem desencadear a lise imediata da célula, o que favorece a sobrevivência e propagação do fago a longo prazo (Subramanian, 2024). Este fenómeno impede que outros vírus da mesma espécie infetem e destruam a bactéria, proporcionando uma vantagem competitiva ao fago lisogênico em ambientes desfavoráveis. Ao mesmo tempo, confere à célula uma proteção adicional contra infecções por fagos semelhantes, num processo conhecido como imunidade à superinfecção (Zhang et al., 2022).

Além disso, os fagos lisogênicos podem modificar o fenótipo da bactéria hospedeira através da conversão lisogénica, conferindo-lhe novas características, como a capacidade de formar biofilmes, resistência a antibióticos ou produção de toxinas. Estas alterações, resultantes da integração de genes de virulência e mobilização de genes de resistência, aumentam a patogenicidade e a competitividade da bactéria em ambientes adversos (Gordillo Altamirano & Barr, 2019a; Gummalla et al., 2023; Zhang et al., 2022).

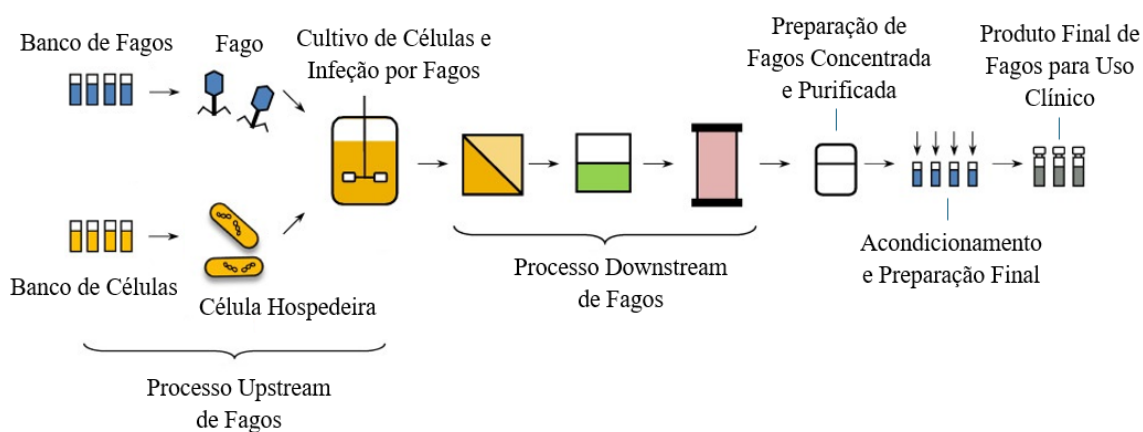
Sob perturbações ambientais, como salinidade elevada, poluição, radiação ultravioleta, superinfecção ou variações de temperatura, o fago lisogênico pode ser reativado. Estes fatores de stress fisiológico interferem com a proteína repressora ao ativar a resposta SOS da célula hospedeira (Roughgarden, 2024; Zhang et al., 2022). Este processo desencadeia a transição do estado lisogênico para o ciclo lítico, resultando na destruição da célula hospedeira (lise) e consequente libertação de novos viriões (Zhang et al., 2022).

A capacidade dos fagos líticos em eliminar rapidamente células bacterianas infetadas posiciona-os como uma alternativa promissora no desenvolvimento de terapias para o tratamento de infecções bacterianas difíceis de controlar. Esta atividade resulta numa redução eficaz da carga bacteriana, oferecendo uma abordagem viável em casos onde as terapias convencionais revelam limitações (Cisek et al., 2017; Kortright et al., 2019).

### 3. Produção de Fagos para Uso Clínico

Para que a terapia fágica se estabeleça como uma opção terapêutica viável, é essencial desenvolver métodos que permitam a produção eficiente de fagos desde o nível laboratorial até à produção industrial. O desenvolvimento deste processo deve acompanhar a formulação do cocktail de fagos, de modo a assegurar material apropriado para ensaios clínicos e a definir o método de produção que levará à criação do produto final destinado à comercialização (João et al., 2021).

A etapa inicial envolve o desenvolvimento de um banco de células mestre e de fagos, essencial para a consistência e qualidade do produto final (Tanir et al., 2021). De seguida, no processo *Upstream* são realizadas atividades como a obtenção de estirpes bacterianas produtoras, a criação de bancos de células e fagos, a preparação do inóculo, o cultivo das células e a infeção com o fago (João et al., 2021; Tanir et al., 2021). Na fase seguinte, no processo *Downstream*, implementam-se as operações de purificação, que garantem que os fagos atingem as especificações exigidas de pureza e concentração. Finalmente, os fagos purificados são combinados com veículos ou excipientes específicos, resultando numa formulação terapêutica adequada para aplicação clínica (João et al., 2021; Tanir et al., 2021) (**Figura 4**).



**Figura 4** - Visão geral do processo de produção de fagos. Adaptado de (João et al., 2021).

### 3.1. Desenvolvimento de Bancos de Células e Fagos

Esta fase é fundamental para a produção de bacteriófagos terapêuticos e envolve várias etapas essenciais que garantem que tanto os fagos quanto os seus hospedeiros bacterianos atendem aos rigorosos critérios estabelecidos por agências reguladoras, como a FDA e a EMA (Malik, 2021; Tanir et al., 2021).

Neste contexto, são definidos critérios específicos para a seleção dos fagos, visando a maximização do rendimento e da eficácia terapêutica. A escolha das estirpes de fagos e hospedeiros considera fatores como o tempo de lise, a taxa de infecção e a densidade celular, permitindo ajustes que favoreçam uma produção eficiente e consistente (Tanir et al., 2021).

Um elemento crucial deste desenvolvimento é a confirmação da pureza e identidade dos fagos e hospedeiros, utilizando métodos microbiológicos, moleculares e genéticos para assegurar a ausência de contaminantes, como fagos indesejados ou profagos que possam comprometer a produção (Pelfrene et al., 2019).

A criação de um banco de fagos constitui uma etapa fundamental no processo de produção, uma vez que garante a qualidade e a viabilidade dos fagos ao longo de todo o procedimento. Adicionalmente, permite a quantificação precisa da concentração dos fagos, aspectos que são essenciais para assegurar a segurança e eficácia da produção de fagos (Tanir et al., 2021).

Para assegurar a estabilidade dos fagos ao longo do tempo, é fundamental estabelecer condições de armazenamento adequadas. Embora a refrigeração a 4 °C possa ser suficiente para armazenamento a curto prazo, a congelação a -80 °C é preferida para a manutenção a longo prazo. Em algumas situações, o armazenamento em nitrogénio líquido é utilizado para maximizar a durabilidade dos fagos, embora alguns possam ser sensíveis a estas condições extremas (Golec et al., 2011).

Desta forma, esta etapa fornece uma base sólida para a produção de bacteriófagos eficazes e seguros, garantindo a qualidade e a consistência necessárias nas fases subsequentes de produção e purificação.

### 3.2. Processo *Upstream* na Produção de Fagos

O processo *Upstream* na produção de fagos terapêuticos representa uma etapa fundamental, na qual ocorre o cultivo das células hospedeiras e a subsequente replicação

dos bacteriófagos sob condições rigorosamente controladas, com o objetivo de se obter partículas fágicas de elevada qualidade para aplicações clínicas (João et al., 2021).

Este processo inicia-se com a seleção de uma estirpe bacteriana específica, compatível com o fago a ser produzido. Cada fago possui um espectro restrito de hospedeiros, o que torna a escolha da estirpe bacteriana determinante para assegurar uma replicação eficiente e uma produção consistente em larga escala (Tanir et al., 2021).

A produção de fagos terapêuticos começa com o cultivo das células hospedeiras em biorreatores assépticos, onde ocorre o crescimento bacteriano sob condições controladas e rigorosamente monitorizadas (Malik, 2021). Nestes biorreatores, variáveis como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e concentração de nutrientes são ajustadas com precisão, promovendo um crescimento bacteriano robusto. Estes parâmetros são monitorizados de forma contínua por sensores avançados, permitindo ajustes em tempo real que garantem condições ótimas para a replicação dos fagos, minimizando o risco de contaminação e assegurando a consistência entre lotes (João et al., 2021; Tanir et al., 2021).

Após o cultivo e atingida a densidade celular ideal, os fagos são introduzidos no biorreator, onde infetam as células hospedeiras e iniciam o ciclo infeccioso. Este processo culmina na lise celular, libertando uma elevada concentração de novos fagos no meio de cultura (João et al., 2021).

Para garantir a reprodutibilidade e a consistência de cada lote, em conformidade com as Boas Práticas de Fabrico, cada lote de fagos deve ser derivado de uma fonte homogênea de células e de fagos. Este procedimento implica um controlo rigoroso dos stocks da estirpe hospedeira e do fago, os quais são devidamente caracterizados e armazenados, a fim de minimizar variações entre lotes e assegurar a continuidade do processo (Malik, 2021).

A eficiência do processo *Upstream* é influenciada por parâmetros críticos, tais como a constante de adsorção (taxa de ligação do fago à célula bacteriana), o tempo de latência (intervalo entre a infeção e a lise celular) e o tamanho do *burst* (número de partículas de fagos libertadas por célula após a lise) (Nabergoj et al., 2018; Podgornik et al., 2015). O equilíbrio entre estes fatores é essencial para maximizar a produção de partículas de fagos, otimizando, simultaneamente, os custos e o tempo de processamento. Adicionalmente, variáveis como a multiplicidade de infeção, a concentração inicial de bactérias, o momento ideal da infeção e, no caso de produção contínua, a taxa de diluição, devem ser ajustadas para otimizar a produtividade do processo (João et al., 2021).

No final do processo, obtém-se uma solução contendo partículas de fagos misturadas com resíduos bacterianos, pronta para ser submetida ao processo *Downstream*, onde será purificada e formulada para uso terapêutico (Malik, 2021). A qualidade e a consistência alcançadas no *Upstream* são determinantes para o sucesso das etapas subsequentes, assegurando que o produto final possua os níveis de pureza e atividade biológica exigidos para garantir a eficácia e segurança do tratamento (Tanir et al., 2021).

### **3.3. Processo *Downstream* na Produção de Fagos**

O processo de *Downstream* na produção de fagos começa com a clarificação do meio de cultura, uma etapa essencial para remover células e detritos de maior dimensão, preparando a solução para as fases seguintes de purificação (Malik, 2021). Este passo é geralmente realizado através de centrifugação ou microfiltração, assegurando que a solução atinge um nível de pureza adequado para as etapas subsequentes (João et al., 2021; Malik, 2021).

Seguidamente, a solução é submetida a um processo de concentração, tipicamente realizado por ultrafiltração ou por filtração de fluxo tangencial, com o objetivo de reduzir o volume da solução e aumentar a concentração de fagos. Esta etapa também permite o ajuste das condições da preparação para a fase final de purificação (Tanir et al., 2021).

Durante a fase de purificação, utilizam-se técnicas específicas, como sistemas de duas fases aquosas e cromatografia, para remover contaminantes residuais, incluindo ADN, ARN e proteínas da célula hospedeira, melhorando assim a pureza do produto final (João et al., 2021). Consoante os requisitos de pureza, podem ser acrescentadas etapas adicionais de polimento, como a cromatografia de exclusão molecular, para garantir a remoção de endotoxinas e outras impurezas de menor dimensão (João et al., 2021).

O resultado do processo *Downstream* é um produto fágico, pronto para a fase de formulação e armazenamento, que garante a viabilidade e a eficácia dos fagos no combate a infeções bacterianas (Malik, 2021).

### **3.4. Preparação final na Produção de Fagos**

Por fim, os fagos purificados são submetidos a uma última etapa de esterilização, tipicamente realizada por filtração, para assegurar a eliminação de contaminantes

microbiológicos, garantindo que estejam em condições adequadas para armazenamento e uso terapêutico (João et al., 2021).

Após a esterilização, os fagos são formulados com veículos ou excipientes específicos, cuja função é preservar a estabilidade e manter as propriedades terapêuticas dos fagos durante o armazenamento e a administração clínica (Tanir et al., 2021). Entre os excipientes, destacam-se o glicerol e a trealose, que preservam a integridade estrutural dos vírus durante processos de secagem, como a liofilização. Adicionalmente, a encapsulação em polímeros, como o alginato, ou em lipossomas é utilizada para proteger os fagos de condições adversas, como o pH ácido do trato gastrointestinal, aumentando a sua viabilidade e permitindo uma libertação controlada, o que potencia a eficácia terapêutica (Souza et al., 2021).

A formulação final é ajustada à via de administração, com soluções líquidas para injeções e infusões, formas sólidas, como comprimidos e pós, para uso oral e inalável, e semissólidos, como cremes e géis, para aplicação tópica. Cada forma farmacêutica é elaborada para maximizar a eficácia terapêutica e a estabilidade, com excipientes e métodos de encapsulação cuidadosamente selecionados que preservam a infeciosidade dos fagos e otimizam a sua biodisponibilidade no local de infeção (Souza et al., 2021).

Desta forma, obtém-se um fago preparado para aplicação terapêutica, formulado para garantir estabilidade, atividade biológica e segurança nas condições de armazenamento e administração clínica.

#### **4. Vantagens da Terapia Fágica**

A terapia fágica apresenta várias vantagens em relação à terapêutica antibiótica. Entre as principais, destaca-se a elevada especificidade dos fagos. A terapia fágica recorre à seleção de fagos capazes de atacar especificamente certas espécies ou estirpes bacterianas patogénicas, evitando assim o impacto negativo no microbioma, não afetando as bactérias potencialmente benéficas (Principi et al., 2019). Além disso, há fagos que demonstram eficácia comprovada contra biofilmes bacterianos e bactérias multirresistentes, áreas onde os antibióticos frequentemente falham (Parasion et al., 2014).

Outro aspeto relevante é a capacidade dos fagos de se replicarem diretamente no local da infeção, bem como a sua habilidade de coevoluir com as bactérias. Por fim, uma das grandes vantagens da terapia fágica, em comparação com a terapia antibiótica, é a

descoberta contínua de novos bacteriófagos, facilitada pela vasta biodiversidade de fagos presentes na natureza (Kortright et al., 2019). Esta terapia também se destaca com um processo de produção relativamente rápido e barato, em comparação com o desenvolvimento de novos antibióticos (Nikolich & Filippov, 2020).

#### **4.1. Elevada Especificidade dos Fagos em Relação ao Hospedeiro Bacteriano**

Enquanto os antibióticos de amplo espectro afetam tanto bactérias patogênicas como benéficas, desequilibrando o microbioma do hospedeiro, os bacteriófagos atuam de forma altamente direcionada (Cui et al., 2024). Cada fago é capaz de infectar apenas uma espécie bacteriana específica ou, por vezes, uma única estirpe dentro dessa espécie, dependendo da presença de recetores bacterianos (Hyman & Abedon, 2010). Esta característica permite que a terapia fágica elimine eficazmente os patógenos alvo, minimizando ao mesmo tempo os efeitos colaterais associados ao tratamento de infecções bacterianas e prevenindo o surgimento de infecções oportunistas, como as causadas por *Clostridioides difficile* ou *Candida albicans*, que são comuns após o uso prolongado de antibióticos (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

Além disso, reduz também a probabilidade de desenvolvimento e disseminação de resistência, uma vez que a resistência aos fagos é geralmente limitada à espécie bacteriana infectada e não se propaga facilmente entre diferentes bactérias, ao contrário do que acontece com a resistência aos antibióticos (Hyman & Abedon, 2010).

#### **4.2. Eficácia Contra Bactérias Multirresistentes**

A capacidade dos bacteriófagos de infectar exclusivamente espécies bacterianas específicas limita o seu alcance apenas às bactérias-alvo, protegendo aquelas que estão geneticamente distantes das hospedeiras (Hyman & Abedon, 2010). Como consequência, a propagação de genes de resistência por mecanismos de transferência genética horizontal, um dos principais processos envolvidos na disseminação da resistência a antibióticos, é significativamente reduzida (Zhang et al., 2022).

Além disso, devido a essa especificidade, a resistência desenvolvida contra um fago específico tende a permanecer confinada à bactéria-alvo. Isto implica que, mesmo que uma bactéria desenvolva resistência a um fago, essa resistência não se dissemina com a

mesma facilidade que a resistência a antibióticos (Cohan et al., 2020; Hyman & Abedon, 2010).

Atualmente, decorrem diversos estudos clínicos focados no uso de fagos para tratar infecções causadas por bactérias resistentes. Um desses estudos abrangeu 100 casos consecutivos de terapia fágica personalizada, conduzidos em 35 hospitais de 29 cidades, em 12 países, incluindo a Bélgica, França, Alemanha, Reino Unido e Portugal. A investigação envolveu pacientes com infecções difíceis de tratar, muitas delas causadas por bactérias multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outras. Observou-se uma melhoria clínica em 77,2% dos casos, e a erradicação das bactérias-alvo foi atingida em 61,3% das infecções. Além disso, registou-se uma forte sinergia entre a terapia fágica e os antibióticos em 90% dos casos, aumentando a eficácia do tratamento (Pirnay et al., 2024). Estes resultados sublinham o potencial da terapia fágica como uma abordagem promissora e eficaz no tratamento de infecções bacterianas multirresistentes, especialmente quando combinada com terapias antibióticas convencionais (Pires et al., 2020).

### **4.3. Capacidade de Replicação no Local da Infecção – *auto-dosing***

Os bacteriófagos distinguem-se dos antibióticos convencionais pela sua capacidade de se multiplicarem no próprio local da infecção (Adesanya et al., 2020).

A capacidade dos fagos de se multiplicarem autonomamente na presença de bactérias suscetíveis resulta numa amplificação natural da sua quantidade no local da infecção. Este fenómeno, designado de *auto-dosing*, está relacionado com a capacidade de os fagos autorregular a sua dosagem ou replicação dentro do hospedeiro bacteriano, e permite que os fagos aumentem em número à medida que infetam mais bactérias, sem a necessidade de administrações repetidas (Kortright et al., 2019).

Este fenómeno torna a terapia fágica altamente eficaz, ao permitir que a quantidade de fagos seja ajustada automaticamente consoante a necessidade no local da infecção. Ou seja, os fagos replicam-se enquanto houver bactérias suscetíveis, e, uma vez erradicado o patogénico, são eliminados naturalmente do organismo (Cui et al., 2024; Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

Este mecanismo de ação distinto dos fagos não só reduz a necessidade de administrações repetidas, como também permite a utilização de doses iniciais mais baixas quando comparado com os antibióticos. Esta característica confere à terapia fágica uma

vantagem adicional, ao possibilitar um tratamento mais eficaz com menores quantidades de agentes terapêuticos, reduzindo, assim, a exposição farmacológica (Loc-Carrillo & Abedon, 2011; Principi et al., 2019).

#### 4.4. Eficácia Contra Biofilmes Bacterianos

Os biofilmes representam uma das maiores barreiras no tratamento de infecções bacterianas devido à sua estrutura altamente resistente, que impede a ação eficaz dos agentes antimicrobianos (Adesanya et al., 2020). Além disso, o ambiente criado pelo biofilme favorece o desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência, como a redução da taxa de crescimento, a heterogeneidade fisiológica e a ativação de genes específicos que tornam as bactérias mais resistentes ao tratamento, em parte devido à limitação de nutrientes e à comunicação entre células através de *quorum sensing* (Hall & Mah, 2017).

Por definição, um biofilme é uma comunidade organizada de microrganismos que se fixa a superfícies, envolvida numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta por polissacarídeos, proteínas, lípidos e ADN extracelular (Adesanya et al., 2020; Uyttebroek et al., 2021).

Esta matriz não só protege fisicamente as bactérias, como também impede a penetração de agentes antimicrobianos, tornando os biofilmes significativamente mais resistentes em comparação com as bactérias planctónicas (Hall & Mah, 2017).

Estima-se que a formação de biofilmes esteja envolvida em cerca de 65% das infecções microbianas e até 80% das infecções crónicas, o que torna a sua erradicação com antibióticos uma tarefa extremamente difícil, uma vez que são ineficazes na eliminação total das bactérias que estão protegidas pela matriz de EPS (Jamal et al., 2018).

A terapia fágica, por outro lado, oferece uma abordagem promissora para superar essas limitações (Motlagh et al., 2016). Alguns bacteriófagos, além de serem capazes de infetar e destruir bactérias tanto na forma planctónica quanto na forma de biofilme, têm a capacidade de produzir enzimas específicas, como as despolimerases, que degradam diretamente a matriz de EPS. Estas enzimas facilitam a penetração dos fagos no biofilme, expondo as bactérias subjacentes à infecção e, conseqüentemente, à lise (D. Gutiérrez et al., 2015; Harper et al., 2014). Esse mecanismo permite que os fagos superem a barreira física criada pelo biofilme, algo que os antibióticos convencionais não conseguem fazer (Khan et al., 2022).

#### **4.5. Capacidade de Coevolução com as Bactérias**

A coevolução entre fagos e bactérias é um processo dinâmico e complexo, que reflete uma interação adaptativa constante entre os dois. À medida que as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência para evitar a infecção por fagos, os próprios fagos adaptam-se para superar essas defesas, garantindo a sua capacidade de infetar e destruir as bactérias (Ngiam et al., 2024). Este processo é frequentemente descrito como uma competição evolutiva, na qual ambos os organismos ajustam as suas estratégias para manter um equilíbrio entre infecção e resistência (Kortright et al., 2019).

Por exemplo, os fagos, ao longo do tempo, evoluíram para contornar uma vasta gama de defesas bacterianas, como o sistema CRISPR/Cas. Estudos demonstram que os fagos conseguem neutralizar o CRISPR/Cas através de genes específicos que codificam proteínas anti-CRISPR, o que lhes permite continuar a infetar bactérias mesmo quando este sistema está ativo (Uribe et al., 2019).

Ao mesmo tempo, a evolução das bactérias para resistir aos fagos pode implicar custos biológicos. Por exemplo, as alterações nas estruturas de superfície das bactérias, com o objetivo de as tornar menos suscetíveis aos fagos, podem também comprometer a sua capacidade de sobreviver em outros contextos, tornando-as menos virulentas ou mais vulneráveis a antibióticos (Venturini et al., 2022).

Como tal, ao contrário dos antibióticos, que não têm a capacidade de evoluir para enfrentar novas resistências, os fagos conseguem adaptar-se e evoluir em resposta às mudanças nas bactérias (Adesanya et al., 2020).

Por isso, a terapia fágica apresenta-se como uma abordagem eficaz para o tratamento de infecções bacterianas, ajustando-se constantemente às defesas desenvolvidas pelas bactérias (Anastassopoulou et al., 2024).

#### **4.6. Relação Custo-Efetividade Promissora**

A procura de novos bacteriófagos é facilitada em ambientes com elevada concentração bacteriana, como águas residuais e resíduos orgânicos. Este vasto reservatório natural permite a identificação de novos fagos de forma frequente e a baixo custo (Aghaee et al., 2021; Balleste et al., 2022). Contudo, algumas bactérias podem não ser facilmente cultiváveis ou apresentar um elevado nível de patogenicidade, o que

dificulta o seu manuseamento em ambiente laboratorial e exige métodos mais avançados para o seu isolamento (Hyman, 2019).

Comparativamente ao desenvolvimento de antibióticos, um processo que tem estagnado e envolve custos elevados, a descoberta e caracterização dos fagos continua a ser mais eficiente e acessível (Fair & Tor, 2014; Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

A produção de bacteriófagos envolve diferentes fases, onde a cultura das bactérias hospedeiras e a purificação dos fagos são cruciais. O custo dessa produção pode variar dependendo da espécie bacteriana envolvida. No entanto, graças aos avanços tecnológicos nas técnicas de purificação, os custos têm vindo a diminuir, tornando o processo de produção mais eficiente e acessível (Mishra et al., 2024).

## **5. Desafios e Limitações da Terapia Fágica e Potenciais Estratégias de Resolução**

A terapia fágica, apesar de apresentar um grande potencial no tratamento de infeções bacterianas, sobretudo em casos de resistência aos antibióticos, enfrenta desafios importantes (Anyaegbunam et al., 2022).

A especificidade dos fagos, embora vantajosa, pode ser também uma limitação, pois requer a seleção e isolamento do fago apropriado para cada infeção. Além disso, as bactérias podem desenvolver resistência aos fagos, complicando o tratamento a longo prazo (Fabijan et al., 2023).

Outro desafio reside nas possíveis respostas imunológicas, uma vez que o sistema imunitário humano pode atacar os fagos, reduzindo a sua eficácia. A falta de regulamentação adequada e as dificuldades na produção e armazenamento de fagos também constituem barreiras adicionais (Lin et al., 2022).

No entanto, com o progresso científico e o aumento das investigações, muitas destas limitações poderão ser superadas, abrindo caminho para uma aplicação mais generalizada desta terapia (Lou et al., 2023).

### **5.1. Especificidade Limitada dos Fagos**

A especificidade dos bacteriófagos pode limitar o seu espectro de ação, uma vez que cada tipo de fago é eficaz apenas contra determinadas espécies bacterianas. Isto significa

que, isoladamente, os fagos não conseguem eliminar todas as variantes patogênicas existentes dentro de uma única espécie bacteriana (Kapoor et al., 2024).

Os bacteriófagos são eficazes em infecções causadas por uma única bactéria específica. No entanto, na prática clínica, é comum enfrentar infecções com múltiplas bactérias, o que limita a eficácia dos fagos isolados, já que não conseguem atingir todas as bactérias presentes (Lin et al., 2022). Como tal, é necessário identificar com precisão o agente patogênico antes de começar o tratamento, o que pode atrasar o início da terapia. Somente após identificar a estirpe bacteriana específica é possível escolher o fago adequado, após verificação e confirmação de que ele é eficaz contra o patogênico identificado (Kapoor et al., 2024).

Existem várias abordagens que se têm revelado eficazes na superação desta limitação dos bacteriófagos, tais como a utilização de cocktails de fagos, a criação de bibliotecas de fagos e a realização de rastreios extensivos (Lin et al., 2022).

O uso de cocktails de fagos destaca-se como uma abordagem essencial, onde diferentes bacteriófagos com características que se complementam são combinados (Nobrega et al., 2015). Isto permite atingir uma gama mais vasta de estirpes bacterianas, aumentar a eficácia do tratamento fágico e reduz também o risco de surgimento de resistência, uma vez que diferentes fagos podem atacar a mesma bactéria utilizando mecanismos distintos (Wandro et al., 2022).

Além disso, podem ser ajustados para se adaptarem a casos específicos, selecionando fagos de espectro restrito capazes de infetar a mesma bactéria através de diferentes recetores, ou optando por fagos de amplo espectro, que incluem diversos fagos com diferentes espectros de hospedeiro, facilitando assim o tratamento de infecções causadas por múltiplas espécies bacterianas (Chung et al., 2023).

Outra estratégia passa pela criação de bibliotecas de fagos, que consistem em coleções organizadas de bacteriófagos previamente isolados e caracterizados. Estas bibliotecas permitem selecionar rapidamente fagos que sejam eficazes contra bactérias recém-isoladas, agilizando o processo terapêutico (Gibson et al., 2019).

Além disso, os rastreios extensivos contribuem de forma significativa para identificar bacteriófagos que consigam atacar diferentes patogênicos. Este processo envolve a testagem de múltiplos hospedeiros bacterianos, permitindo descobrir fagos que utilizem recetores de superfície comuns em várias bactérias, tornando-os mais versáteis na sua aplicação clínica (Jia et al., 2023; Lin et al., 2022).

Paralelamente, a engenharia genética surge como uma solução inovadora para expandir o espectro de ação dos fagos. Através da modificação de proteínas específicas envolvidas na ligação ao hospedeiro, é possível alterar o comportamento de um único fago, permitindo-lhe reconhecer e infetar uma gama mais ampla de bactérias (Lenneman et al., 2021).

## **5.2. Desenvolvimento de Resistência das Bactérias à Ação dos Fagos**

Para se defenderem da ameaça constante dos bacteriófagos, as bactérias desenvolveram uma variedade de mecanismos de defesa destinados a bloquear, neutralizar ou eliminar o fago antes que ele complete o seu ciclo de vida e consiga replicar-se dentro da célula bacteriana (Lin et al., 2022).

Estes mecanismos de defesa incluem a inibição da adsorção dos fagos através de alterações nos recetores bacterianos, bloqueios na injeção de ADN do fago, sistemas de modificação de restrição que destroem o ADN invasor, sistema de exclusão de superinfecção que impede que a célula infetada seja alvo de uma segunda infecção por fagos semelhantes e até mecanismos mais sofisticados, como o sistema CRISPR-Cas, que confere imunidade adaptativa (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Lin et al., 2022; Xiong et al., 2020).

O sistema CRISPR/Cas funciona como uma memória imunológica adaptativa. Quando um fago infecta a bactéria, fragmentos do seu ADN são incorporados no genoma bacteriano, permitindo que a bactéria reconheça e destrua futuros ataques semelhantes, utilizando enzimas Cas para degradar o ADN invasor (Łobocka et al., 2021).

No entanto, este sistema é altamente específico para cada estirpe ou espécie bacteriana, o que limita a disseminação da resistência aos fagos, tornando-a menos comum e um desafio menor em comparação com a resistência aos antibióticos (Cohan et al., 2020).

Outro exemplo de estratégia de resistência das bactérias aos fagos é o sistema de defesa de infecção abortiva, em que quer a bactéria infetada quer o fago acabam por ser eliminados, interrompendo a replicação viral (Lin et al., 2022).

## **5.3. Resposta Imunológica e Interações com o Hospedeiro**

Apesar dos avanços na investigação sobre a interação dos fagos com o sistema imunitário, ainda existem muitas incógnitas sobre os mecanismos específicos que

determinam como estes vírus interagem com as células imunitárias (Anyaeibunam et al., 2022).

Um dos maiores desafios é evitar que o sistema imunitário elimine rapidamente os fagos após administração, garantindo que possam atuar de forma eficaz sem desencadear uma resposta imunitária generalizada (Anyaeibunam et al., 2022).

A resposta do sistema imunitário aos fagos pode variar consoante o local da infecção e a via de administração escolhida (Reyes et al., 2012). A administração oral de fagos e a aplicação tópica têm-se revelado seguras, sem provocar reações imunológicas adversas significativas. No entanto, a administração intravenosa de fagos pode ativar tanto a resposta imunitária inata como a adaptativa, já que estes vírus não são naturalmente encontrados na corrente sanguínea (Nilsson, 2014).

Neutrófilos e granulócitos, componentes essenciais da imunidade inata, reconhecem rapidamente os fagos como elementos estranhos devido à diversidade de péptidos de superfície entre estirpes, desencadeando a sua eliminação, muitas vezes através da fagocitose no fígado e no sangue (Krut & Bekeredjian-Ding, 2018; Nilsson, 2014).

O mecanismo de defesa adaptativo inclui a identificação dos fagos como elementos estranhos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Este reconhecimento ativa as células T, que subsequentemente estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos específicos. Estes anticorpos neutralizam os fagos, comprometendo a sua eficácia terapêutica ao eliminá-los antes que possam atingir o seu alvo (Aghebati-Maleki et al., 2016).

Para evitar a neutralização dos fagos por anticorpos, um estudo recente propôs o uso de lipossomas como veículos de entrega. Estes lipossomas, encapsulam os fagos, facilitando a sua absorção pelas células infetadas, enquanto impedem a interação direta com os anticorpos específicos, prevenindo a sua inativação (Singla et al., 2016).

Adicionalmente, tem-se explorado a possibilidade de eliminar geneticamente os genes que codificam proteínas imunogénicas nos fagos, como uma forma eficaz de garantir a continuidade dos tratamentos, tornando-os menos suscetíveis à deteção pelo sistema imunitário do hospedeiro. Esta abordagem visa reduzir a resposta imunológica ao alterar os componentes específicos dos fagos que desencadeiam a produção de anticorpos (Chen et al., 2019).

A utilização de técnicas como a PEGilação permite melhorar a estabilidade dos fagos no organismo, ligando moléculas de polietilenoglicol às suas proteínas. Esta modificação não só aumenta a solubilidade dos fagos, como também prolonga o seu

tempo de permanência no corpo, o que aumenta a eficácia terapêutica dos tratamentos baseados em fagos (Santhanakrishnan et al., 2024).

#### **5.4. Desafios Regulamentares e Éticos na Implementação da Terapia Fágica**

A implementação da terapia com bacteriófagos enfrenta desafios regulamentares e éticos significativos, principalmente devido à ausência de um quadro regulamentar que considere as especificidades inerentes a este tipo de tratamento. Essa falta de diretrizes padronizadas para a aprovação e monitorização de fagos constitui um obstáculo ao seu desenvolvimento e à sua aplicação clínica (Anomaly, 2020).

A complexidade dos bacteriófagos, não sendo moléculas, mas sim entidades que se replicam no interior das bactérias hospedeiras, dificulta o estudo da farmacocinética e farmacodinâmica em comparação com os antibióticos convencionais. Essa singularidade dificulta a previsão do comportamento e da eficácia dos fagos no organismo (Cui et al., 2024).

Atualmente, as normas estabelecidas por entidades reguladoras, como a *European Medicines Agency* (EMA) e a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), impõem requisitos rigorosos para a aprovação comercial de produtos fágicos, exigindo dados clínicos robustos que comprovem tanto a eficácia quanto a segurança dos tratamentos com fagos (Fauconnier, 2019). Ao classificar os fagos como substâncias biológicas, essas entidades sujeitam-nos aos mesmos padrões legais aplicáveis aos produtos farmacêuticos, o que representa um obstáculo à sua aprovação comercial (Pelfrene et al., 2016; Reindel & Fiore, 2017).

Os dilemas éticos associados à terapia fágica incluem o uso de fagos geneticamente modificados e a potencial transferência horizontal de genes (Anomaly, 2020). A aplicação de fagos como última linha de tratamento, especialmente em casos de infecções multirresistentes, destaca a necessidade urgente de estudos clínicos robustos para validar essas abordagens. Ademais, a escassez de estudos *in vivo* que comprovem a eficácia dos fagos limita a elaboração de diretrizes regulamentares padronizadas, restringindo sua aplicação (Glonti & Pirnay, 2022).

Para superar essas limitações, diversas abordagens estão a ser exploradas com o objetivo de adaptar as normas existentes às características dos bacteriófagos e desenvolver diretrizes que facilitem sua integração nos cuidados de saúde (Lin et al., 2022).

Exemplos de estratégias incluem a alteração genética dos fagos, a criação de fagos completamente sintéticos ou o desenvolvimento de cocktails de fagos que possam ser patenteados (Barbu et al., 2016). Além disso, outras iniciativas para estimular a investigação passam por incentivos financeiros diretos ou por extensões de patentes de medicamentos rentáveis, concedidas a empresas que desenvolvam terapias de elevado valor social, mas que envolvam custos substanciais (Anomaly, 2020).

A harmonização internacional de normas regulamentares é uma solução essencial para superar as disparidades entre diferentes regiões e facilitar a aceitação da terapia fágica a nível global. Colaborações entre agências reguladoras, como a EMA e a FDA, poderiam resultar em diretrizes unificadas que respeitem a complexidade dos bacteriófagos e proporcionem uma base sólida para a aprovação clínica a nível internacional (Cui et al., 2024).

Por fim, a adaptação dos ensaios clínicos à natureza singular dos bacteriófagos é fundamental, para que os dados obtidos sejam robustos e correspondam aos padrões exigidos pelas agências reguladoras (Cui et al., 2024). Esta adaptação visa fortalecer a confiança científica e clínica na terapia fágica, permitindo que esta seja reconhecida como uma alternativa eficaz aos antibióticos tradicionais (Tomas et al., 2018).

## **5.5. Questões de Produção, Controlo de Qualidade e Armazenamento**

A produção de bacteriófagos para aplicações terapêuticas enfrenta um conjunto significativo de desvantagens e desafios. Um dos principais desafios está na necessidade de replicar bacteriófagos em células hospedeiras específicas, o que requer o cultivo das bactérias em condições rigorosamente controladas devido à sua natureza biológica (García et al., 2019).

Um fator crítico é a necessidade de um controlo genético rigoroso, uma vez que mutações espontâneas podem comprometer a integridade funcional e genética dos fagos, impactando negativamente a sua eficácia terapêutica (Pires et al., 2020). Portanto, é necessária uma monitorização constante para garantir a consistência terapêutica dos fagos ao longo do processo de produção e durante o armazenamento (Bosco et al., 2023).

Devido à sua estrutura proteica, os bacteriófagos apresentam elevada sensibilidade a condições ambientais adversas. Fatores como temperaturas extremas, exposição a solventes orgânicos, variações de pH e elevadas concentrações de iões podem causar desnaturação, alterações conformacionais e agregação proteica, comprometendo a

estabilidade e a funcionalidade terapêutica dos fagos (Malik et al., 2017; Rosner & Clark, 2021). Esses riscos podem também ser exacerbados por tensões mecânicas que surgem durante processos de formulação e encapsulação, frequentemente necessários para a administração clínica dos fagos (Malik et al., 2017).

A transição do processo de produção para uma escala industrial introduz novos desafios, uma vez que os parâmetros de produção otimizados em laboratório nem sempre são aplicados a volumes maiores. A produção em larga escala exige ajustes precisos para garantir a eficácia dos fagos, assegurando que os métodos utilizados em laboratório se adaptem às exigências de uma produção massiva e padronizada (García et al., 2019).

Adicionalmente, as Boas Práticas de Fabricação requerem que qualquer produto de fagos destinado à produção industrial obtenha uma autorização formal que comprove a sua segurança, eficácia e qualidade (Yang et al., 2023).

Para que os produtos derivados de fagos cumpram os requisitos, é essencial que as bactérias utilizadas na produção estejam livres de genes de resistência a antibióticos ou de qualquer tipo de profagos. A presença de contaminantes como endotoxinas ou reagentes residuais compromete a qualidade final do produto, sendo crucial garantir a pureza, esterilidade e capacidade lítica dos fagos para assegurar um perfil terapêutico eficaz (Pelfrene et al., 2019).

Embora esses requisitos sejam adequados para a produção de cocktails de fagos padronizados e produzidos em grande escala, a variabilidade na composição dos cocktails personalizados dificulta a padronização e representa desafios consideráveis para assegurar a segurança, eficácia e qualidade consistentes do produto final (Pires et al., 2020).

Finalmente, para prolongar a viabilidade e estabilidade dos bacteriófagos, várias estratégias podem ser implementadas, incluindo a liofilização, a secagem por pulverização, bem como técnicas de emulsão, polimerização e encapsulação em matrizes protetoras (Rosner & Clark, 2021). A encapsulação, em particular, destaca-se pela capacidade de proteger os fagos contra condições adversas de armazenamento, sendo essencial escolher a técnica adequada com base nas características específicas da formulação, de modo a garantir que a estabilidade e eficácia terapêutica dos fagos se mantenham intactas ao longo do período de armazenamento (Dąbrowska, 2019).

## **6. Da Validação Científica à Aplicação Clínica da Terapia Fágica**

Nos últimos anos, casos clínicos bem-sucedidos têm reforçado o interesse pela terapia fágica como alternativa eficaz para tratar infecções bacterianas resistentes, destacando o uso dos bacteriófagos em situações onde os tratamentos convencionais são ineficazes (Fabijan et al., 2023).

O recente crescimento da terapia fágica tem sido substancialmente impulsionado pela intervenção de autoridades reguladoras que se têm empenhado em estabelecer diretrizes rigorosas que assegurem uma utilização clínica segura e eficiente dos bacteriófagos (Karn et al., 2023). Em 2019, a FDA apresentou um conjunto preliminar de diretrizes com orientações específicas para o desenvolvimento de produtos de bacteriófagos, visando padronizar e facilitar a realização de ensaios clínicos. Este documento estabelece as orientações fundamentais para apoiar a investigação e aplicação clínica, garantindo a segurança e eficácia dos produtos desenvolvidos à base de bacteriófagos (Karn et al., 2023).

A validação de terapias experimentais tem impulsionado a investigação nesta área, promovendo a publicação de estudos clínicos que procuram demonstrar a eficácia e a segurança dos bacteriófagos no tratamento de infecções onde as opções convencionais falham (Fabijan et al., 2023).

Um exemplo notável é o caso de Tom Patterson, documentado como o primeiro paciente americano tratado com recurso a fagos administrados por via intravenosa para combater uma infecção sistêmica causada por *A. baumannii*, uma bactéria multirresistente (Barron, 2022; Finder et al., 2022). Em 2015, durante uma viagem, Patterson começou a apresentar sintomas graves, incluindo febre, dor abdominal intensa, náuseas, vômitos e taquicardia, evoluindo rapidamente para um quadro de pancreatite causada por cálculos biliares (LaFee & Buschman, 2017). Esta inflamação pancreática levou à formação de um pseudocisto, que logo se complicou com uma infecção por *A. baumannii* resistente a cefalosporinas, meropenem, gentamicina, amicacina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, ciprofloxacina e colistina (Schooley et al., 2017). Contudo, testes de suscetibilidade evidenciaram uma sinergia entre colistina e azitromicina, justificando o início do tratamento combinado, ao qual foi posteriormente adicionada rifampicina, após demonstrar sinergia adicional em análises *in vitro*. Apesar dessas intervenções, a infecção persistiu, e o estado clínico de Patterson deteriorou-se progressivamente (Schooley et al., 2017). Patterson desenvolveu falência respiratória e hipotensão, necessitando de

ventilação mecânica e suporte com fármacos vasopressores. No 108º dia após a infecção, o paciente entrou em coma, com insuficiência renal avançada e níveis de creatinina elevados, sem alternativas terapêuticas restantes (LaFee & Buschman, 2017; Schooley et al., 2017).

Perante este cenário crítico, foi submetido um pedido de uso de Novo Medicamento Investigacional de Emergência para Paciente Único (EIND) à FDA, tendo a equipa médica obtido autorização para a administração de bacteriófagos como último recurso terapêutico para combater a infecção (LaFee & Buschman, 2017; Schooley et al., 2017).

Dos 200 bacteriófagos recolhidos, 98 apresentaram potencial lítico contra o isolado de *A. baumannii*, e quatro foram selecionados para o cocktail inicial  $\Phi$ PC (AC4, C1P12, C2P21 e C2P24), administrado no 109º dia diretamente nas cavidades intra-abdominais, incluindo o pseudocisto pancreático. Devido à disseminação da infecção, foi necessário um segundo cocktail,  $\Phi$ IV, contendo quatro bacteriófagos adicionais (AB-Navy1, AB-Navy4, AB-Navy71 e AB-Navy97), que foi administrado por via intravenosa (Schooley et al., 2017).

Apenas 48 horas após o início da administração intravenosa, o estado de saúde do paciente começou a melhorar, houve uma estabilização da pressão arterial, permitindo reduzir os vasopressores, e Patterson recuperou a consciência, conseguindo interagir com a família (LaFee & Buschman, 2017; Schooley et al., 2017).

Cinco dias após o início da terapia com bacteriófagos, uma nova amostra de *A. baumannii* revelou sensibilidade à minociclina, que foi adicionada ao tratamento, resultando numa combinação eficaz que retardou o desenvolvimento de resistências e promoveu uma recuperação contínua. Contudo, oito dias depois, surgiu uma estirpe resistente (TP3), o que exigiu um terceiro cocktail de bacteriófagos ( $\Phi$ IVB), combinando um novo bacteriófago (AbTP3 $\phi$ 1) com um dos bacteriófagos originais (AB-Navy71). Esta nova combinação superou a resistência, permitindo a continuidade eficaz do tratamento (Schooley et al., 2017).

Para garantir a segurança do paciente, cada preparação de bacteriófagos foi cuidadosamente controlada para evitar altos níveis de endotoxinas, que poderiam causar reações adversas graves (LaFee & Buschman, 2017).

Ao final de 59 dias de tratamento com bacteriófagos, Patterson apresentou uma recuperação estável. Gradualmente, foi retirado do ventilador, e os vasopressores foram descontinuados, com a função renal a mostrar sinais de melhoria. No 245º dia após a

infecção inicial, Patterson recebeu alta hospitalar e conseguiu retomar suas atividades diárias (Schooley et al., 2017).

Este caso tornou-se uma referência na terapia fágica e não só demonstrou o potencial dos bacteriófagos como uma alternativa viável para infecções multirresistentes, especialmente quando combinados com antibióticos, como também evidenciou a importância de um tratamento personalizado, onde o ajuste contínuo dos cocktails de bacteriófagos em resposta às resistências emergentes se mostrou fundamental para o sucesso clínico (Barron, 2022; Finder et al., 2022).

A eficácia dos bacteriófagos no tratamento de infecções de difícil resolução tem sido corroborada por diversos estudos clínicos, que demonstram o seu sucesso em diversos contextos como infecções de pele e tecidos moles (Ghanaim et al., 2022), infecções respiratórias (Hahn et al., 2023; Ng et al., 2021), infecções urinárias (Al-Anany et al., 2023), infecções osteoarticulares (Onsea et al., 2019), infecções gastrointestinais (Gutiérrez & Domingo-Calap, 2020) e infecções cardíacas (Chan et al., 2018), entre outros.

A capacidade dos bacteriófagos de penetrar o biofilme bacteriano é particularmente vantajosa, permitindo uma eliminação eficaz de infecções persistentes que os antibióticos, quando utilizados isoladamente, frequentemente não conseguem erradicar por completo (Narayanan et al., 2024).

Nos casos de infecções respiratórias graves, a administração de fagos diretamente nas vias respiratórias, seja por inalação, nebulização ou administração endotraqueal, tem demonstrado potencial para controlar infecções multirresistentes e melhorar os desfechos clínicos, especialmente em pacientes com condições respiratórias crônicas (Fowoyo, 2024).

A terapia fágica tem também demonstrado eficácia no tratamento de infecções urinárias ao direcionar-se especificamente para biofilmes bacterianos e patógenos multirresistentes, prevalentes em infecções recorrentes e associadas ao uso de cateteres (Chegini et al., 2021). A sua seletividade permite eliminar bactérias patogênicas sem comprometer a microbiota urinária, oferecendo uma alternativa promissora em casos refratários aos antibióticos convencionais (Zalewska-Piątek & Piątek, 2020).

## 7. Inovações Tecnológicas na Terapia Fágica

### 7.1. Engenharia Genética de Fagos

A engenharia genética de fagos é um campo da bioengenharia que utiliza técnicas avançadas para modificar o genoma dos bacteriófagos, visando aumentar a sua eficácia terapêutica, especificidade, segurança e capacidade de adaptação para enfrentar infecções bacterianas multirresistentes e persistentes (Jia et al., 2023; Pires et al., 2016).

Esta capacidade transformadora permite personalizar os fagos para desempenharem múltiplas funções, modificando o seu material genético para codificar proteínas ou peptídeos de superfície específicos (Kim et al., 2024). Num cenário de crescente resistência aos antibióticos, esta abordagem emergente possibilita ultrapassar as limitações inerentes aos fagos naturais, tais como a elevada especificidade e a gama restrita de hospedeiros (Pires et al., 2016).

Este processo envolve metodologias sofisticadas que permitem a incorporação de genes específicos, a alteração de proteínas estruturais e, em alguns casos, a criação de fagos com genomas completamente sintéticos (Chen et al., 2019). Estes fagos são concebidos para maximizar a eficácia terapêutica e a versatilidade funcional. Os fagos sintéticos podem ser adaptados para infetar estirpes bacterianas específicas, contornar a resistência a tratamentos convencionais e, potencialmente, servir como plataformas para vacinas (Pires et al., 2016).

As metodologias de engenharia genética incluem a recombinação homóloga, que utiliza sequências de ADN semelhantes para substituir ou modificar genes específicos (Piel et al., 2022). O processo baseia-se na homologia, onde sequências nucleotídicas que apresentam similaridade permitem a troca de material genético entre moléculas de ADN, sendo altamente regulado pela enzima helicase do ADN (Barrows et al., 2022). Este método envolve a utilização de um plasmídeo que carrega a sequência desejada, flanqueada por sequências homólogas ao ADN do fago. Quando as sequências homólogas se alinham, ocorre a troca, resultando na modificação do gene-alvo (Hussain et al., 2023).

O BRED (*Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA*) é uma técnica que permite inserir, eliminar e substituir o gene desejado no genoma do fago. Utiliza a eletroporação, que cria poros temporários na membrana celular, permitindo a entrada de fragmentos de ADN. Este método resulta numa elevada taxa de recuperação de fagos

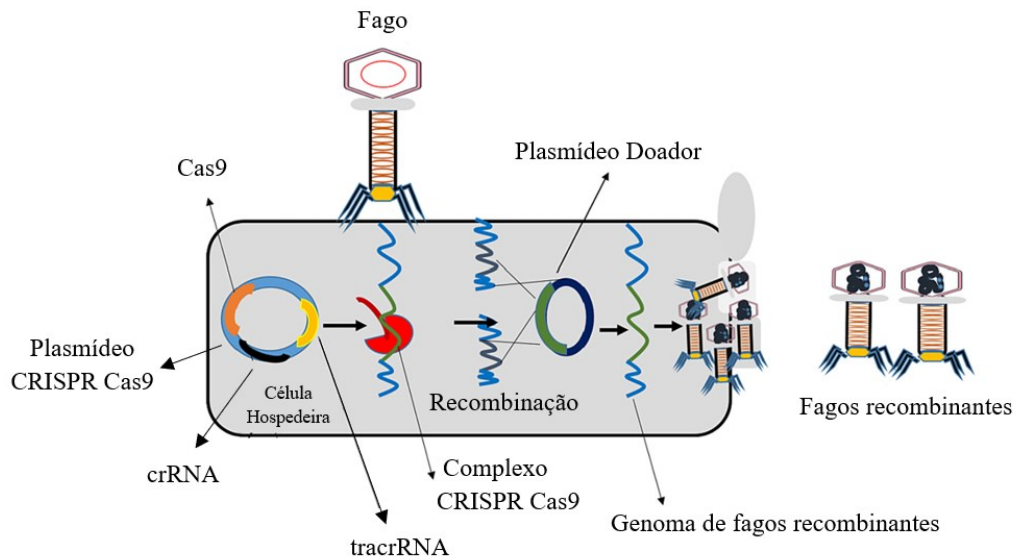
modificados, tornando-o eficaz para a introdução de mutações desejadas (Hussain et al., 2023; Pires et al., 2016).

A técnica *in vivo recombineering* possibilita a modificação genética dos fagos diretamente dentro do hospedeiro bacteriano, utilizando a capacidade natural de recombinação dos fagos. Esta abordagem é vantajosa para fagos que não proliferam bem em culturas convencionais, facilitando a engenharia genética em condições biológicas mais relevantes (Hussain et al., 2023; Pires et al., 2016).

A montagem de genomas inteiros a partir de oligonucleótidos sintéticos envolve a síntese de fragmentos de ADN que são montados para formar um genoma completo do fago. Esta técnica permite a criação de fagos personalizados a partir do zero, possibilitando a exploração de novos perfis funcionais adaptados a aplicações específicas (Hussain et al., 2023; Pires et al., 2016).

A manipulação *in vitro* do genoma do fago permite a alteração do ADN fora de um sistema celular. Esta técnica utiliza reações enzimáticas para cortar e colar segmentos de ADN, possibilitando a criação de fagos com características desejadas de forma controlada e precisa, acelerando o processo de engenharia genética (Hussain et al., 2023).

A tecnologia CRISPR-Cas permite intervenções precisas no ADN dos fagos, possibilitando a remoção de genes que poderiam induzir resistência nas bactérias ou promover o ciclo lisogénico, convertendo-os em fagos exclusivamente líticos (Pires et al., 2016). Originalmente uma defesa imunológica adaptativa das bactérias contra DNA invasor, o sistema CRISPR-Cas foi adaptado para a edição do genoma de fagos (Hryhorowicz et al., 2016; Pires et al., 2016). Esta tecnologia utiliza a enzima Cas9, que, em conjunto com crRNA (CRISPR RNA) e tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA), reconhece e corta uma sequência-alvo no ADN do fago. Este corte resulta na rutura de uma cadeia dupla no ADN, que é posteriormente reparada através da recombinação com um plasmídeo doador, permitindo assim a introdução de alterações genéticas de alta precisão. Deste modo, o CRISPR-Cas não apenas facilita o controlo da funcionalidade dos fagos, como também potencia a sua eficácia enquanto agentes antimicrobianos personalizados (Hryhorowicz et al., 2016). **(Figura 5)**



**Figura 5** - Engenharia genética de fagos através do sistema CRISPR-Cas. Adaptado de (Hussain et al., 2023).

Estas técnicas de engenharia genética aumentam as opções terapêuticas, especialmente num contexto de crescente resistência aos antibióticos, permitindo o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e direcionados.

## 7.2. Nanotecnologia Aplicada à Terapia Fágica

A nanotecnologia tem desempenhado um papel essencial ao ajudar a ultrapassar barreiras farmacológicas associadas à terapia com fagos, tais como a baixa estabilidade, a rápida eliminação pelo sistema imunitário e a dificuldade em atingir locais específicos de infecção (Kaur et al., 2021).

Uma das estratégias mais promissoras é o encapsulamento dos bacteriófagos em nano-transportadores lipídicos, como lipossomas e transfersomas. Estes nano-transportadores formam uma camada lipídica em torno dos fagos, conferindo-lhes proteção contra o ambiente hostil do organismo e prevenindo a sua degradação prematura (Kaur et al., 2021). Além disso, permitem uma libertação controlada, o que garante que os fagos sejam gradualmente disponibilizados no local da infecção, prolongando o seu efeito terapêutico. Dado que a estrutura dos lipossomas se assemelha à das membranas celulares, conseguem entregar os fagos diretamente no alvo, evitando a sua rápida eliminação pelo sistema imunitário (Kaur et al., 2021; Kim et al., 2024). Outra vantagem adicional dos lipossomas é a possibilidade de funcionalização das suas superfícies com

moléculas específicas, o que permite direcionar os fagos para locais de infecção determinados ou para bactérias-alvo específicas, aumentando a precisão do tratamento (Kim et al., 2024).

A técnica de microfluídica representa outra inovação significativa ao permitir a encapsulação dos fagos em partículas de tamanho reduzido através de canais microscópicos, permitindo o controlo preciso sobre o tamanho e a concentração das partículas. Esta precisão assegura que a dose exata de fagos atinja o local da infecção, melhorando a eficácia e a especificidade do tratamento (Mabrouk et al., 2023). Além disso, a microfluídica permite a produção de partículas em escalas muito pequenas e com uma variabilidade mínima no tamanho, garantindo que as propriedades dos fagos encapsulados sejam homogéneas. Esse nível de controlo é particularmente importante em contextos de infeções complexas, onde é necessário ajustar as dosagens para otimizar a resposta terapêutica (Kaur et al., 2021; Mabrouk et al., 2023).

As nanofibras, produzidas por eletrofiação, são especialmente vantajosas para tratar infeções localizadas, como feridas crónicas. Ao serem incorporadas em pensos e aplicadas diretamente sobre a área infetada, permitem uma libertação prolongada e controlada dos fagos, assegurando uma presença terapêutica contínua e eficaz (Kaur et al., 2021). Esta abordagem é particularmente útil para infeções persistentes e de difícil cicatrização, garantindo uma concentração estável de fagos em superfícies expostas e áreas de difícil acesso, promovendo uma cicatrização mais eficiente (Sarhan & Azzazy, 2017). A técnica de nanoemulsões é uma abordagem eficaz para formular cocktails de fagos. Usando microfluídica, estas emulsões criam gotas uniformes que garantem uma distribuição equilibrada dos fagos, facilitando uma atuação coordenada contra infeções com múltiplos agentes bacterianos. Esta técnica é particularmente útil em infeções com várias estirpes resistentes, pois o cocktail de fagos permite uma abordagem ampla, atacando diferentes patógenos simultaneamente (Jia et al., 2023; Kaur et al., 2021). A estrutura homogénea das gotas assegura que todos os fagos atuem de forma coordenada, otimizando a eficácia do tratamento (Kaur et al., 2021).

As plataformas de libertação inteligente são concebidas para responder a estímulos específicos do microambiente infeccioso, como o pH ou a temperatura, promovendo a libertação dos fagos apenas quando necessário (Kaur et al., 2021). Este sistema permite a adaptação da dosagem à progressão da infecção, assegurando a eficácia dos fagos e minimizando a neutralização prematura pelo sistema imunitário. Um exemplo inclui partículas sensíveis ao pH, que respondem à acidez elevada característica dos

biofilmes bacterianos, promovendo a libertação direcionada dos fagos (Abdelsattar et al., 2019; Sarker et al., 2016; Young & Gill, 2015). Estudos preliminares indicam que estas plataformas aumentam a eficácia terapêutica em modelos de infeções crónicas, nos quais o controlo e a precisão da dosagem são cruciais para alcançar resultados significativos (Kaur et al., 2021).

Estes avanços tecnológicos visam aumentar a eficácia da terapia fágica, garantindo que os fagos permaneçam ativos no organismo durante períodos mais longos, penetrem eficazmente em biofilmes bacterianos e estejam protegidos de ataques do sistema imunitário (Kaur et al., 2021; Kim et al., 2024).

Esta sinergia entre nanotecnologia e terapia fágica está a estabelecer as bases para que esta abordagem possa, no futuro, alcançar a aprovação clínica e ser integrada como uma opção de tratamento viável e robusta para infeções bacterianas resistentes.



### **III. CONCLUSÃO**

Esta monografia explorou o potencial da terapia fágica como alternativa ou complemento à terapia antibiótica no combate a infecções bacterianas resistentes, num contexto de emergência global da resistência antimicrobiana.

A limitação crescente das terapias convencionais e o surgimento de infecções refratárias aos antibióticos reforçam a necessidade de abordagens terapêuticas inovadoras, nas quais os bacteriófagos se destacam pelo seu perfil específico de ação contra patógenos, preservando o microbioma do hospedeiro. Essa especificidade permite uma intervenção direcionada, minimizando os efeitos secundários e a pressão seletiva induzida pelos antibióticos de largo espectro.

Os resultados apresentados evidenciam as vantagens dos bacteriófagos no tratamento de infecções complexas, especialmente em contextos nos quais os antibióticos convencionais mostram limitações ou ineficácia. A capacidade dos fagos de eliminar biofilmes bacterianos e de se adaptar a diferentes ambientes de infecção revela o seu potencial terapêutico em situações clínicas desafiantes.

Estes benefícios são amplificados pelos avanços tecnológicos recentes, como a engenharia genética e a nanotecnologia aplicada aos fagos, que aumentam a estabilidade e a eficácia dos fagos, permitindo personalizar as intervenções e garantir maior segurança no uso clínico.

No entanto, a aplicação prática da terapia fágica ainda enfrenta desafios consideráveis. A necessidade de uma seleção rigorosa de fagos específicos para cada infecção e a ausência de regulamentação padronizada para a produção e utilização clínica limitam, por enquanto, a sua implementação a nível internacional.

A revisão da literatura revela, contudo, o potencial dos fagos para atuarem tanto isoladamente quanto em combinação com antibióticos, configurando uma abordagem eficaz e complementar no tratamento de infecções de difícil resolução.

Em síntese, a terapia fágica afirma-se como uma alternativa promissora e um complemento valioso aos antibióticos, com potencial para transformar a gestão das infecções por bactérias resistentes. A sua implementação bem-sucedida depende de um compromisso contínuo com a investigação científica, da criação de regulamentações específicas e do desenvolvimento de protocolos rigorosos que garantam a segurança e eficácia dos tratamentos.

Deste modo, a terapia com bacteriófagos revela-se uma abordagem sustentável e adaptativa, essencial para mitigar o impacto da resistência antimicrobiana e responder às necessidades emergentes de saúde pública de forma eficaz e inovadora.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelsattar, A. S., Abdelrahman, F., Dawoud, A., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A. (2019). Encapsulation of E. coli phage ZCEC5 in chitosan–alginate beads as a delivery system in phage therapy. *AMB Express*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0810-9>
- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02331-17>
- Ackermann, H. W. (2012). Bacteriophage electron microscopy. *Advances in Virus Research*, 82, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00017-0>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M. L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Orton, R. J., Smith, D. B., ... Davison, A. J. (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Archives of Virology*, 162(5), 1441–1446. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3215-y>
- Adesanya, O., Oduselu, T., Akin-Ajani, O., Adewumi, O. M., & Ademowo, O. G. (2020). An exegesis of bacteriophage therapy: An emerging player in the fight against antimicrobial resistance. *AIMS Microbiology*, 6(3), 204. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2020014>
- Adriaenssens, E. M., & Rodney Brister, J. (2017). How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/V9040070>
- Aghae, B. L., Mirzaei, M. K., Alikhani, M. Y., & Mojtahedi, A. (2021). Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 21(1), 132. <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02197-Z>
- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., & Majidi, J. (2016). Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science 2016 23:1*, 23(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12929-016-0285-9>
- Ait Ouakrim, D., Cassini, A., Cecchini, M., & Plachouras, D. (2020). The health and economic burden of antimicrobial resistance. *Challenges to Tackling Antimicrobial Resistance*, 23–44. <https://doi.org/10.1017/9781108864121.003>

- Al-Anany, A. M., Hooey, P. B., Cook, J. D., Burrows, L. L., Martyniuk, J., Hynes, A. P., & German, G. J. (2023). Phage Therapy in the Management of Urinary Tract Infections: A Comprehensive Systematic Review. *PHAGE*, 4(3), 112–127. <https://doi.org/10.1089/PHAGE.2023.0024>
- Alaoui Mdarhri, H., Benmessaoud, R., Yacoubi, H., Seffar, L., Guennouni Assimi, H., Hamam, M., Boussettine, R., Filali-Ansari, N., Lahlou, F. A., Diawara, I., Ennaji, M. M., & Kettani-Halabi, M. (2022). Alternatives Therapeutic Approaches to Conventional Antibiotics: Advantages, Limitations and Potential Application in Medicine. *Antibiotics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11121826>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., & Khoury, M. (2017). Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00339>
- Alexander Fleming Discovery and Development of Penicillin - Landmark - American Chemical Society.* (n.d.). Retrieved September 10, 2024, from <https://www.acs.org/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>
- Anastassopoulou, C., Feros, S., Petsimeri, A., Gioula, G., & Tsakris, A. (2024). Phage-Based Therapy in Combination with Antibiotics: A Promising Alternative against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Pathogens*, 13(10), 896. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13100896>
- Anomaly, J. (2020). The Future of Phage: Ethical Challenges of Using Phage Therapy to Treat Bacterial Infections. *Public Health Ethics*, 13(1), 82–88. <https://doi.org/10.1093/PHE/PHAA003>
- Anyaeibunam, N. J., Anekpo, C. C., Anyaeibunam, Z. K. G., Doowuese, Y., Chinaka, C. B., Odo, O. J., Sharndama, H. C., Okeke, O. P., & Mba, I. E. (2022). The resurgence of phage-based therapy in the era of increasing antibiotic resistance: From research progress to challenges and prospects. *Microbiological Research*, 264, 127155. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127155>
- Aranaga, C., Pantoja, L. D., Martínez, E. A., & Falco, A. (2022). Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS23094577>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z.

- (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 1645. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Balleste, E., Blanch, A. R., Muniesa, M., García-Aljaro, C., Rodríguez-Rubio, L., Martín-Díaz, J., Pascual-Benito, M., & Jofre, J. (2022). Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications. *FEMS Microbes*, *3*. <https://doi.org/10.1093/FEMSMC/XTAC009>
- Barbu, E. M., Cady, K. C., & Hubby, B. (2016). Phage Therapy in the Era of Synthetic Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(10), a023879. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A023879>
- Barron, M. (2022). Phage Therapy: Past, Present and Future. <https://asm.org/articles/2022/august/phage-therapy-past,-present-and-future>
- Barrows, J. K., Lin, B., Quaas, C. E., Fullbright, G., Wallace, E. N., & Long, D. T. (2022). BRD4 promotes resection and homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, *13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30787-6>
- Beavogui, A., Lacroix, A., Wiart, N., Poulain, J., Delmont, T. O., Paoli, L., Wincker, P., & Oliveira, P. H. (2024). The defensome of complex bacterial communities. *Nature Communications*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46489-0>
- Bhargava, K., Nath, G., Bhargava, A., Aseri, G. K., & Jain, N. (2021). Phage therapeutics: from promises to practices and prospectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(24), 9047–9067. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11695-Z>
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, *9*(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.66>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3380>
- Bosco, K., Lynch, S., Sandaradura, I., & Khatami, A. (2023). Therapeutic Phage Monitoring: A Review. *Clinical Infectious Diseases*, *77*(Supplement\_5), S384–S394. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAD497>
- Boto, L., & Martínez, J. L. (2011). Ecological and Temporal Constraints in the Evolution of Bacterial Genomes. *Genes*, *2*(4), 804–828. <https://doi.org/10.3390/GENES2040804>

- Brejyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, *25*(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25061340>
- Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Elefteriades, J. A., & Narayan, D. (2018). Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2018*(1), 60. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOY005>
- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Advances in Virus Research*, *83*, 3–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Vesal, S., Moradabadi, A., Hashemi, A., & Shariati, A. (2021). Bacteriophage therapy for inhibition of multi drug-resistant uropathogenic bacteria: a narrative review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00433-y>
- Chen, Y., Batra, H., Dong, J., Chen, C., Rao, V. B., & Tao, P. (2019). Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 455781. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00954>
- Chung, K. M., Liao, X. L., & Tang, S. S. (2023). Bacteriophages and Their Host Range in Multidrug-Resistant Bacterial Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, *16*(10), 1467. <https://doi.org/10.3390/PH16101467>
- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, *74*(2), 277–283. <https://doi.org/10.1007/S00284-016-1166-X>
- Cohan, F. M., Zandi, M., & Turner, P. E. (2020). Broad-scale phage therapy is unlikely to select for widespread evolution of bacterial resistance to virus infection. *Virus Evolution*, *6*(2). <https://doi.org/10.1093/VE/VEAA060>
- Cui, L., Watanabe, S., Miyana, K., Kiga, K., Sasahara, T., Aiba, Y., Tan, X.-E., Veerananarayanan, S., Thititanapakorn, K., Nguyen, H. M., & Wannigama, D. L. (2024). A Comprehensive Review on Phage Therapy and Phage-Based Drug Development. *Antibiotics*, *13*(9), 870. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13090870>

- Dąbrowska, K. (2019). Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 2000. <https://doi.org/10.1002/MED.21572>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davies, E. V., Winstanley, C., Fothergill, J. L., & James, C. E. (2016). The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS Microbiology Letters*, 363(5). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNW015>
- de Souza, C. M., Tanir, T., Orellana, M., Escalante, A., & Koeris, M. S. (2021). Manufacturing Bacteriophages (Part 2 of 2): Formulation, Analytics and Quality Control Considerations. *Pharmaceuticals*, 14(9), 895. <https://doi.org/10.3390/PH14090895>
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/S41579-019-0311-5>
- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 7(3), 66. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS7030066>
- Durbas, I., & Machnik, G. (2022). Phage therapy: An old concept with new perspectives. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(5), 027–038. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120502>
- El-Shibiny, A., & El-Sahhar, S. (2017). Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(11), 865–879. <https://doi.org/10.1139/CJM-2017-0030>
- Emrich, J., & Richter, C. (2021, December). *The American Association of Immunologists - Bacteria Eaters: The “Twort-d’Hérelle Phenomenon.”* <https://www.aai.org/About/History/History-Articles-Keep-for-Hierarchy/Bacteria-Eaters-The-Twort-d%E2%80%99Herelle-Phenomenon%E2%80%9D#gsc.tab=0>
- Fabijan, A. P., Iredell, J., Danis-Wlodarczyk, K., Kebriaei, R., & Abedon, S. T. (2023). Translating phage therapy into the clinic: Recent accomplishments but continuing challenges. *PLOS Biology*, 21(5), e3002119. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002119>

- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6(6), 25. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>
- Fauconnier, A. (2019). Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/V11040352>
- Finder, C., University of Pittsburgh, & LaFee, S. (2022). Unprecedented Case Series Advances Promise of Phage Therapy. <https://health.ucsd.edu/news/press-releases/2022-06-09-unprecedented-case-series-advances-promise-of-phage-therapy/>
- Fowoyo, P. T. (2024). Phage Therapy: Clinical Applications, Efficacy, and Implementation Hurdles. *The Open Microbiology Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.2174/0118742858281566231221045303>
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage production models: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 10, 448630. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01187>
- Ghanaim, A. M., Foad, M. A., Gomaa, E. Z., Dougdoug, K. A. El, Mohamed, G. E., Arisha, A. H., & Khamis, T. (2022). Bacteriophage therapy as an alternative technique for treatment of multidrug-resistant bacteria causing diabetic foot infection. *International Microbiology*, 26(2), 343. <https://doi.org/10.1007/S10123-022-00293-2>
- Gibson, S. B., Green, S. I., Liu, C. G., Salazar, K. C., Clark, J. R., Terwilliger, A. L., Kaplan, H. B., Maresso, A. W., Trautner, B. W., & Ramig, R. F. (2019). Constructing and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections. *Frontiers in Microbiology*, 10, 474509. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02537>
- Glonti, T., & Pirnay, J. P. (2022). In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/V14071490>
- Golec, P., Dabrowski Kamil, K., Hejnowicz, M. S., Gozdek, A., Łoś, J. M., Wegrzyn, G., Łobocka, M. B., & Łoś, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 486–489. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.01.007>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>

- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2021). Unlocking the next generation of phage therapy: the key is in the receptors. *Current Opinion in Biotechnology*, *68*, 115–123. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.10.002>
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., Sun, C., & Feng, X. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PloS One*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031698>
- Gummalla, V. S., Zhang, Y., Liao, Y. Te, & Wu, V. C. H. (2023). The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity. *Microorganisms*, *11*(3), 541. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11030541>
- Gupta, A., Mumtaz, S., Li, C. H., Hussain, I., & Rotello, V. M. (2019). Combatting Antibiotic-Resistant Bacteria using Nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, *48*(2), 415. <https://doi.org/10.1039/C7CS00748E>
- Gutiérrez, B., & Domingo-Calap, P. (2020). Phage Therapy in Gastrointestinal Diseases. *Microorganisms*, *8*(9), 1420. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091420>
- Gutiérrez, D., Briers, Y., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P. (2015). Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB\_SepiS-phiIPLA7 as an anti-biofilm agent in staphylococcal species. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 167086. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01315>
- Hahn, A., Sami, I., Chaney, H., Koumbourlis, A. C., Del Valle Mojica, C., Cochrane, C., Chan, B. K., & Koff, J. L. (2023). Bacteriophage Therapy for Pan-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Two Persons With Cystic Fibrosis. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, *11*, 23247096231188244. <https://doi.org/10.1177/23247096231188243>
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX010>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, *212–213*, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>

- Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., & Morales, S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS3030270>
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual Review of Medicine*, 73, 197–211. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-080219-122208>
- Hoff, B., Pöggeler, S., & Kück, U. (2008). Eighty Years after Its Discovery, Fleming's Penicillium Strain Discloses the Secret of Its Sex. *Eukaryotic Cell*, 7(3), 465. <https://doi.org/10.1128/EC.00430-07>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2016). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.582779>
- Hussain, W., Yang, X., Ullah, M., Wang, H., Aziz, A., Xu, F., Asif, M., Ullah, M. W., & Wang, S. (2023). Genetic engineering of bacteriophages: Key concepts, strategies, and applications. *Biotechnology Advances*, 64, 108116. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108116>
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.3390/PH12010035>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/J.JCMA.2017.07.012>
- Jia, H. J., Jia, P. P., Yin, S., Bu, L. K., Yang, G., & Pei, D. S. (2023). Engineering bacteriophages for enhanced host range and efficacy: insights from bacteriophage-bacteria interactions. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1172635. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1172635>

- João, J., Lampreia, J., Prazeres, D. M. F., & Azevedo, A. M. (2021). Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, *49*, 107758. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107758>
- Kapoor, A., Mudaliar, S. B., Bhat, V. G., Chakraborty, I., Prasad, A. S. B., & Mazumder, N. (2024). Phage therapy: A novel approach against multidrug-resistant pathogens. *3 Biotech*, *14*(10). <https://doi.org/10.1007/S13205-024-04101-8>
- Karn, S. L., Gangwar, M., Kumar, R., Bhartiya, S. K., & Nath, G. (2023). Phage therapy: a revolutionary shift in the management of bacterial infections, pioneering new horizons in clinical practice, and reimagining the arsenal against microbial pathogens. *Frontiers in Medicine*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FMED.2023.1209782>
- Kaur, S., Kumari, A., Kumari Negi, A., Galav, V., Thakur, S., Agrawal, M., & Sharma, V. (2021). Nanotechnology Based Approaches in Phage Therapy: Overcoming the Pharmacological Barriers. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 699054. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.699054>
- Khan, A., Rao, T. S., & Joshi, H. M. (2022). Phage therapy in the Covid-19 era: Advantages over antibiotics. *Current Research in Microbial Sciences*, *3*, 100115. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2022.100115>
- Kim, S. M., Heo, H. R., Kim, C. S., & Shin, H. H. (2024). Genetically engineered bacteriophages as novel nanomaterials: applications beyond antimicrobial agents. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *12*, 1319830. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2024.1319830>
- Konwar, A. N., Hazarika, S. N., Bharadwaj, P., & Thakur, D. (2022). Emerging Non-Traditional Approaches to Combat Antibiotic Resistance. *Current Microbiology*, *79*(11). <https://doi.org/10.1007/S00284-022-03029-7>
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host & Microbe*, *25*(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.01.014>
- Krupovic, M., Turner, D., Morozova, V., Dyall-Smith, M., Oksanen, H. M., Edwards, R., Dutilh, B. E., Lehman, S. M., Reyes, A., Baquero, D. P., Sullivan, M. B., Uchiyama, J., Nakavuma, J., Barylski, J., Young, M. J., Du, S., Alfenas-Zerbini, P., Kushkina, A., Kropinski, A. M., ... Adriaenssens, E. M. (2021). Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021. *Archives of Virology*, *166*(11), 3239–3244. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05205-9>

- Krut, O., & Bekeredjian-Ding, I. (2018). Contribution of the Immune Response to Phage Therapy. *The Journal of Immunology*, 200(9), 3037–3044. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1701745>
- LaFee, S., & Buschman, H. (2017). Novel Phage Therapy Saves Patient with Multidrug-Resistant Bacterial Infection. [https://today.ucsd.edu/story/novel\\_phage\\_therapy\\_saves\\_patient\\_with\\_multidrug\\_resistant\\_bacterial\\_infect](https://today.ucsd.edu/story/novel_phage_therapy_saves_patient_with_multidrug_resistant_bacterial_infect)
- Langford, B. J., Soucy, J. P. R., Leung, V., So, M., Kwan, A. T. H., Portnoff, J. S., Bertagnolio, S., Raybardhan, S., MacFadden, D. R., & Daneman, N. (2023). Antibiotic resistance associated with the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(3), 302–309. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2022.12.006>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/S41579-021-00649-X>
- Lenneman, B. R., Fernbach, J., Loessner, M. J., Lu, T. K., & Kilcher, S. (2021). Enhancing phage therapy through synthetic biology and genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.11.003>
- Leprince, A., & Mahillon, J. (2023). Phage Adsorption to Gram-Positive Bacteria. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/V15010196>
- Letarov, A. V. (2020). History of Early Bacteriophage Research and Emergence of Key Concepts in Virology. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(9), 1093–1112. <https://doi.org/10.1134/S0006297920090096>
- Lin, J., Du, F., Long, M., & Li, P. (2022). Limitations of Phage Therapy and Corresponding Optimization Strategies: A Review. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27061857>
- Łobocka, M., Dąbrowska, K., & Górski, A. (2021). Engineered Bacteriophage Therapeutics: Rationale, Challenges and Future. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 35(3), 255–280. <https://doi.org/10.1007/S40259-021-00480-Z>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111. <https://doi.org/10.4161/BACT.1.2.14590>

- Lou, Y.-R., Xavier, N. M., & Zalewska-Pi, B. (2023). Phage Therapy—Challenges, Opportunities and Future Prospects. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1638. <https://doi.org/10.3390/PH16121638>
- Mabrouk, A. S., Ongenae, V., Claessen, D., Brenzinger, S., & Briegel, A. (2023). A Flexible and Efficient Microfluidics Platform for the Characterization and Isolation of Novel Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(1), e01596-22. <https://doi.org/10.1128/AEM.01596-22>
- Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–1072. <https://doi.org/10.2217/FMB.12.76>
- Malik, D. J. (2021). Approaches for manufacture, formulation, targeted delivery and controlled release of phage-based therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 262–271. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.02.009>
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F., & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100–133. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.05.014>
- Malik, U., Armstrong, D., Ashworth, M., Dregan, A., L'Esperance, V., McDonnell, L., Molokhia, M., & White, P. (2018). Association between prior antibiotic therapy and subsequent risk of community-acquired infections: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 287–296. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX374>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101310>
- Matsuzaki, S., Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I., & Daibata, M. (2014). Perspective: The age of the phage. *Nature*, 509(7498). <https://doi.org/10.1038/509S9A>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Merk, H., Diaz Högberg, L., Plachouras, D., Suetens, C., & Monnet, D. L. (2022). *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020*. <https://doi.org/10.2900/73460>

- Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *12*(10), 1221. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Mishra, V., Bankar, N., Tiwade, Y., & Ugemuge, S. (2024). How Phage Therapy Works, Its Advantages and Disadvantages: Mini Review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *18*(1), 177–184. <https://doi.org/10.22207/JPAM.18.1.49>
- Mohsen, S., Dickinson, J. A., & Somayaji, R. (2020). Update on the adverse effects of antimicrobial therapies in community practice. *Canadian Family Physician*, *66*(9), 651. [/pmc/articles/PMC7491661/](https://doi.org/10.46748/cfp.2020.669651)
- Motlagh, A. M., Bhattacharjee, A. S., & Goel, R. (2016). Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *32*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11274-016-2009-4>
- Motley, M. P., Banerjee, K., & Fries, B. C. (2019). Monoclonal Antibody-Based Therapies for Bacterial Infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *32*(3), 210. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000539>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, *399*(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mushegian, A. R. (2020). Are There 10<sup>31</sup> Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *Journal of Bacteriology*, *202*(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Nabergoj, D., Modic, P., & Podgornik, A. (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *Microbiology Open*, *7*(2), e00558. <https://doi.org/10.1002/MBO3.558>
- Narayanan, M., Kumar, A., Verma, G. K., Bairwa, A., Mirza, A. A., Goyal, B., MP, N., Sr., A. K., Verma, G. K., Bairwa, A., Mirza, A. A., & Goyal, B. (2024). Efficacy of Bacteriophages in Wound Healing: An Updated Review. *Cureus*, *16*(10). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.71542>
- Ng, R. N., Tai, A. S., Chang, B. J., Stick, S. M., & Kicic, A. (2021). Overcoming Challenges to Make Bacteriophage Therapy Standard Clinical Treatment Practice for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 593988. [https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593988](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593988)

- Ngiam, L., Weynberg, K., & Guo, J. (2024). Evolutionary and co-evolutionary phage training approaches enhance bacterial suppression and delay the emergence of phage resistance. *ISME Communications*, 4(1), 82. <https://doi.org/10.1093/ISMECO/YCAE082>
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R. S., & Barr, J. J. (2017). Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mbio.01874-17>
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020). Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9030135>
- Nilsson, A. S. (2014). Phage therapy--constraints and possibilities. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 192–198. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.902878>
- Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12, 737288. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.737288>
- Nobrega, F. L., Costa, A. R., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2015). Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology*, 23(4), 185–191. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.01.006>
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(12), 760–773. <https://doi.org/10.1038/S41579-018-0070-8>
- O'NEILL, J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations The Review On Antimicrobial Resistance Chaired By Jim O'Neill. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Onsea, J., Soentjens, P., Djebara, S., Merabishvili, M., Depypere, M., Spriet, I., De Munter, P., Debaveye, Y., Nijs, S., Vanderschot, P., Wagemans, J., Pirnay, J. P., Lavigne, R., & Metsemakers, W. J. (2019). Bacteriophage Application for Difficult-to-treat Musculoskeletal Infections: Development of a Standardized Multidisciplinary Treatment Protocol. *Viruses*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/V11100891>

- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., & Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. <http://www.pjmonline.org/wp-content/uploads/archive/vol6322014137.pdf>
- Patil, A., Banerji, R., Kanojiya, P., Koratkar, S., & Saroj, S. (2021). Bacteriophages for ESKAPE: role in pathogenicity and measures of control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *19*(7), 845–865. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1858800>
- Pelfrene, E., Sebris, Z., Cavaleri, M. (2019). Developing Phages into Medicines for Europe. In: Górski, A., Międzybrodzki, R., Borysowski, J. (eds) *Phage Therapy: A Practical Approach*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-26736-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-26736-0_14)
- Pelfrene, E., Willebrand, E., Cavaleiro Sanches, A., Sebris, Z., & Cavaleri, M. (2016). Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(8), 2071–2074. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKW083>
- Piel, D., Bruto, M., Labreuche, Y., Blanquart, F., Goudenège, D., Barcia-Cruz, R., Chenivresse, S., Le Panse, S., James, A., Dubert, J., Petton, B., Lieberman, E., Wegner, K. M., Hussain, F. A., Kauffman, K. M., Polz, M. F., Bikard, D., Gandon, S., Rocha, E. P. C., & Le Roux, F. (2022). Phage-host coevolution in natural populations. *Nature Microbiology*, *7*(7), 1075–1086. <https://doi.org/10.1038/S41564-022-01157-1>
- Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 523–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15>
- Pires, D. P., Costa, A. R., Pinto, G., Meneses, L., & Azeredo, J. (2020). Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(6), 684–700. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAA017>
- Pirnay, J. P., Djebara, S., Steurs, G., Griselain, J., Cochez, C., De Soir, S., Glonti, T., Spiessens, A., Vanden Berghe, E., Green, S., Wagemans, J., Lood, C., Schrevels, E., Chanishvili, N., Kutateladze, M., de Jode, M., Ceysens, P. J., Draye, J. P., Verbeken, G., ... Kilcher, S. (2024). Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study. *Nature Microbiology*, *9*(6), 1434–1453. <https://doi.org/10.1038/S41564-024-01705-X>

- Podgornik, A., Janež, N., Smrekar, F., & Peterka, M. (2015). Continuous Production of Bacteriophages. *Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing*, 297–338. <https://doi.org/10.1002/9783527673681.CH12>
- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00513>
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155. <https://doi.org/10.33073/PJM-2010-023>
- Reindel, R., & Fiore, C. R. (2017). Phage Therapy: Considerations and Challenges for Development. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(11), 1589–1590. <https://doi.org/10.1093/CID/CIX188>
- Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2012). Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(9), 607–617. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2853>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>
- Rohde, C., Wittmann, J., & Kutter, E. (2018). Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *Surgical Infections*, 19(8), 737–744. <https://doi.org/10.1089/SUR.2018.184>
- Rosner, D., & Clark, J. (2021). Formulations for Bacteriophage Therapy and the Potential Uses of Immobilization. *Pharmaceuticals*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/PH14040359>
- Roughgarden, J. (2024). Lytic/Lysogenic Transition as a Life-History Switch. *Virus Evolution*, 10(1), 28. <https://doi.org/10.1093/VE/VEAE028>
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3564>
- Santhanakrishnan, K. R., Koilpillai, J., Narayanasamy, D., Santhanakrishnan, K., Koilpillai, J., & Narayanasamy, D. (2024). PEGylation in Pharmaceutical

- Development: Current Status and Emerging Trends in Macromolecular and Immunotherapeutic Drugs. *Cureus*, 16(8). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.66669>
- Sarhan, W. A., & Azzazy, H. M. (2017). Apitherapeutics and phage-loaded Nanofibers As Wound Dressings With Enhanced Wound Healing and Antibacterial Activity. *Nanomedicine*, 12(17), 2055–2067. <https://doi.org/10.2217/NNM-2017-0151>
- Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., Akter, M., Huq, S., Qadri, F., Talukdar, K., Kassam, M., Delley, M., Loiseau, C., Deng, Y., El Aidy, S., ... Brüssow, H. (2016). Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124–137. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2015.12.023>
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., ... Hamilton, T. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aac.00954-17>
- Simmonds, P., Adriaenssens, E. M., Murilo Zerbini, F., Abrescia, N. G. A., Aiewsakun, P., Alfenas-Zerbini, P., Bao, Y., Barylski, J., Drosten, C., Duffy, S., Paul Duprex, W., Dutilh, B. E., Elena, S. F., García, M. L., Junglen, S., Katzourakis, A., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., ... Vasilakis, N. (2023). Four principles to establish a universal virus taxonomy. *PLoS Biology*, 21(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001922>
- Singla, S., Harjai, K., Katare, O. P., & Chhibber, S. (2016). Encapsulation of Bacteriophage in Liposome Accentuates Its Entry in to Macrophage and Shields It from Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE*, 11(4), e0153777. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153777>
- Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, 186(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.11.017>
- Subramanian, A. (2024). Emerging roles of bacteriophage-based therapeutics in combating antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1384164>

- Sulayyim, H. J. Al, Ismail, R., Hamid, A. Al, & Ghafar, N. A. (2022). Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19). <https://doi.org/10.3390/IJERPH191911931>
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130–133. <https://doi.org/10.4161/BACT.20757>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tanir, T., Orellana, M., Escalante, A., de Souza, C. M., & Koeris, M. S. (2021). Manufacturing Bacteriophages (Part 1 of 2): Cell Line Development, Upstream, and Downstream Considerations. *Pharmaceuticals*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/PH14090934>
- Tavares, P. (2018). The Bacteriophage Head-to-Tail Interface. *Sub-Cellular Biochemistry*, 88, 305–328. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_14)
- Tomas, M., Whiteson, K. L., Ramos-Vivas, J., Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00376>
- Torres-Barceló, C., & Hochberg, M. E. (2016). Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends in Microbiology*, 24(4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.12.011>
- Uribe, R. V., van der Helm, E., Misiakou, M. A., Lee, S. W., Kol, S., & Sommer, M. O. A. (2019). Discovery and Characterization of Cas9 Inhibitors Disseminated across Seven Bacterial Phyla. *Cell Host and Microbe*, 25(2), 233-241.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.003>
- Uyttebroek, S., Onsea, J., Metsemakers, W. J., Dupont, L., Devolder, D., Wagemans, J., Lavigne, R., Spriet, I., & Van Gerven, L. (2021). The Potential Role of Bacteriophages in the Treatment of Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis. *Antibiotics*, 10(6), 675. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060675>

- Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, 14(7). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202012435>
- Wandro, S., Ghatbale, P., Attai, H., Hendrickson, C., Samillano, C., Suh, J., Dunham, S. J. B., Pride, D. T., & Whiteson, K. (2022). Phage Cocktails Constrain the Growth of Enterococcus. *MSystems*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00019-22>
- Wang, C. H., Hsieh, Y. H., Powers, Z. M., & Kao, C. Y. (2020). Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS21031061>
- Weledji, E. P., Weledji, E. K., Assob, J. C., & Nsagha, D. S. (2017). Pros, cons and future of antibiotics. *New Horizons in Translational Medicine*, 4(1–4), 9–14. <https://doi.org/10.1016/J.NHTM.2017.08.001>
- White, H. E., Orlova, E. V., White, H. E., & Orlova, E. V. (2019). Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. *Bacteriophages - Perspectives and Future*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85484>
- World Bank Group. (2017). DRUG-RESISTANT INFECTIONS A Threat to Our Economic Future. <https://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf>
- World Economic Forum. (2018). The Global Risks Report 2018 13th Edition Insight Report. [https://www3.weforum.org/docs/WEF\\_GRR18\\_Report.pdf](https://www3.weforum.org/docs/WEF_GRR18_Report.pdf)
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. *World Health Organization*, 61(3), 12–28. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>
- World Health Organization. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1)
- World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2023). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- World Health Organization. (2024). WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health. <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- Xiong, X., Wu, G., Wei, Y., Liu, L., Zhang, Y., Su, R., Jiang, X., Li, M., Gao, H., Tian, X., Zhang, Y., Hu, L., Chen, S., Tang, Y., Jiang, S., Huang, R., Li, Z., Wang, Y., Deng, Z., ... Wang, L. (2020). SspABCD-SspE is a phosphorothioation-sensing bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature Microbiology*, 5(7), 917–928. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0700-6>
- Yang, Q., Le, S., Zhu, T., & Wu, N. (2023). Regulations of phage therapy across the world. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1250848>
- Young, R., & Gill, J. J. (2015). Phage therapy redux—What is to be done? *Science*, 350(6265), 1163–1164. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6791>
- Zalewska-Piątek, B., & Piątek, R. (2020). Phage Therapy as a Novel Strategy in the Treatment of Urinary Tract Infections Caused by E. Coli. *Antibiotics*, 9(6), 304. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9060304>
- Zhang, M., Zhang, T., Yu, M., Chen, Y. L., & Jin, M. (2022). The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications. *Viruses*, 14(9), 1904. <https://doi.org/10.3390/V14091904>
- Zhang, Y., Guo, Y., Qiu, T., Gao, M., & Wang, X. (2022). Bacteriophages: Underestimated vehicles of antibiotic resistance genes in the soil. *Frontiers in Microbiology*, 13, 936267. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.936267>
- Zhu, Y., Shang, J., Peng, C., & Sun, Y. (2022). Phage family classification under Caudoviricetes: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1032186. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1032186>