

Andreia Filipa Franco Rei Loba

**Fagoterapia como alternativa ao uso de antibióticos
convencionais**

Orientador: Prof. Doutor Pablo Tavares Pereira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2014

Andreia Filipa Franco Rei Loba

Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Prof. Doutor Pablo Tavares Pereira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2014

"The successful man will profit from his mistakes and try again in a different way. "

Dale Carnegie

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Pablo Tavares Pereira, que mesmo perante todas as adversidades profissionais com que se deparou, não desistiu de me acompanhar na elaboração da presente dissertação. Destaco por isso a minha enorme gratidão por toda a sua dedicação, disponibilidade e profissionalismo.

Muito mais do que uma dissertação, o presente trabalho representa a concretização de um desafio a que me propus à cinco anos atrás. Por esse motivo, quero agradecer a todas as colegas que me acompanharam durante este trajecto académico, e que de certa forma, fizeram com que esta fosse uma etapa inesquecível.

Um especial agradecimento à minha mãe Paula Franco pela sua dedicação e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem ela nada disto seria possível.

Queria também agradecer ao meu namorado Ruben Soares por toda a compreensão e motivação nos momentos mais críticos deste longo percurso e que em muito me motivaram a atingir os meus objectivos académicos.

Por último, mas não menos importante, um obrigado aos meus tios Tita, João Diogo Estevens, Teresa Coelho e Carlos Franco por todo o apoio.

Índice

Resumo	VII
Abstract.....	VIII
Lista de Abreviaturas e siglas	IX
Índice de tabelas	X
Índice de figuras.....	XI
Introdução.....	1
1. Antibióticos	3
1.1. Mecanismos de acção dos Antibióticos e respectivos mecanismos de resistência.....	3
1.1.1. Desorganização da membrana Citoplasmática (MC) e membrana externa (ME)	3
1.1.2. Interferência com a síntese da parede celular	5
1.1.3. Inibição da síntese proteica	7
1.1.4. Interferência com a síntese de ácidos nucleicos	10
2. Bacteriófagos	12
2.1. Enquadramento histórico	12
2.2. Estrutura e biologia	14
2.3. Classificação	15
2.4. Ciclo de vida	17
2.4.1. Adsorção e penetração do ácido nucleico viral	17
2.4.2. Divergência pós-infecção	18
2.4.2.1. Ciclo Lítico	19
2.4.2.2. Ciclo lisógeno.....	19
3. Bacteriófagos como agentes terapêuticos	21
3.1. Farmacocinética	21
3.1.1. Translocação	21
3.1.2. Distribuição	22
3.1.3. Metabolização.....	22
3.1.3.1. Auto-replicação in situ	23
3.1.3.2. Inactivação pelo sistema imunitário	24
3.1.3.2.1. Sistema imunitário inato.....	24
3.1.3.2.2. Sistema imunitário adquirido	25
3.1.4. Excreção	25

3.2. Vantagens da fagoterapia comparativamente à antibioterapia.....	26
3.3. Desafios da fagoterapia	27
3.3.1. Mecanismos de resistência bacteriana aos bacteriófagos	27
3.3.1.1. Inibição do processo de adsorção viral.....	27
3.3.1.2. Inibição da entrada do DNA viral para o interior da bactéria.....	27
3.3.1.3. Clivagem dos ácidos nucleicos virais.....	28
3.3.1.3.1. Sistemas de restrição-modificação (R-M)	28
3.3.1.3.2. Sistema CRISPR-Cas.....	29
3.3.1.3.3. Sistema de infecção abortiva (Abi)	29
3.3.1.3.4. Sistema toxina-antitoxina (TA).....	30
3.3.2. Limitações	30
3.3.2.1. Estreito espectro de acção.....	30
3.3.2.2. Imunogenicidade	32
3.3.2.3. Efeitos adversos	33
3.3.2.4. Restrição na utilização dos bacteriófagos temperados	34
3.4. Preparação dos bacteriófagos	35
3.4.1. Isolamento dos bacteriófagos.....	35
3.4.2. Etapas da produção da formulação de bacteriófagos	35
3.5. Fagoterapia na prática clínica	39
3.6. Aprovação regulamentar	43
Considerações finais	45
Glossário	48
Bibliografia	50

Resumo

Nas últimas décadas, a investigação de antibióticos com novos mecanismos de acção, tem vindo a ser motivada pela contínua emergência de estirpes bacterianas multirresistentes. No entanto, nos últimos anos esse desenvolvimento tem vindo a abrandar, o que representa um grave problema de saúde pública.

Antes da era dos antibióticos a fagoterapia representava a terapêutica de primeira linha no tratamento de infecções bacterianas. Como a ausência de recursos impossibilitava a compreensão dos mecanismos de acção moleculares do fago, a fagoterapia era apenas sustentada pelo conhecimento empírico. A ausência de conhecimento associada ao início da era dos antibióticos foram condições suficientes para que a terapêutica fágica fosse posta de parte, à excepção de alguns países da Europa do Leste.

De acordo com a literatura disponibilizada por estes países, vários têm sido os casos de sucesso no tratamento de infecções bacterianas, incluindo infecções causadas por estirpes multirresistentes aos antibióticos convencionais.

No entanto, contrariamente aos ensaios clínicos, a maioria destes estudos omite informação crítica que impossibilita a interpretação dos respectivos resultados.

Actualmente, as novas ferramentas oferecidas pelos avanços biotecnológicos possibilitam não só a compreensão do mecanismo de infecção bacteriana como também permitem compreender melhor a interacção entre os bacteriófagos e o organismo humano.

Como tal, no futuro, a fagoterapia pode ser considerada uma alternativa efectiva para solucionar os casos críticos de multirresistência bacteriana aos antibióticos convencionais.

Palavras-chave: fagoterapia, bacteriófagos, bactérias multiresistentes, antibióticos, infecções bacterianas

Abstract

In the past few decades, research on novel antibiotic drugs has been motivated by continuous outbreaks of bacterial resistance, by targeting multiple targets within bacteria. However, this development has come to a halt in recent years, which raises important public health concerns.

Phage therapy, as an effective measure to counter bacterial infection, precedes the usage of antibiotic drugs to treat bacterial infections. However, at such point in time there were no techniques available to allow the understanding of the molecular mechanisms of bacteriophage action, rendering the process almost entirely empirical. Therefore, these were almost entirely set aside as therapeutic agents at the dawn of the conventional antibiotic era, with the exception of some eastern European countries.

From the remaining reports of the usage of phage therapy to treat humans contaminated with multiple bacterial strains, including multi-drug resistant strains, several success cases exist. However, such reports do not account as clinical trials due to the lack of critical information, rendering the results difficult to interpret.

Taking advantage of more recent molecular biology tools it may be possible to properly understand the phage mechanisms of bacterial infection. Simultaneously, it is also possible to access the previously unknown safety and human host interaction issues. Therefore, these can eventually be considered in the future as an effective alternative to solve critical cases of bacterial resistance to conventional antibiotics.

Keywords: phage therapy, bacteriophages, super bugs, antibiotics, bacterial infections

Lista de Abreviaturas e siglas

AMA - American Medical Association

APC - Células Apresentadoras de Antígeno

ATP – Trifosfato de adenosina

Cas - CRISPR associated protein

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA - CRISPR RNA

DHFR - dihidrofolato redutase

dsDNA - Double strain deoxyribonucleic acid

dsDNA - Double strain ribonucleic acid

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

EIMBV - Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology

EMA - European Medicines Agency

FDA - Food and drug administration

GmrD - Glucose-modified restriction D

GmrS - Glucose-modified restriction S

HMC - Hidroximetilcitosina

IFN - Inibidor dos Factores Tumoriais

IL- Interleucinas

IPI - Internal Protein I

ITU - Infecções do Tracto Urinário

LAra4N - 4-deoxi-L-arabinose

LPS - Lipopolissacárido

MC - Membrana Citoplasmática

MDSs - Modification Dependent Systems

ME- Membrana Externa

MRSA – Methicillin Resistant

Staphylococcus aureus

NAG - N-acetil-glucosamina

NAMA - N-acetil-murâmico

PABA - ácido para-aminobenzóico

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patogénios

Pb - Pares de bases

PBP - Penicillin-binding-proteins

PC – Parede Celular

PCR - Proteína C Reactiva

PEG - Polietilenoglicol

PRSA – Penicillin Resistant

Staphylococcus aureus

PRSP – Penicillin Resistant

Streptococcus pneumoniae

RBPs - Receptor Binding Proteins.

RNApol - RNA polimerase

RRPMM - Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares de Microrganismos

Sie - Super infection Exclusion Systems

SRE - Sistema Reticuloendotelial

ssDNA - Single strain deoxyribonucleic acid

ssRNA - Single strain ribonucleic acid

UDP-NAG - Uridinodifosfato N-acetil-glucosamina

UDP-NAMA - Uridinofosfato-ácido N-acetil-murâmico

VISA - Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*

VRSA - Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

Índice de tabelas

Tabela 1: Classificação dos bacteriófagos por famílias de acordo com a morfologia e tipo de ácido nucleico; 22

Tabela 2: Resumo de alguns dos estudos mais robustos disponíveis na literatura relativamente à aplicação dos bacteriófagos na prática clínica 46

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo de acção da daptomicina numa célula bacteriana gram-positivo.....	3
Figura 2: Mecanismo de acção da polimixina numa bactéria gram-negativo	4
Figura 3: Mecanismo de acção de algumas classes de antibióticos que têm como alvo a parede celular de uma bactéria gram-positivo;.....	13
Figura 4: Ribossoma bacteriano (70S)	13
Figura 5: Mecanismo de acção dos aminoglicosidos.....	14
Figura 6: Mecanismo de acção das tetraciclínas;	14
Figura 7: Mecanismo de acção do cloranfenicol.....	15
Figura 8: Mecanismo de acção das oxazolidinonas	15
Figura 9: Estrutura de um bacteriófago do tipo T4;.	20
Figura 10: Ciclo de vida de um bacteriófago	26
Figura 11: Teste do cross-stricking.	42

Introdução

Até à década de 40 do século passado, as patologias infecciosas representavam o principal problema de saúde pública a nível mundial, sendo estas responsáveis por uma elevada taxa de mortalidade e consequente reduzida esperança média de vida.

Em 1929, Alexander Fleming descobriu acidentalmente a penicilina após ter verificado que as culturas de *Staphylococcus aureus* em meio sólido tinham sido contaminadas por um fungo do género *Penicillium*, que possuía propriedades bactericidas^[1].

Apesar da descoberta ser promissora, foi a sulfanilamida, um composto de origem sintética, o primeiro antibiótico a ser clinicamente utilizado em humanos, ainda que com vastas limitações em termos de segurança e eficácia^[2]. Desta forma, só a partir de 1940 é que a penicilina foi alvo de mais investigações^[3], tendo sido só nesse período que foi reportada a sua primeira administração terapêutica^[4].

A descoberta e introdução destes fármacos representou o início da Era dos Antibióticos, um período que durou apenas duas décadas, e que ficou marcado pela continua descoberta e introdução de antibióticos pertencentes a diferentes classes^{[2],[5]}.

A vasta gama de opções terapêuticas disponíveis, permitiu não só o tratamento e controlo da maioria das doenças infecciosas como também possibilitou a realização de tratamentos associados a um elevado risco de infecção bacteriana, tal como a quimioterapia, transplante de órgãos e outros procedimentos cirurgicos^[6]. O forte impacto destas novas abordagens terapêuticas fez com que muitos investigadores e profissionais de saúde acreditassem que as patologias infecciosas estariam controladas^{[2],[7]}.

No entanto, pouco tempo após a introdução da penicilina na prática clínica, foram reportados os primeiros casos de infecção por PRSA, uma estirpe de *Staphylococcus aureus* detentora de β -lactamases, capazes de impedir o efeito da penicilina^[8]. Posteriormente, com o objectivo de contornar este obstáculo, foi sintetizada a meticilina, o primeiro derivado semi-sintético da penicilina que se caracterizava por ser resistente à hidrólise promovida por essas enzimas. No entanto, a sua eficácia foi igualmente temporária, tendo sido reportado o primeiro caso de infecção por MRSA logo no primeiro ano de utilização.

Desde aí, novas classes de antibióticos foram descobertas bem como alterações sintéticas dos pré-existentes foram efectuadas, com o intuito de dar resposta à continua emergência de estirpes bacterianas resistentes^[6].

Apesar da resistência aos antibióticos ter sido desde o início um desafio constante, o aparecimento de estirpes bacterianas multiresistentes, em particular de bactérias gram-negativo^[9], representa actualmente um grave problema em termos de saúde pública^{[5]-[7]}.

Desta forma, infecções que antes eram facilmente controláveis, são cada vez mais difíceis ou até mesmo impossíveis de tratar com as opções terapêuticas actualmente disponíveis ^[5], ^[10], surgindo por isso a necessidade de recorrer a antibióticos em desuso, geralmente com elevada toxicidade associada ^[9].

De acordo com as estimativas efectuadas pela ECDC e pela EMA, cerca de 25.000 pessoas morrem anualmente na Europa devido a infecções bacterianas multiresistentes. O impacto deste problema é enorme, não só em termos de morbilidade e mortalidade dos doentes como também em termos sociais e económicos, estando associado a custos anuais de cerca de 1,5 biliões € só no continente Europeu.

Apesar de estatísticas recentes indicarem que o número de casos de *MRSA* reduziu em alguns países da Europa, o número de infecções por *Klebsiella pneumoniae* multiresistente e por outras bactérias gram-negativo tem vindo a aumentar de ano para ano na maioria dos países Europeus.

Além disso, analisando os dados disponibilizados pela FDA é possível constatar que desde os anos 60 a descoberta de antibacterianos com novos mecanismos de acção abrandou, tendo o último antibiótico pertencente a uma nova classe sido aprovado em 2003. Desde aí, dos 6 antibióticos aprovados todos consistem em modificações químicas de fármacos previamente existentes ^[6], ^[9]-^[12].

Desta forma, o aumento da incidência de estirpes multiresistentes paralelamente à ausência de desenvolvimento de novos antibacterianos são condições suficientes para retornarmos à pre-era dos antibióticos, onde dominavam as doenças infecciosas ^[9], ^[10], ^[14]. Trata-se por isso de um alarmante problema de saúde pública que necessita de rápida intervenção.

Como tal, o objectivo do presente trabalho consiste na análise retrospectiva da fagoterapia como uma terapêutica alternativa para infecções bacterianas multiresistentes, de forma a concluir se esta é uma estratégia viável a adoptar no futuro.

1. Antibióticos

Para que seja possível compreender os mecanismos de resistência das bactérias a um determinado antibiótico é essencial o conhecimento dos mecanismos de acção responsáveis pelo seu efeito terapêutico. Como tal, no presente capítulo será abordado de forma generalizada os mecanismos de acção de cada uma das classes de antibióticos actualmente disponíveis bem como os mecanismos de resistência adquirida associados.

1.1. Mecanismos de acção dos Antibióticos e respectivos mecanismos de resistência

Os antibióticos são geralmente classificados em 4 categorias de acordo com o seu alvo na célula bacteriana.

1.1.1. Desorganização da membrana Citoplasmática (MC) e membrana externa (ME)

Nas bactérias gram-positivo o envelope celular é constituído apenas pela membrana citoplasmática envolvida por uma robusta parede celular. À semelhança das células eucarióticas, a membrana é uma estrutura semi-permeável que além de delimitar e controlar o fluxo de solutos e iões entre o meio intracelular e o exterior, ainda desempenha funções biossintéticas e bioenergéticas [19].

A daptomicina é um lipopéptido cíclico cujo fragmento lipofílico, na presença de iões Ca^{2+} , penetra e interage com os fosfolípidos, o que resulta na permeabilização e despolarização do potencial de membrana acompanhada pela perda de pequenos iões como o potássio (figura 1). Apesar de este mecanismo não ser totalmente conhecido, sabe-se que culmina com a morte bacteriana [20], [21].

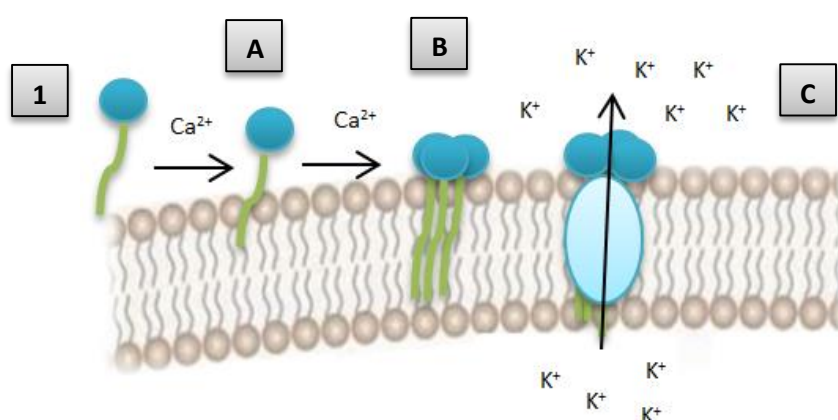


Figura 1: Mecanismo de acção da daptomicina numa célula bacteriana gram-positivo. 1- Daptomicina; A-Interacção do antibiótico com os fosfolípidos da membrana na presença dos iões de cálcio; B- A associação de várias moléculas antibacterianas forma uma espécie de canal; C- Efluxo de iões potássio e consequente despolarização do potencial de membrana.

Por sua vez, as bactérias gram-negativas apresentam a membrana citoplasmática cercada por uma fina parede celular que por sua vez está envolvida por uma segunda membrana lipídica designada por membrana externa (ME) que têm como função actuar como uma barreira protectora adicional. Esta caracteriza-se pela presença de Lipopolissacárido (LPS) no seu folheto externo, um componente estrutural anfifílico cuja porção hidrófila se projecta para o exterior da bactéria contribuindo para a carga electronegativa da superfície bacteriana.

Consequentemente, catiões bivalentes presentes no meio interagem com as moléculas de LPS adjacentes contribuindo para a estabilidade e integridade da ME [19].

As polimixinas são antibióticos que por possuírem uma região polipeptídica catiónica vão interagir com os fosfolípidos e com o lípido A do LPS, competindo com os catiões bivalentes e reduzindo consequentemente a estabilidade da ME. Simultaneamente, a cauda do ácido gordo da polimixina facilita a penetração na membrana externa e citoplasmática, local onde a região catiónica da molécula vai interagir electrostáticamente com as cargas negativas do grupo fosfato dos fosfolípidos membranares, o que conduz a uma alteração da permeabilidade, provocando um efluxo do conteúdo intracelular bacteriano que culmina com a morte celular [19], [22] (figura 2). Foi descrito em literatura o desenvolvimento de resistência a estes antibióticos por alteração do lípido A originada pela adição de LAra4N (4-deoxi-L-arabinose) ao seu grupo fosfato, o que resulta no aumento da carga do lípido A e consequente redução da afinidade para este grupo de antibióticos[22].

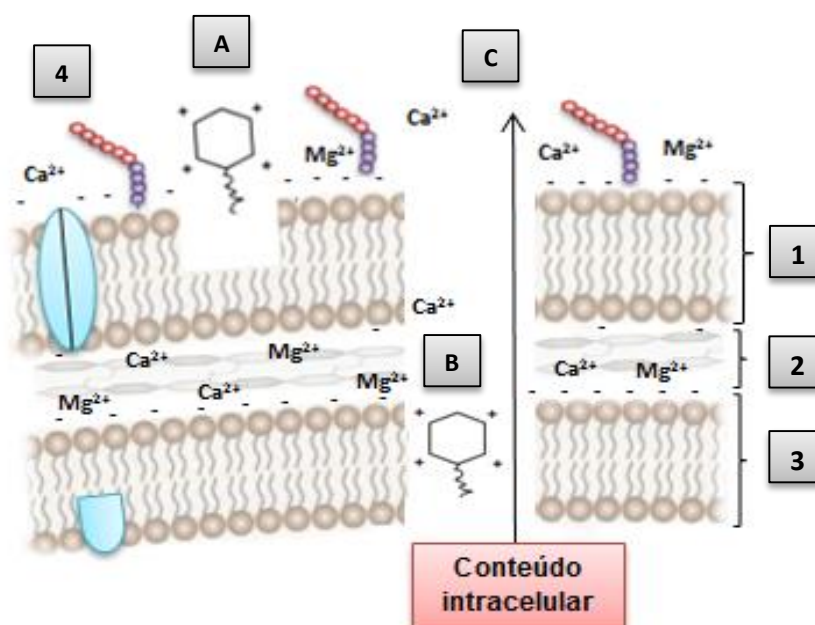


Figura 2: Mecanismo de acção da polimixina numa bactéria gram-negativo. 1-ME; 2-PC; 3-MC; 4- LPS; A- Interacção do anel polipeptídico catiónico da polimixina com o LPS e fosfolípidos, competindo com os iões divalentes e reduzindo a estabilidade e integridade da ME; B- A cauda do ácido gordo do AB promove a penetração até à MC, onde a interacção com os fosfolípidos vai resultar na alteração da permeabilidade celular; C- Efluxo do conteúdo intracelular e consequente morte bacteriana;

1.1.2. Interferência com a síntese da parede celular

O peptidoglicano é a macromolécula responsável por conferir rigidez à parede celular, constituindo por isso uma protecção mecânica contra a ruptura osmótica da célula bacteriana em ambientes hipotónicos ^{[19],[23]}.

Este polímero consiste na associação alternada dos aminoaçucars NAG e NAMA mediada por ligações glicosídicas β (1,4). De acordo com a sua localização na célula bacteriana, o processo de biossíntese está organizado em 3 etapas fundamentais: fase citoplasmática, membrana e parietal. Este processo é essencial para o crescimento bacteriano, já que as bactérias possuem autolisinas endógenas que lisam a sua própria parede celular formando orifícios que têm de ser posteriormente ocupados pelo peptidoglicano recém-sintetizado. Como tal, qualquer antibiótico que interfira em alguma destas etapas culmina com a lise bacteriana ^[19].

Tal como o próprio nome indica, a fase citoplasmática decorre no citoplasma, local onde se dá a síntese dos precursores UDP-NAG e UDP-NAMA-pentapéptido ^[23]. O antibiótico fosfomicina intervem nesta etapa ao se ligar irreversivelmente à enolpiruviltransferase, enzima necessária à síntese do UDP-NAMA ^[24] (figura 3). A resistência a este antibiótico pode ser conferida por uma mutação da sua enzima alvo bem como dos genes estruturais que codificam a síntese dos seus transportadores *GlpT* e *UhpT*, dificultando o acesso do antibiótico ao respectivo alvo. Além disso, algumas bactérias desenvolvem ainda a capacidade de síntese de diversas enzimas que embora mediante diferentes mecanismos catalisam a abertura do anel oxirano da fosfomicina, tornando-a inactiva ^[25].

Na fase membrana, ocorre o transporte dos precursores do peptidoglicano através da membrana citoplasmática com o auxílio do transportador lipídico bactoprenol, formando o precursor NAG-NAMA pentapeptídeo ^[19]. A bacitracina interfere nesta etapa ao inibir a desfosforilação do transportador lipídico, um passo essencial para que o bactoprenol exerça a sua função ^[26].

Os glicopéptidos também actuam nesta fase ao se ligarem ao dipéptido D-alanil-D-alanina do precursor NAG-NAMA, evitando por impedimento estérico que as enzimas PBPs presentes no folheto externo da membrana celular exerçam a sua função ^{[27], [28]} (figura 3).

No entanto, algumas estirpes resistentes de *S. aureus* (VRSA) e *Enterococci* spp. exibem genes que codificam a alteração dos dois resíduos terminais D-alanina do NAMA para D-Ala-D-lac ou D-Ala-D-Ser, impedindo desta forma o seu reconhecimento pelos antibióticos pertencentes a esta classe ^[29]. No entanto, foi detectado que as estirpes de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina (VISA) não apresentam os genes de resistência

exibidos pelas bactérias VRSA e sintetizam o dipéptido terminal D-Ala-D-Ala em abundância, razão pela qual é possível concluir que embora permaneça por esclarecer, o mecanismo associado à redução da sensibilidade destas estirpes é diferente do descrito anteriormente [30].

Por fim, a fase parietal consiste na incorporação do precursor recém-sintetizado na parede celular pré-existente, para que posteriormente cada NAMA-pentapeptideo estabeleça pontes de união (*cross-link*) entre o 3º e o 4º aminoácido de cadeias peptídicas vizinhas numa reacção catalisada pelas transpeptidases, vulgarmente designadas por PBPs [19]. Os antibióticos beta-lactâmicos por exibirem um anel farmacologicamente activo com uma estrutura similar à porção D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica do NAMA, actuam como substrato análogo das enzimas PBPs estabelecendo ligações covalentes e impossibilitando consequentemente que estas enzimas catalisem o *cross-linking* parietal [23] (figura 3).

Esta ampla classe de antibióticos pode ser inactivada pelas β -lactamases adequadas, um vasto grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico responsável pela actividade farmacológica destes fármacos [23]. Algumas estirpes de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (PRSP) produzem PBP2x como resultado da mutação das PBPs endógenas e que se manifesta através de enzimas com afinidade reduzida para a penicilina mas que mantêm a sua função biológica. As estirpes bacterianas MRSA exibem o gene *mecA* que codifica a síntese da enzima PBP2a, uma PBP adicional que possui reduzida afinidade para os beta-lactâmicos e como tal permanece activa possibilitando a síntese do peptidoglicano[31].

è frequente algumas bactérias produzirem sistemas de efluxo, que consistem em proteínas transmembranares que provocam a saída dos antibióticos beta-lactâmicos, e que utiliza o fluxo de protões como fonte de energia. Deste modo, estes sistemas dificultam e atrasam a acumulação do agente terapêutico no meio intracelular. Além disso, as bactérias gram-negativo ainda adquirem mutações que resultam na síntese de canais de porina na membrana externa com reduzida afinidade para alguns destes antibióticos, o que consequentemente compromete a entrada dos respectivos fármacos na célula bacteriana [19].

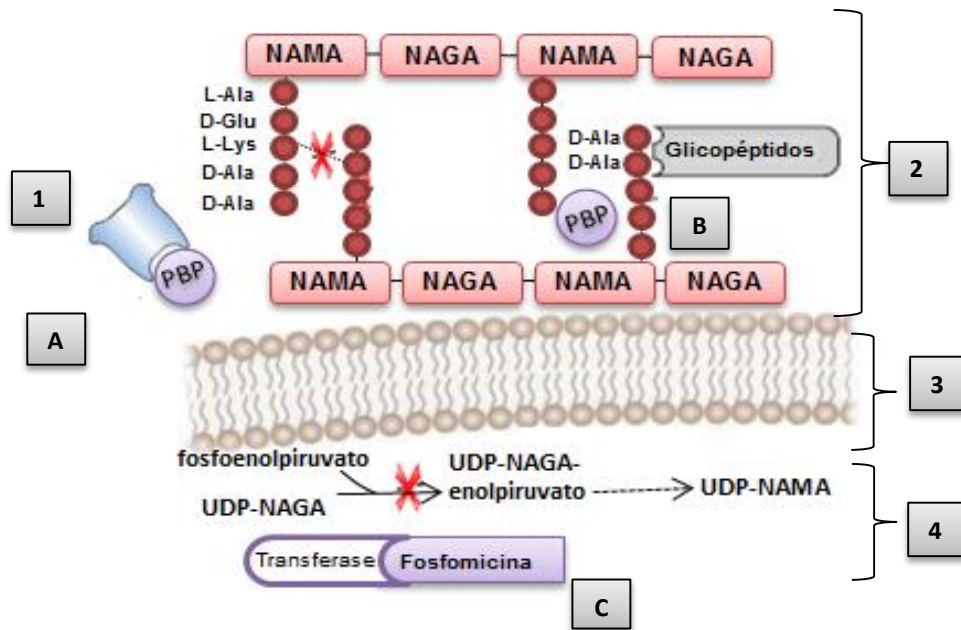


Figura 3: Mecanismo de acção de algumas classes de antibióticos que têm como alvo a parede celular de uma bactéria gram-positivo; 1. β-lactâmicos; 2. PC; 3. MC; 4. Citoplasma; A. Associação dos antibióticos β-lactâmicos com as PBPs, impossibilitando que estas catalisem o *cross-linking* parietal. B. Interação dos antibióticos glicopéptidos com o dipéptido terminal D-Alanina do precursor NAG-NAMA, impossibilitando por impedimento estérico que a PBP exerça a sua função; C. Interação da fosfomicina com a transferase, interferindo com a síntese do precursor UDP-NAMA.

1.1.3. Inibição da síntese proteica

A síntese proteica implica a transcrição prévia do genoma, um processo mediado pela RNA polimerase que consiste na síntese de mRNA a partir da informação contida no DNA bacteriano. A rifampicina actua nesta etapa ao se ligar à RNA polimerase, impedindo que esta exerça a sua função. A resistência a este antibiótico desenvolve-se facilmente visto que uma única mutação no gene que codifica a síntese desta enzima pode ser suficiente para que esta já não seja reconhecida pelo agente terapêutico [32].

A etapa final tem lugar no ribossoma e consiste na tradução da informação codificada no mRNA nas respectivas proteínas. Os ribossomas bacterianos diferem dos eucarióticos em

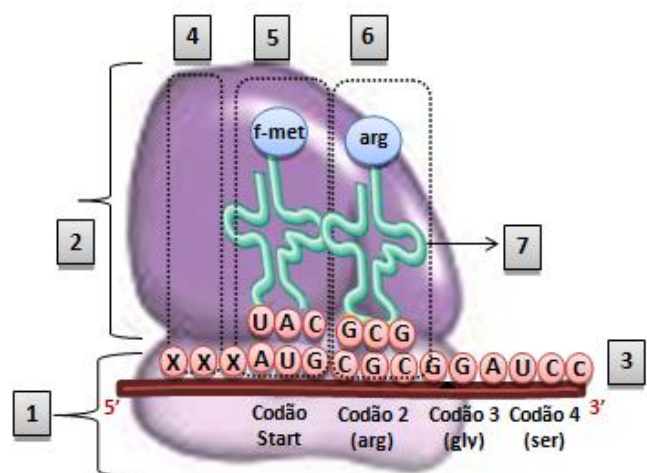


Figura 4: Ribossoma bacteriano (70S); 1- Subunidade 30S; 2- Subunidade 50S; 3-mRNA; 4- Local E; 5- Local P; 6- Local A; 7- tRNA;

tamanho e em composição, sendo o complexo 70S constituído por uma subunidade 30S e 50S ^{[19], [32]} (figura 4).

Os aminoglicosídeos atravessam o envelope celular bacteriano até chegarem ao citoplasma, onde vão interagir com proteínas específicas da subunidade 30S, afectando a precisão do processo de tradução (figura 5). Como resultado obtêm-se proteínas *non sense* que ao serem incorporadas na membrana celular alteram a permeabilidade e conduzem a uma libertação do conteúdo intracelular culminando com a lise bacteriana ^{[19], [21], [32]}.

A resistência à acção antibacteriana dos aminoglicosídeos pode se desenvolver por uma das seguintes forma: (1) efluxo do antibiótico reduzindo a sua concentração no local de acção; (2) inactivação enzimática; (3) mutação do ribossoma bacteriano de forma a que os aminoglicosídeos não possuam mais a capacidade de interagir com ele ^[32].

As tetraciclínas e os seus derivados também actuam nesta subunidade, impossibilitando a ligação do aminoacil-tRNA ao ribossoma, o que impede a ligação do codão-anticodão entre o tRNA e o local A dos ribossomas o que consequentemente inibe a introdução de novos aminoácidos na cadeia peptídica em crescimento ^[33] (figura 6). A resistência às tetraciclínas é frequentemente mediada pelo gene *Tet* que codifica a síntese de proteínas de protecção ribossomal, que ao alterarem a conformação do ribossoma bacteriano evitam a interacção destes fármacos com o seu alvo. À semelhança dos antibióticos beta-lactâmicos, a síntese de bombas de efluxo e de enzimas que inactivam estes agentes também são responsáveis por resistências bacterianas ao seu efeito terapêutico ^[34].

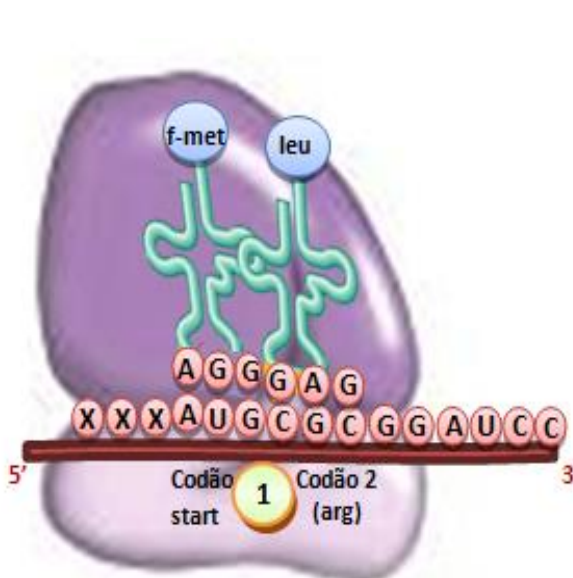


Figura 5: Mecanismo de acção dos aminoglicosídeos; 1- Gentamicina; Ao se ligar à subunidade 30S do ribossoma, o AB vai permitir a ligação de um anticodão não complementar do codão CGC, o que leva à síntese de um aminoácido errado e consequente produção de proteínas *non sense*;

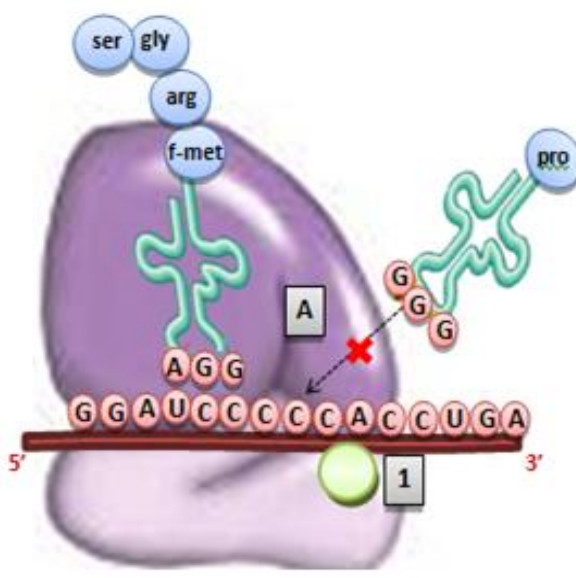


Figura 6: Mecanismo de acção das tetraciclínas; 1- Doxíciclina; A- A interacção do AB com a subunidade 30S, impede a ligação do aminoacil-tRNA ao local A do ribossoma inibindo consequentemente a adição de novos aminoácidos à cadeia peptídica em crescimento;

Os macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B por sua vez, têm como alvo a subunidade 50S ribossomal impedindo a translocação do péptido recém-sintetizado. Na resistência a estes agentes terapêuticos estão envolvidos os seguintes mecanismos: (1) aquisição de genes que codificam a síntese de bombas de efluxo; (2) mutação que altere o alvo terapêutico ou expressão de enzimas codificadas pelo gene *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) que dimetilam a região 23S do rRNA, que constitui a parte da subunidade 50S do ribossoma com que estes antibióticos interagem; (3) Síntese de enzimas específicas que inativam os próprios antibióticos [35].

O cloranfenicol exerce a sua actividade bacterioestática por se ligar de forma reversível ao componente peptidiltransferase da subunidade 50S do ribossoma, o que impede a ligação do aminoacil-tRNA ao local acceptor no ribossoma impossibilitando a transferência de aminoácidos para as cadeias peptídicas em crescimento [21] (figura 7).

Algumas das bactérias resistentes exibem o gene *cat* que codifica a síntese de acetiltransferases, que acetilam o antibiótico fazendo com que este perca o seu efeito antibacteriano [32]. Outras bactérias apresentam sistemas de efluxo que expulsam o fármaco para o meio extracelular ou mutações na peptidiltransferase ou em proteínas adjacentes do ribossoma que diminuem a afinidade do cloranfenicol para o seu alvo. Foram ainda descritos mecanismos associados com a diminuição da permeabilidade em certas estirpes de bactérias gram-negativo onde se verifica ausência de porina [21].

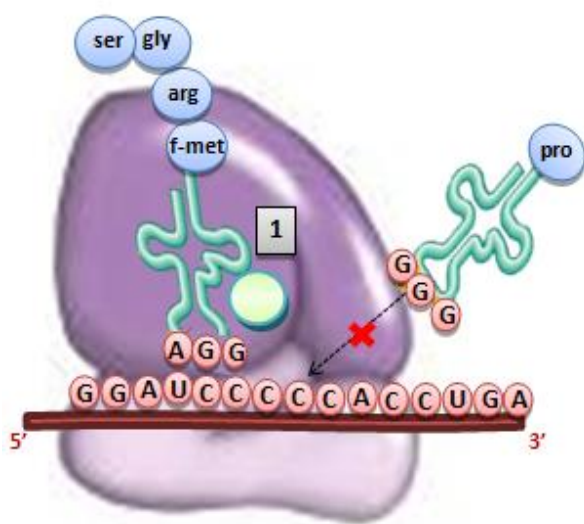


Figura 7: Mecanismo de ação do cloranfenicol; 1- Cloranfenicol; O AB ao interferir com o componente peptidiltransferase da subunidade 50s, impossibilita a ligação do aminoacil-tRNA o que consequentemente impede a transferência de novos aminoácidos para a cadeia peptídica em crescimento;

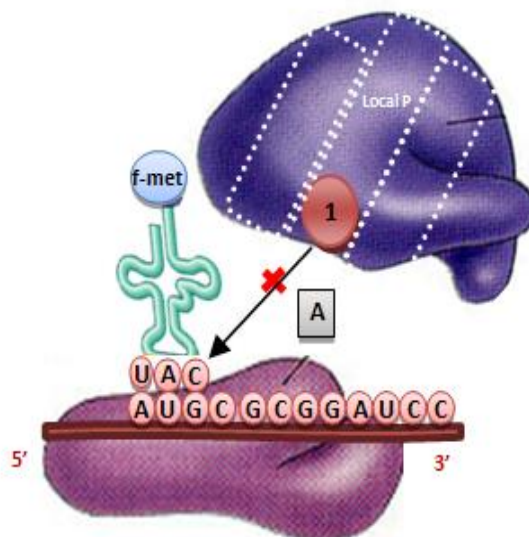


Figura 8: Mecanismo de ação das oxazolidinonas; 1- Linezolid; A- Ao se ligar ao local P da subunidade 50S, o AB impede a formação do complexo 70S, essencial para o início do processo de tradução;

Por apresentar uma forte afinidade para o local P da subunidade 50S do ribossoma bacteriano, o linezolid impede a formação do complexo fMet-tRNA-ribossoma, fundamental para o início do processo de tradução (figura 8) Apesar do linezolid ser um dos últimos antibióticos a ser aprovado pela FDA, já foram descritos casos de resistência, visto que uma única mutação no gene que codifica a estrutura deste organelo é suficiente para impedir a eficácia deste antibiótico [32].

1.1.4. Interferência com a síntese de ácidos nucleicos

O sulfametoxazole, trimetopim e dapsona são vulgarmente designados por antimetabolitos por inibirem a síntese do tetraidrofolato (THF), essencial na síntese de DNA. O sulfametoxazole e a dapsona mimetizam o ácido para-aminobenzóico (PABA) e como tal inibem competitivamente a enzima dihidropteorate sintetase (DHPS) que têm como função incorporar o PABA na via de síntese do THF. O trimetopim por ser estruturalmente análogo do dihidrofolato é um inibidor competitivo da dihidrofolato redutase (DHFR), enzima necessária na conversão do dihidrofolato (DHF) em THF.

No entanto, o uso destes antibióticos na prática clínica foi limitado pelo aparecimento de resistências, que surgiram através da produção de formas alteradas dos respectivos alvos enzimáticos ou através de alterações na permeabilidade que dificultam o acesso do antibiótico ao meio intracelular. Algumas bactérias resistentes, produzem ainda PABA, que em elevadas concentrações, é capaz de competir com o sulfametoxazole e dapsona na inibição da DHPS [32], [33].

As quinolonas actuam por inibição de duas topoisomerasas, enzimas essenciais no crescimento bacteriano. A DNA girase é responsável por induzir o superenrolamento negativo do DNA, etapa imprescindível para a replicação, transcrição e recombinação do genoma bacteriano, possibilitando ainda a sua compactação no interior da célula bacteriana. A inibição desta enzima impede o fecho dos cortes no DNA, impedindo a sua replicação. Posteriormente, a manutenção das rupturas introduzidas, vão funcionar como sinais para as exonucleases que vão clivar os nucleótidos ao longo de todo o DNA, conduzindo à morte celular.

A topoisomerase IV está envolvida no relaxamento e na separação do DNA, o que permite a cisão dos cromossomas no final da replicação, possibilitando consequentemente que cada uma das bactérias fique com o respectivo genoma. Devido à similaridade estrutural destas duas topoisomerasas, as quinolonas possuem a capacidade de inibir ambas as enzimas, embora com diferentes graus de afinidade. Como tal, é a estrutura química de cada um dos antibióticos desta classe que condiciona o mecanismo de acção predominante.

A redução da sensibilidade a estes agentes terapêuticos pode resultar de mutações espontâneas nos genes que codificam a síntese das enzimas alvo reduzindo a afinidade destes antibióticos para o seu local de ligação.

Como os canais de porina exercem um papel essencial na difusão das quinolonas através da membrana externa das bactérias gram-negativo, mutações nos genes correspondentes, podem implicar alterações nos padrões de susceptibilidade bacteriana a estes antibióticos.

Apesar do mecanismo associado ainda não estar totalmente elucidado, sabe-se que as proteínas Qnr (quinolone resistance) protegem as topoisomerases da acção inibidora das quinolonas, por interferência com o complexo topoisomerase-DNA-quinolonas.

Além disso, e à semelhança de outros antibióticos, a presença de bombas de expulsão activa também interfere com a eficácia das quinolonas. ^[36]

2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos ou fagos são um grupo de vírus que se caracterizam pela sua capacidade de infectar células procarióticas ^[37], desempenhando por isso um papel essencial no equilíbrio e evolução dos organismos pertencentes aos domínios Bactéria e *Archaea* ^[38], ^[39]. Estes microrganismos encontram-se onnipresentes e em elevada quantidade na biosfera o que faz com que sejam considerados uma das entidades biológicas mais abundantes na terra ^[37], ^[40].

Dado que o objectivo do presente trabalho consiste na análise da fagoterapia como uma alternativa terapêutica para as patologias infecciosas de origem bacteriana, apenas serão abordados os bacteriófagos capazes de infectar bactérias.

2.1. Enquadramento histórico

O primeiro relato da existência de bacteriófagos foi feito em 1896 quando o bacteriologista Ernest Hanking detectou a presença, em dois rios na Índia, de uma substância não identificada com elevada actividade antibacteriana contra a *Vibrio cholerae*, responsável por limitar a expansão da epidemia da cólera nesse local ^[41], ^[42].

Apesar de desde aí vários investigadores terem observado um fenómeno semelhante ^[41], o reinteresse só surgiu em 1915, quando o bacteriologista Frederick Twort testava a hipótese dos vírus possuírem a capacidade de crescer em meios de cultura artificiais.

Apesar do seu objectivo ter sido mal sucedido, a contaminação bacteriana de um meio de cultura permitiu a Twort observar que algumas das colónias bacterianas apresentavam um aspecto transparente e que eram incapazes de se replicar. Além disso, verificou também que o seu contacto com outras culturas bacterianas puras promovia um fenómeno semelhante. Estas observações fizeram com que Twort publicasse um artigo onde concluía que o responsável pela lise bacteriana se tratava de um agente infeccioso filtravel, levantando entre várias possibilidades a hipótese de se tratar de um vírus ^[41], ^[43].

No entanto, apesar de controverso, a descoberta dos bacteriófagos é muitas vezes associada ao nome Félix D'Herelle, um microbiologista do Instituto *Pasteur* em Paris ^[43]–^[45].

Durante a primeira guerra mundial (1915), ocorreu um grave surto de desintéria hemorrágica de origem bacteriana entre as tropas francesas. A partir de amostras fecais de alguns doentes em convalescença, D'Harelle obteve um filtrado livre de bactérias que posteriormente incubou juntamente com as culturas bacterianas de *Shigella spp.* Como resultado observou um fenómeno idêntico ao que havia sido descrito por Twort e ao qual deu o nome de placas de lise ^[41].

Dois anos depois D'Herelle publicou um artigo onde constata o facto desse “*micróbio invisível e antagonista do Bacillus disenterii*” (D'Herelle, 1917; p.373) ser um parasita intracelular obrigatório necessitando de células viáveis de *Shigella spp.* para se replicar bem como a sua ausência de patogenicidade relativamente aos animais experimentais. Os resultados obtidos permitiram-lhe assim estabelecer uma relação causal entre a cura da desintéria e a presença deste vírus, o qual intitulou de bacteriófago [46].

Ainda no mesmo ano foram isolados fagos capazes de lisar uma ampla variedade de bactérias patogénicas tais como *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus species*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitis* [45].

D'Herelle foi ainda o responsável pelo desenvolvimento do conceito de terapêutica fágica tendo sido o primeiro a utilizar estes vírus como agente terapêutico no tratamento de uma criança com desintéria severa no Hospital *Enfants-Malades* em Paris [44], [45], [47].

Em 1923, D'Herelle em associação com bacteriologista *Giorgi Eliava* fundou na Geórgia o Instituto Eliava (EIBMV) [48] e uma década depois inaugurou em Paris o *Laboratoire du Bacteriophage*, onde eram comercializados 5 *cocktails* de bacteriófagos que asseguravam a terapêutica de uma ampla variedade de infecções [41], [45], [47]. A sua comercialização teve um impacto global, suscitando o interesse de grandes empresas do sector farmacêutico como a *Ely Lilly*, *Parke-Davis* e *Abbot* que investiram na sua produção [45].

Apesar do conhecimento sobre a biologia dos bacteriófagos ser limitado, até meados dos anos 30 a terapêutica fágica foi mundialmente usada de forma intensiva e com elevadas taxas de sucesso associadas [45], [47], [49].

No entanto, a controvérsia gerada em torno da ausência de ensaios clínicos controlados e randomizados que comprovassem a eficácia desta terapêutica fez com que a AMA exigisse uma revisão completa da literatura disponível [41]. Desta forma, com base na análise de mais de uma centena de estudos, Monroe Eaton e Bayne-Jones publicaram em 1934 o primeiro de três críticos artigos de revisão, que levantava sérias questões em torno da natureza dos bacteriófagos, já que os factos indicavam se tratar provavelmente de uma enzima [41], [44], [47]. O forte impacto negativo deste artigo associado ao início da Era dos antibióticos foram condições suficientes para que os países Ocidentais perdessem o interesse pela terapêutica fágica [38].

No entanto, na Europa do Leste os bacteriófagos continuaram até à actualidade a ser utilizados terapêuticamente em associação ou como alternativa à antibioterapia [41], [47].

2.2. Estrutura e biologia

À semelhança dos restantes vírus, os bacteriófagos são genericamente constituídos por ácido nucleico e proteínas ^{[19],[50]}.

Relativamente à natureza do ácido nucleico, este pode variar substancialmente entre diferentes bacteriófagos, tanto em termos de tamanho como de estrutura ^{[50],[51]}. Assim, o genoma viral pode apresentar-se sob a forma de DNA ou RNA, de cadeia simples (ss) ou dupla (ds), na conformação linear, circular ou superenrolada. No entanto, a grande maioria dos fagos possuem uma molécula linear de dsDNA ^[51].

Apesar de os bacteriófagos serem muito diversos em termos morfológicos, apresentando dimensões e formas muito variáveis, a maioria é constituída por uma cabeça de simetria icosaédrica associada a uma cauda proteica de simetria helicoidal (figura 9) ^{[38],[51]}.

A cabeça é formada pela cápside, uma estrutura estável de morfologia diversa que é constituída por subunidades proteicas estruturais repetidas e que envolve o ácido nucleico ^[50]. Além de proteger o genoma viral, a cápside pode ainda possuir proteínas que lhe conferem especificidade por determinadas células bacterianas ^{[19], [52]}.

A associação da cabeça com a cauda do fago é mediada pelo pescoço, um heterolígmero composto por várias proteínas que assegura que o genoma só é libertado do interior da cápside quando o virião está anexado à célula hospedeira ^[38].

A porção distal da cauda possui uma placa basal à qual estão associadas 6 fibras ^[38] e espículas da cauda, que exibem proteínas específicas que interagem com os receptores de membrana de determinadas células bacterianas, e que desempenham por isso uma função essencial no processo de infecção ^{[38],[51]}.

Dependendo do bacteriófago a cauda pode apresentar contractibilidade e dimensões diversas bem como pode exibir estruturas acessórias como espículas, colar, envelope lipídico ou ausência de invólucro ^{[38],[51]}.

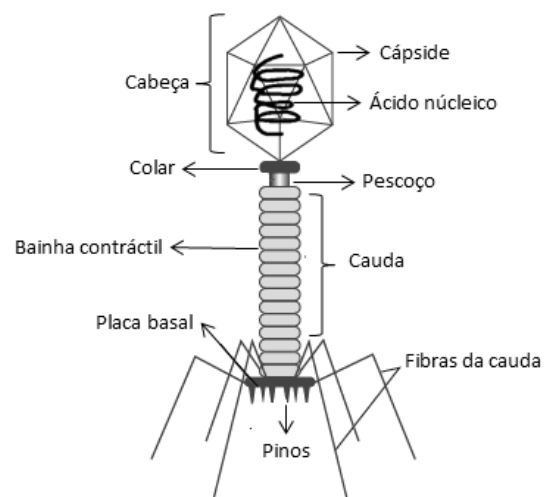


Figura 9: Estrutura de um bacteriófago do tipo T4;

2.3. Classificação

Desde 1959, foram descobertos e analisados mais de 5100 bacteriófagos através de microscopia electrónica. O ICTV é a entidade internacional responsável pela taxonomia de todos os tipos de vírus ^[37]. Desde o primeiro relatório em 1971, onde foi implementado o sistema de classificação de bacteriófagos, até ao mais recente (9ª edição) em 2011 constantes actualizações na taxonomia foram efectuadas.

Actualmente, os bacteriófagos possuem a capacidade de infectar mais de 140 géneros de bactérias ^[52] e encontram-se divididos em 10 famílias distintas com base na natureza do ácido nucleico e morfologia apresentada (Tabela 1)

De todos os fagos descritos até à data, cerca de 96% pertencem à ordem *Caudovirales*, um grupo caracterizado pela presença de cauda ^[51], ^[52]. De acordo com as morfologias desta estrutura estão ainda organizados em 3 famílias filogeneticamente diferentes: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*. Apesar de partilharem em comum características como o ácido nucleico, a cápside icosaédrica e a cauda, a vasta diversidade de características levou ainda à necessidade de agrupar os bacteriófagos pertencentes ao grupo *Siphoviridae* e *Podoviridae* em subfamílias ^[52].

Os restantes 4% dos fagos descritos distribuem-se pelas restantes 7 famílias, onde a ausência de semelhanças impossibilitou que pudessem ser incluídos numa Ordem comum ^[37].

Tabela 1- Classificação dos bacteriófagos por famílias de acordo com a morfologia e tipo de ácido nucleico. (Adaptado de ^[37], ^[52])

		Ordem: Caudovirales				
		Estrutura	Familia	Características	Nº*	Ex.
DNA	dsDNA		Myoviridae	Cauda contráctil	1312	T4
			Siphoviridae	Cauda longa, não contráctil	3262	λ
			Podoviridae	Cauda curta	771	T7
		Não inseridos em nenhuma Ordem				
			Corticovirida	DNA(C), cápside complexa e lipidica	3?	PM2
			Tectiviridae	DNA(L), pseudo-cauda	19	PRD1
			Plasmavirida	DNA(C), envelope lipidico, s/ capsíde	5	MVL2
	ssDNA		Microviridae	DNA(C), capsómeros 'salientes'	38	φX174
		Inoviridae	DNA(C), filamentos	66	fd	
RNA	dsRNA		Cystoviridae	RNA(L), envelope lipidico	3	φ6
	ssRNA		Leviviridae	RNA(L), idêntico ao poliovirus	38	MS2

2.4. Ciclo de vida

À semelhança dos outros vírus, os bacteriófagos não possuem sistemas geradores de ATP nem os sistemas necessários à síntese das suas próprias proteínas e ácidos nucleicos. Consequentemente, o seu processo de replicação depende do metabolismo das células hospedeiras susceptíveis ^[19].

2.4.1. Adsorção e penetração do ácido nucleico viral

A replicação viral implica a ocorrência de uma sequência de etapas que se inicia com a adsorção viral, um processo complexo que envolve a interacção de proteínas virais com os receptores de superfície presentes nas células hospedeiras ^{[53],[54]}.

Quase todos os componentes presentes na superfície bacteriana, incluindo o flagelo, pili, cápsula, LPS e proteínas, servem de potenciais receptores para os bacteriófagos ^[55]. Esta enorme variabilidade possibilita que a mesma bactéria possa ser infectada por diferentes fagos bem como permite que existam receptores alternativos para o mesmo vírus.

Estudos recentes concluíram que a especificidade dos bacteriófagos é muito diversa. Assim, apesar de a maioria possuir um espectro de acção muito restritos existem fagos capazes de infectar bactérias de múltiplos géneros ^{[52], [53], [56]}.

Devido à ausência de estruturas capazes de lhe conferir mobilidade, o contacto inicial com a célula bacteriana ocorre através de colisões aleatórias promovidas pelos movimentos brownianos da partícula viral ^{[53],[57]}.

Apesar dos mecanismos de interacção molecular serem específicos para cada associação vírus-hospedeiro e poderem apresentar diferenças acentuadas, é frequente que o processo de adsorção se divida em duas etapas. Geralmente a primeira etapa consiste no estabelecimento de uma ligação reversível com a superfície celular, mediado pelas fibras da cauda ^{[55],[58]}.

Posteriormente, a ligação específica e irreversível dos RBPs do bacteriófago com os receptores alvo da bactéria, promovem uma complexa alteração na conformação da partícula viral permitindo a libertação do seu genoma através da cápside ^{[55], [59]}.

Desta forma, poucos segundos após a ligação ao receptor inicia-se a transferência do ácido nucleico em direcção ao citoplasma bacteriano através de um mecanismo que ainda não se encontra totalmente esclarecido ^{[54], [59]–[61]}.

Os fagos que possuem caudas contrácteis conseguem penetrar a parede celular e injectar o genoma directamente no citoplasma da bactéria ^[57].

Na penetração do material genético no interior da célula bacteriana podem estar envolvidos factores como o gradiente electroquímico, moléculas de ATP ou a quebra enzimática da parede celular catalisada por hidrolases do peptidoglicano de origem viral [52], [54].

A maioria das partículas virais injecta o ácido nucleico associado a proteínas específicas e em alguns casos a entrada de DNA na célula ocorre de forma gradual, sendo a transcrição e tradução da primeira fracção um requisito essencial para a entrada do restante genoma [54], [59].

Independentemente do bacteriófago, após a penetração, a partícula viral vazia permanece associada à superfície bacteriana [57].

2.4.2. Divergência pós-infecção

Dependendo do tipo de bacteriófago e do estado fisiológico da célula bacteriana, o ciclo de vida do vírus pode divergir numa via litica ou lisógena, o que implica diferentes consequências tanto para a célula hospedeira como para a perpetuação da infecção viral. Desta forma, caso o genoma presente no citoplasma seja proveniente de um bacteriófago virulento vai ser inevitavelmente iniciado um ciclo lítico que irá culminar na lise da célula bacteriana. Pelo contrário, a infecção pelos fagos temperados, por possuírem genes reguladores de ambos os ciclos originam uma situação mais complexa que implica uma decisão inicial entre a lise ou a lisogenia celular [50], [58].

Esta decisão pode ser influenciada por parâmetros ambientais e fisiológicos que incluem tanto o estado nutricional, metabólico e dimensão da célula hospedeira como a proporção de partículas virais relativamente ao número de bactérias susceptíveis. [58], [62]–[64].

Nestes casos, o ciclo lítico é vantajoso quando o crescimento e metabolismo das células hospedes são adequados à perpetuação viral enquanto a lisogenia representa uma estratégia de sobrevivência quando não se verificam as condições adequadas [57], [63].

No entanto, existem vários estudos descritos na literatura que relatam o facto de numa população clonal de bacteriófagos, estes poderem seguir diferentes vias quando sujeitas a condições idênticas [58], [64].

Esta variabilidade na expressão dos genes reguladores é frequentemente associada ao comportamento estocástico das células, que pode ou não conferir-lhes vantagem mediante situações de *stress* [62], [64]–[67].

2.4.2.1. Ciclo Lítico

Quando prevalece o ciclo lítico a transcrição viral é iniciada logo após a penetração do genoma do bacteriófago ^[57]. Para que tal seja possível é necessário recorrer à RNA polimerase bacteriana, que vai ser previamente modificada de forma a reconhecer os promotores do ácido nucleico viral. Caso esta enzima seja codificada pelo próprio vírus, posteriormente passará a ser ele o responsável pela sua síntese ^[52].

Os primeiros genes a serem expressos codificam a produção de proteínas reguladoras envolvidas na modificação da célula hospedeira e na replicação viral. Estas proteínas vão fazer com que a bactéria perca a capacidade de replicar e transcrever o seu próprio genoma ^[50]. Consequentemente, o bacteriófago passa a controlar o metabolismo bacteriano em seu benefício.

Posteriormente, são sintetizadas as proteínas estruturais e catalíticas essenciais para morfogénese da partícula viral. Dado que a cabeça e a cauda são sintetizadas de forma independente, após o empacotamento do ácido nucleico no interior da prócapside é necessária a junção de ambas as estruturas de modo a se obterem partículas virais maduras ^[61].

Na fase final do ciclo são expressos os genes que codificam a síntese de holina e lisina, enzimas capazes de danificar a integridade da membrana citoplasmática e da parede celular bacteriana respectivamente. Desta forma, são responsáveis por promover a lise da célula hospedeira e a consequente libertação das partículas virais maduras recém-formadas, que poderão posteriormente infectar outras bactérias perpetuando a infecção viral (figura 4) ^[50], ^[61].

2.4.2.2. Ciclo lisógeno

Esta via ocorre quando o ácido nucleico de um fago temperado é integrado no cromossoma ou no plasmídeo da célula hospedeira. Consequentemente, o prófago passa a comportar-se como um segmento do genoma bacteriano, replicando-se em sintonia com ele (figura 4) ^[50], ^[57]. Para tal, é sintetizada a proteína repressora responsável pela inibição do promotor necessário à expressão dos genes da cascata lítica. A capacidade do gene repressor se auto-regular permite que a estabilidade lisogenica seja mantida por tempo indeterminado ^[50], ^[58], ^[64].

Apesar do estado lipogénico ser extremamente estável não é irreversível, razão pela qual este tipo de fagos são frequentemente associados a ciclos de vida imprevisíveis. Apesar da reversão espontânea apenas ocorrer em média uma vez em cada 10^8 gerações celulares,

esta pode acontecer frequentemente em resposta ao estímulo adequado ^[58]. Entre estes estímulos destacam-se os agentes que capazes de provocar danos celulares, a temperatura e mediante outras alterações fisiológicas propícias ^{[58],[57]}.

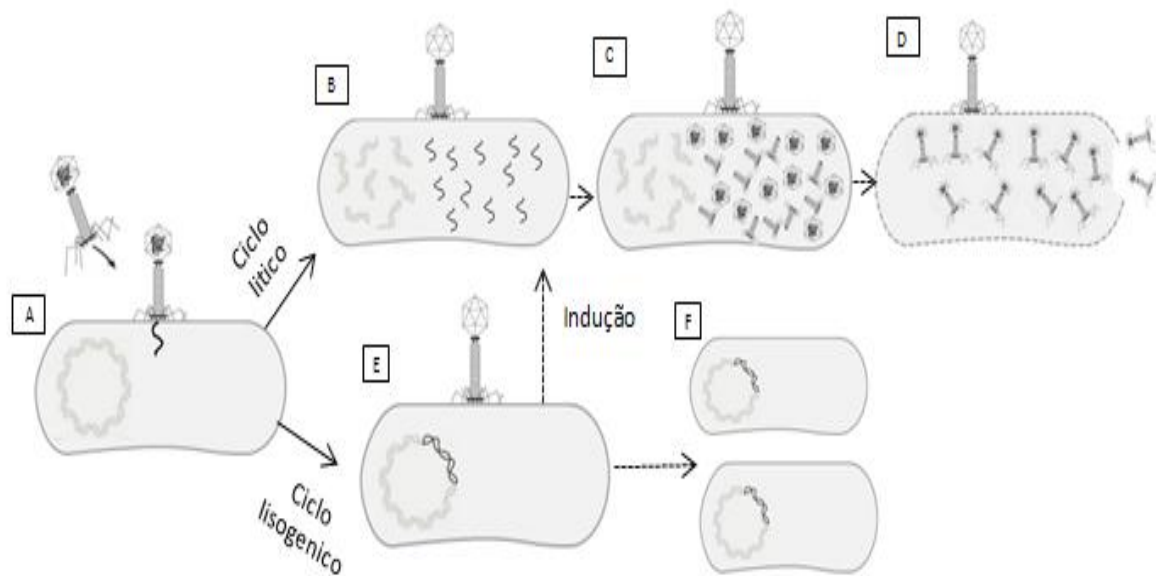


Figura 10: Ciclo de vida dos bacteriófagos; A- adsorção e penetração do ácido nucleico do bacteriófago na célula hospede; B- Degradação do genoma bacteriano e replicação do ácido nucleico viral; C- Síntese independente da cabeça e cauda do fago; D- Montagem e obtenção da partícula viral madura e consequente lise bacteriana; E- Incorporação do ácido nucleico viral no genoma bacteriano; F- Obtenção de células-filhas lisogênicas;

3. Bacteriófagos como agentes terapêuticos

O facto do processo de replicação dos bacteriófagos poder culminar na lise das células bacterianas faz com que estas partículas virais representem uma alternativa terapêutica viável para as infecções bacterianas ^[68]. Pelo motivo referido anteriormente, os bacteriófagos virulentos são os mais adequados para este fim ^[69] como tal ser-lhes-á atribuído maior ênfase no presente capítulo.

3.1. Farmacocinética

Por descrever a acção do organismo sobre determinado agente terapêutico, o conhecimento das respectivas características farmacocinéticas é essencial na prática clínica para a selecção de um regime posológico que consiga simultaneamente evitar reacções de toxicidade e assegurar a sua eficácia terapêutica.

Contrariamente aos agentes farmacológicos convencionais, os bacteriófagos como organismos vivos possuem a capacidade de interagir, replicar e evoluir o que consequentemente faz com que possuam propriedades farmacocinéticas mais complexas e menos previsíveis ^{[70], [71]}.

3.1.1. Translocação

À semelhança do processo de absorção de fármacos, translocação é a designação dada à passagem de microrganismos estranhos através da barreira epitelial para o sistema circulatório e linfático, fazendo parte da patogénese de algumas doenças infecciosas. Por esse motivo, esta etapa apenas é aplicável a vias de administração sistémica tal como a *per os*, intramuscular ou rectal. Vários estudos em animais foram realizados com o intuito de analisar a passagem de bacteriófagos através da mucosa do TGI tendo verificado em todos eles a presença de sérica de fagos ainda que com significativas flutuações interindividuais ^{[72]–[76]}. No longo percurso da fagoterapia, alguns médicos optaram pela via oral como forma de minimizar os efeitos adversos promovidos pelas toxinas ^{[47], [72], [77]} tendo incentivado alguns investigadores a procederem ao estudo desta via em humanos com obtenção de resultados semelhantes ^{[78], [79]}.

Com o objectivo de identificar as sequências envolvidas na translocação dos fagos através da mucosa intestinal Duerr *et al* (2004) verificaram que apesar do fago M13 ser incapaz de ser translocado, a modificação de determinados péptidos da sua cápside possibilitavam o reconhecimento do fago pelos enterócitos promovendo a sua passagem para a corrente

sanguínea sem comprometer a sua actividade biológica ^[80]. Daqui se destaca a influência da estrutura proteica da cápside viral no seu reconhecimento pelos enterócitos, células M e dendríticas envolvidas no transporte do fago para a corrente sanguínea ou linfática, o que explica o facto de nem todos os fagos serem bem sucedidos neste processo. À semelhança das bactérias, é provável que este processo seja ainda influenciado por factores como a concentração viral e a integridade da barreira intestinal ^[81].

Tipicamente a variabilidade da biodisponibilidade é uma das desvantagens da via oral que no caso da fagoterapia é potenciada pela instabilidade das partículas virais no conteúdo gástrico bem como a incerteza em torno do mecanismo exacto da translocação que permanece por esclarecer ^[73].

A limitação da via oral associada ao facto da via IV requerer uma pureza superior, fazem com que a administração tópica seja considerada, sempre que possível, a via de administração de referência na fagoterapia ^{[73], [82]}.

3.1.2. Distribuição

Dependendo do local da infecção alvo, o fago pode ter de se movimentar da corrente sanguínea para outro compartimento do corpo numa etapa vulgarmente conhecida por distribuição. Apesar dos mecanismos associados à distribuição permanecerem por esclarecer, o facto da infecção bacteriana aumentar a permeabilidade tecidual pode estar relacionada com este processo ^{[73], [83]}.

A distribuição dos fagos séricos para o tecido alvo é descrita por uma cinética de primeira ordem, ou seja, a quantidade de bacteriófagos distribuído por determinada unidade de tempo é directamente proporcional à sua concentração plasmática até a maquinaria necessária à translocação estar saturada. No entanto, esta cinética só é aplicável se a concentração viral plasmática for elevada ^[83].

3.1.3. Metabolização

Tipicamente metabolização é o conjunto de reacções enzimáticas necessárias para promover alterações químicas num determinado fármaco que pode tanto dar origem ao seu metabolito activo como torna-lo mais polar facilitando a sua excreção do organismo. No caso dos bacteriófagos esta etapa inclui a activação dos bacteriófagos associada à capacidade de auto-replicação *in situ* bem como a sua inactivação pelo sistema imunitário ^[47].

3.1.3.1. Auto-replicação *in situ*

À semelhança dos restantes antimicrobianos, a administração do bacteriófago adequado na dose suficiente vai promover a redução do número de bactérias susceptíveis ou a sua erradicação num processo designado por infecção primária ou terapia passiva. No entanto a capacidade de se auto-replicarem possibilita que a lise celular originada pela infecção primária liberte novos fagos recém-sintetizado também eles capazes de infectar possíveis bactérias remanescentes num processo conhecido por infecção secundária ou activa [70], [71].

Para que a infecção primária ocorra é necessário que seja assegurada uma concentração sérica mínima de bacteriófagos designada por *Inundation threshold* (V_i) e que deve ser superior à sua Clearance (V_c) [70].

Como o contacto inicial com a célula bacteriana ocorre através de colisões aleatórias [53],[57] a probabilidade de um bacteriófago contactar e infectar a bactéria alvo depende também da concentração de bactérias susceptíveis no organismo. Deste modo, o sucesso da fagoterapia é condicionado pelo tempo (T_p) necessário para que a população bacteriana atinja o limiar de proliferação (X_t), ou seja, atinja a concentração mínima de bactérias necessárias para que seja possível replicação dos fagos administrados [70], [71], [83].

Caso a administração seja demasiado precoce ou a dose inicial demasiado reduzida, os fagos presentes na formulação vão sendo gradualmente eliminados antes de ser atingido o T_p , conduzindo à ineficácia da terapêutica. Desta forma, o tempo óptimo de administração dos bacteriófagos deve ser o mais próximo possível do momento em que o limiar de proliferação é atingido [70], [71].

Caso a dose inicial apenas possibilite a redução da concentração bacteriana mediada pela infecção primária, os fagos libertados pela lise das bactérias vão aumentando exponencialmente até a população bacteriana ser totalmente eliminada [70].

Com base no mesmo raciocínio, a administração combinada com outro agente antibacteriano antes do T_p vai promover uma redução do número de bactérias presentes aumentando consequentemente o tempo necessário para que seja atingido o X_t . A eliminação gradual de bacteriófagos durante este período de pré-proliferação vai impossibilitar a infecção secundária, não se verificando por isso vantagens terapêuticas desta associação nas referidas condições [70], [71]. Pelo contrário, a sua administração concomitante vai ser sinérgica após ser atingido o limiar de proliferação conduzindo a uma maior eficácia terapêutica [70].

Apesar da importância do T_p , na prática é complicado fazer uma análise precisa e rápida do estado infeccioso num doente em particular dificultando a escolha da dose a administrar e

qual o momento ideal para o fazer. Como forma de ultrapassar este obstáculo, *Payne et al* sugerem a administração de pequenas doses repetidas até ser atingido o limiar de proliferação [70].

3.1.3.2. Inactivação pelo sistema imunitário

A capacidade dos bacteriófagos interagirem com células do sistema imunitário permite que sejam reconhecidos como partículas estranhas ao organismo, o que consequentemente promove a sua rápida eliminação sérica [84], [85]. As defesas do organismo podem ser agrupadas de acordo com a sua especificidade em sistema imunitário inato e adquirido, desempenhando ambas um papel sinérgico na sua eliminação.

3.1.3.2.1. Sistema imunitário inato

A primeira observação da influência do sistema imunitário sobre os bacteriófagos foi feita em 1921 por Appelmans *et al* quando observou que os fagos administrados aos coelhos parentericamente tinham rapidamente desaparecido da corrente sanguínea e se encontravam retidos no baço (citado por [77]). Ao administrar o fago lambda a ratos não imunes, Geier *et al* observou um fenómeno semelhante a Appelmans, *no entanto* a ausência de anticorpos específicos permitiu ainda ter a percepção da importância e efectividade da resposta inata na eliminação dos bacteriófagos séricos [86].

A resposta celular inata é mediada por células fagocitárias que exibem receptores de reconhecimento de padrões moleculares de microorganismos (RRPMM), que tal como o próprio nome indica reconhecem moléculas específicas na superfície dos bacteriófagos vulgarmente designadas por PAMP. Por representarem uma espécie de assinatura microbiana, da adesão destas moléculas aos RRPMM vão resultar modificações na organização dos elementos contrácteis dos fagócitos levando à ingestão das partículas virais. Após activadas, as células fagocíticas vão secretar diversas moléculas microbicidas e citocinas imunoreguladoras que vão induzir a morte e degradação do bacteriófago [87].

Segundo o estudo realizado por Inchley *et al* a acumulação dos fagos administrados por IV nos ratos foi muito superior no fígado relativamente ao baço, destacando a importância das células de Kupffer relativamente aos restantes macrófagos na eliminação mediada pelo SRE [88].

A resposta humoral é mediada pelo sistema do complemento que pode ser activado por 3 vias distintas que convergem na síntese da proteína C3 e culminam com a lise da célula alvo [87].

Através da administração IV de um péptido do fago T7 em ratos, Sokoloff *et al* confirmou a correlação entre a sequência proteica presentes na cápside viral e a capacidade do fago persistir em circulação. De acordo com os resultados do mesmo estudo, foi ainda possível observar que os péptidos que exibiam um carboxil terminal com resíduos de lisina ou argina ao se associarem à PCR eram capazes de evitar a inactivação mediada pelo sistema complemento ^[89].

O mesmo não se verifica nos humanos já que os fagos séricos resistentes parecem ser aqueles que apresentam um C-terminal com resíduos de tirosina, cuja proteína protectora se de suspeita ser a α 2-macroglobulina ^[87].

3.1.3.2.2. Sistema imunitário adquirido

Num primeiro contacto, determinados fragmentos do complemento após se associarem co valentemente à superfície da partícula viral facilitando o seu reconhecimento pelos receptores específicos do complemento existentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Após a endocitose, as APC vão exibir os epítomos presentes na superfície do fago apresentando-os às células T-helper o que consequentemente estimula a síntese de células B efectoras e de memória possibilitando a produção de anticorpos específicos ^[87]. Deste modo, nos contactos posteriores os anticorpos séricos vão se associar à cauda viral impossibilitando o processo de adsorção do fago à superfície bacteriana ^{[61], [83], [90]}.

3.1.4. Excreção

Além do importante papel desempenhado pelo sistema imunitário na eliminação dos bacteriófagos, sabe-se que estes podem também ser excretados tanto por via renal como entero-hepática devido à sua detecção na urina ^{[73], [91]} e fezes ^[92], respectivamente.

Devido a esta particularidade os bacteriófagos tem sido usados por via sistémica no tratamento de algumas infecções do tracto urinário (ITU) ^{[47], [73],[91]}. No entanto, concentração de partículas virais nestes resíduos é pouco significativa indicando que estas não se tratam das vias de excreção maioritárias ^{[73],[91]}.

3.2. Vantagens da fagoterapia comparativamente à antibioterapia

Tal como foi referido anteriormente, os mecanismos de acção de ambos os agentes terapêuticos bem como os respectivos mecanismos de resistência são diferentes o que faz dos bacteriófagos uma potencial solução para as infecções multi-resistentes ^{[38], [69]}.

Apesar do estreito espectro de acção dos bacteriófagos ser frequentemente considerado uma desvantagem, esta característica pode ser vantajosa em diversas situações. As bactérias resistentes a determinado fago permanecem susceptíveis ao restantes que possuam um espectro semelhante contrariamente ao que sucede com os antibióticos, cuja resistência abrange todos os antibióticos pertencentes à mesma classe. Além disso, a elevada especificidade dos fagos reduz o impacto na flora comensal evitando deste modo o desenvolvimento de infecções secundárias frequentemente associadas ao uso de antibióticos de largo espectro ^{[38], [39], [69], [93]}.

Tal como explicado anteriormente a lise bacteriana possibilita a libertação de novos bacteriófagos no local de infecção, aptos a infectar as restantes células bacterianas susceptíveis. Consequentemente, uma pequena dose inicial é suficiente para ser atingida a eficácia terapêutica, ao contrário dos antibióticos que necessitam da administração repetida de doses superiores para que sejam mantidas as concentrações séricas adequadas ^{[39], [42], [69], [83], [94]}. Desta forma, é possível minimizar não só os custos da terapêutica bem como reduzir a probabilidade de possíveis efeitos adversos ^[69].

Os bacteriófagos também tem mostrado ser eficazes no tratamento de infecções com reduzida irrigação sanguínea ou com formação de biofilmes, situações em que os antibióticos são ineficazes devido à impossibilidade de acederem ao local de acção. Além disso, constituem ainda uma alternativa em situações de alergias que contra-indicam o uso de determinado antibiótico ^[47].

Um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de novos agentes antibacterianos é o facto de se tratar de um processo complexo com elevado investimento económico associado. Pelo contrário e tal como foi referido anteriormente, o facto dos bacteriófagos serem os microrganismos mais abundantes e diversos no ambiente, facilita o isolamento de fagos específicos para a maioria das bactérias patogénicas ^[95]. Além disso, o seu processo de produção e optimização é mais simples, rápido e economicamente mais acessível ^{[69], [93]}.

3.3. Desafios da fagoterapia

3.3.1. Mecanismos de resistência bacteriana aos bacteriófagos

A co-evolução dos bacteriófagos e bactérias ao longo do tempo é o resultado da constante pressão seletiva exercida pelas bactérias que possibilitam a preservação das linhagem bacterianas e simultaneamente estimulam o desenvolvimento de bacteriófagos e estirpes de bactérias com novas estratégias de sobrevivência.

São diversos os mecanismos de resistência conhecidos até à data e tal como seria expectável o processo concreto depende da associação fago-bactéria em questão. Devido a essa mesma complexidade, apenas serão descritos os mecanismos de resistência de forma generalizada.

3.3.1.1. Inibição do processo de adsorção viral

Algumas espécies bacterianas adquirem genes que codificam a síntese de uma proteína que promove a alteração da estrutura ou da conformação tridimensional dos receptores de superfície necessários para o reconhecimento da bactéria pelo bacteriófago.

Outras inibem o processo de adsorção viral através da síntese de polímeros estruturais que formam uma barreira externa, impossibilitando o contacto dos bacteriófagos com o respectivos receptores bacterianos. No entanto, alguns bacteriófagos em resposta a este obstáculo desenvolveram a capacidade de reconhecer e degradar especificamente estes polímeros.

Algumas bactérias produzem moléculas que actuam como inibidores competitivos por possuírem a capacidade de se ligar especificamente aos receptores fágicos, tornando-os indisponíveis para os bacteriófagos ^[96].

3.3.1.2. Inibição da entrada do DNA viral para o interior da bactéria

Embora controverso, alguns prófagos possuem genes que codificam o sistema Sie, um conjunto de proteínas que geralmente se localizam ancoradas à membrana ou associadas a componentes desta e que têm como função impedir a entrada de DNA viral no interior da célula bacteriana. Vários foram os sistemas Sie identificados até ao momento, embora poucos tenham sido caracterizados. Como exemplo, pode se considerar o colifago T4 que possui os genes *imm* e *sp* que codificam dois sistemas Sie. Apesar destes sistemas terem diferentes mecanismos de acção, actuam em sinergismo com o objectivo de impedir a

transferência do DNA do bacteriófago para o interior da célula hospedeira. Para tal, o *imm* promove a alteração da conformação do local de injeção do DNA viral enquanto o *sp* codifica uma proteína de membrana responsável pela inibição da lisozima T4 presente na extremidade da cauda do fago impedindo consequentemente a degradação da camada de peptidoglicano bacteriana [96].

3.3.1.3. Clivagem dos ácidos nucleicos virais

3.3.1.3.1. Sistemas de restrição-modificação (R-M)

A maioria das bactérias possuem sistemas R-M, que se pensa ter como função proteger as células bacterianas de genomas desconhecidos. Deste modo, a presença do DNA viral não metilado pode estimular duas respostas diferentes por parte da bactéria: se a proporção de enzimas de restrição presentes for superior relativamente à de metilases, estas enzimas vão catalisar a clivagem do genoma do bacteriófago, impedindo a continuação do ciclo de vida viral. Caso tal não se verifique, o DNA do fago vai ser metilado impedindo a clivagem pelas enzimas de restrição e desencadeando consequentemente a continuação do processo de infecção. Como geralmente as enzimas de restrição predominam, é catalisada a metilação do DNA da célula hospedeira pela metilase impedindo que este seja degradado juntamente com o genoma viral. Dado que a eficiência do sistema R-M é directamente proporcional à quantidade de locais de reconhecimento da endonuclease presentes no DNA viral, alguns bacteriófagos contornam esse obstáculo através da ausência de locais de reconhecimento no seu genoma.

Por outro lado, os colifagos T7 e T3 ao injectarem os seus genomas na célula hospedeira expressam uma proteína específica que vai interagir e inibir alguns tipos de enzimas do sistema R-M, impedindo que estas desempenhem a sua função.

Outros têm como estratégia a aquisição de um gene que codifica a síntese de uma enzima metilase que vai mimetizar a função das metilases bacterianas. Como consequência, bactérias como o *Streptococcus spp.* e *E.coli* desenvolveram sistemas dependentes de modificação (MDSs) capazes de degradar DNA viral metilado ou hidroximetilado. Apesar do fago T4 ser resistente ao sistema MDSs por possuir resíduos de HMC glicosilados, a estirpe *E.coli* CT596 adquiriu o sistema GmrS-GmrD que reconhece e cliva especificamente o genoma com essas características. No entanto, alguns fagos T4 sintetizam a proteína IPI que é injectada juntamente com o genoma viral e que vai interagir e inactivar o complexo GmrS-GmrD, impedindo que este sistema desempenhe a sua função [96].

3.3.1.3.2. Sistema CRISPR-Cas

O *locus* CRISPR está presente em cerca de 40-70% das bactérias^[97] e é geralmente composto por repetições directas e conservadas de aproximadamente 21-48 pb, intercaladas por uma sequência não repetitiva de nucleótidos de 26-72 pb designadas por *spacers* e cujo número e sequência varia entre estirpes^{[96], [97]} Cada *locus* contém associado cerca de 4-20 genes *Cas*^{[96], [97]} e ainda possui na sua extremidade uma região com um elevado conteúdo em adenina e timina que se designa por sequência líder e que funciona como zona promotora da transcrição^{[97], [98]}.

Apesar deste sistema ter sido descrito pela primeira vez em 1987, só recentemente foi identificada a sua função biológica com base na similaridade apresentada entre os *spacers* de algumas bactérias e determinadas sequências de ácidos nucleicos presentes no genoma do bacteriófago ao qual elas eram resistentes. Por esse motivo, a região do genoma viral homóloga ao *spacer* é vulgarmente designada por *proto-spacer*^[97].

Actualmente sabe-se que algumas bactérias no primeiro contacto com determinado bacteriófago adquirem uma pequena sequência dos seus ácidos nucleicos integrando-a no seu próprio genoma através de um mecanismo que permanece por esclarecer. A informação genética de origem viral é mantida no *loci* CRISPR-Cas bacteriano o que possibilita que sejam adquiridos mecanismos de defesa contra esse bacteriófago em possíveis contactos posteriores, funcionando deste modo como um sistema imunitário adquirido da bactéria. Para isso, o CRISPR é transcrito e posteriormente processado e clivado em pequenos crRNA maduros que se vão associar ao complexo *Cas* servindo como modelo para que em contactos posteriores com o *proto-spacer* este possa ser reconhecido e clivado^{[96], [97]}.

No entanto, alguns bacteriófagos possuem a capacidade de contornar facilmente este sistema bastando para isso a troca ou deleção de um único nucleótido do *proto-spacer*^[97].

3.3.1.3.3. Sistema de infecção abortiva (Abi)

Os sistemas de infecção abortiva (Abi) actuam nas etapas cruciais do ciclo de vida viral como a replicação, transcrição, tradução e empacotamento do DNA viral, diferindo dos restantes mecanismos de resistência por culminar com a morte da célula hospedeira^{[96], [99], [100]}. Os diversos sistemas Abi identificados até à data partilham poucas similaridades no seu mecanismo de acção reflectindo a complexa natureza da interacção entre a célula hospedeira e determinado bacteriófago.

Apesar deste sistema estar maioritariamente presente nas bactérias do género *Lactococcus* também já foram identificados em bactérias gram negativo como a *E.coli*, *Vibrio cholerae* e *Shigella dysenteriae* [96], [99].

3.3.1.3.4. Sistema toxina-antitoxina (TA)

O sistema toxina-antitoxina (TA) encontra-se presente numa ampla variedade de procariotas e consiste na associação de pelo menos dois genes, um que codifica uma toxina e outro que antagoniza o seu efeito tóxico [99], [101].

Entre outras funções biológicas, sabe-se que estes sistema intervêm nos mecanismos de morte celular programada, resposta ao *stress* e fazem parte dos sistema de infecção abortiva (Abi), sendo por isso activados como resposta à infecção viral [99]–[101].

Dependendo da sua natureza, a antitoxina é susceptível à acção das RNases ou proteases celulares específicas, cuja instabilidade possibilita a activação da toxina correspondente. A natureza da antitoxina condiciona também a classificação do sistema TA em três grupos diferentes. No sistema tipo I, a antitoxina é um RNA *antisense* complementar ao RNA mensageiro que codifica a toxina, e que cuja interacção impossibilita a sua tradução. O sistema tipo II é o mais prevalente na população bacteriana e por isso é também o mais estudado. Neste caso, a antitoxina é uma proteína instável que interage directamente com a toxina, impedindo a sua actuação. No sistema tipo III, a toxina é uma RNase e a antitoxina um RNA que possui capaz de a neutralizar por interacção com o seu centro catalítico [100].

No entanto, já foram identificados bacteriófagos que codificam a síntese de uma antitoxina que vai mimetizar a acção da que é produzida pela bactéria, conseguindo deste modo contornar o sistema TA [100].

3.3.2. Limitações

3.3.2.1. Estreito espectro de acção

Apesar de existirem bacteriófagos capazes de infectar bactérias de múltiplos géneros, a maioria apenas possui a capacidade de infectar determinadas estirpes de uma única espécie bacteriana [53], [56], [95].

Este estreito espectro de actividade implica a prévia identificação da estirpe bacteriana envolvida no processo infeccioso bem como análise dos bacteriófagos a que apresenta sensibilidade, de modo a assegurar a eficácia terapêutica. Devido ao tempo requerido, trata-

se de uma característica limitante em situações clínicas que requeiram rápida intervenção [69], [72], [93], [95].

Scholl et al ao verificar que a cápsula K1 da *E.coli* funcionava como uma barreira física à adsorção do fago T7, modificou-o geneticamente de modo a expressar a enzima endosialidase capaz de degradar a cápsula bacteriana e consequentemente aumentou o seu espectro de acção [102]. Também com o objectivo de amplificar o espectro de actividade dos bacteriófagos, *Kelly et al* incubou o fago K juntamente com estirpes *Staphylococcus aureus* resistentes. O aumento da pressão selectiva permitiu o isolamento de seis fagos com mutações espontâneas, que quando associados ao *wild-type* numa única formulação apresentavam uma capacidade infecciosa muito mais abrangente [95].

A esta associação de múltiplos fagos com espectros de acção não sobreponíveis numa só formulação dá-se o nome de terapia polifágica ou *cocktail* e aumenta a probabilidade de eficácia terapêutica quando administrado empiricamente [69], [93], [95].

No entanto, tal como referido anteriormente, a terapia polifágica também podem ser personalizada de modo a minimizar a probabilidade de desenvolvimento de resistências bacterianas à fagoterapia [103].

Os *cocktails* standard são formulados de modo a abranger os patógenos bacterianos mais prováveis de estarem envolvidos na etiologia de determinado tipo de infecção [69], [93], [95].

De modo a evitar a administração de fagos desnecessários durante o curso de tratamento, podem ser formulados múltiplos cocktails onde cada um deles abrange uma única espécie bacteriana. Assim, o início do tratamento é feito tendo como alvo a espécie bacteriana mais provável de estar na origem da infecção e só se esta não for eficaz é que se vai tentando as restantes alternativas.

O Instituto George Eliava disponibiliza formulações como o Pyophage® e Intestiphage® usados no tratamento de feridas e infecções gastrointestinais respectivamente. Tanto na Geórgia como na restante União Soviética os cocktails standard são revistos semestralmente de modo a disponibilizarem em cada formulação as estirpes bacteriana que prevalecem em circulação [73], [95].

Apesar destas abordagens serem actualmente aplicadas na prática clínica dos países envolvidos, a complexidade da formulação implica maiores custos associados bem como pode aumentar a probabilidade de interacções com o sistema imunitário [93], [95],[104].

3.3.2.2. *Imunogenicidade*

Tal como referido anteriormente, a acção do sistema imunitário inato em sinergismo com a acção dos anticorpos vão ser responsáveis pela rápida eliminação dos fagos séricos limitando amplamente a eficácia da terapêutica.

No entanto é importante ter em consideração que a amplitude da resposta imunitária é variável sendo influenciada por factores como o tamanho, número e características físico-químicas dos epítomos virais, a dose e via pela qual são administrados bem como pelo facto de se tratar ou não de uma infecção recidivante ^[87]. Como a resposta imunitária é geralmente dose-dependente, uma forma de atenuar ou retardar a clearance dos fagos em circulação é a administração de doses reduzidas ^[105].

Considerando a importância das proteínas estruturais de superfície no reconhecimento dos bacteriófagos pelo SRE, foi desenvolvida e patenteada uma estratégia designada por passagem seriada com o objectivo de atenuar a clearance das partículas virais. Para tal, *Merril et al* fez passar dez vezes uma estirpe do colifago λ e do fago P22 no sistema circulatório do rato, onde entre cada ciclo eram isolados e novamente administrados os fagos remanescentes capazes de persistir por longos períodos no sistema sanguíneo. Desta forma, foi possível o isolamento de fagos que por possuírem uma ou mais mutações na sequência proteica principal da cápside tinham a particularidade de persistir mais de 18h em circulação ^{[72], [83]–[85], [87]}.

Recentemente *Kim et al* procederam à peguilação dos fagos A511 e Felix-O1, processo que consiste na ligação covalente de moléculas de PEG às aminas primárias dos aminoácidos da superfície partícula viral. Ao ocultar os epítomos do fago, a peguilação dificulta o seu reconhecimento pelo SRE, possuindo por isso uma menor imunogenicidade associada. Deste modo, os fagos peguilados apresentaram um tempo de semi-vida de circulação significativamente superior e uma redução da proliferação das células Th1 e esplenócitos bem como dos níveis de citocinas IFN- λ e IL-6 relativamente aos bacteriófagos *wild-type*, em ratos não imunizados. No entanto, o mesmo não se verificou nos ratos imunizados indicando que esta técnica não consegue contornar a resposta imunitária adaptativa ^[105].

É importante destacar que apesar da produção de anticorpos não ser imediata estes podem ser detectados em circulação mesmo antes do início da fagoterapia, cuja explicação pode estar relacionada com o facto dos bacteriófagos se encontrarem amplamente distribuídos no ambiente tornando o contacto prévio uma possibilidade altamente provável ^{[87],[90]}.

Tendo em consideração o perfil de segurança do bacteriófago, perante a presença de anticorpos séricos deve ser considerada a administração de uma dose superior que compense a fracção que vai ser neutralizada ^[72] ou a selecção de um fago diferente com um espectro de acção semelhante.

É ainda importante destacar que o ácido gástrico também actua como uma barreira primária capaz impedir a passagem do bacteriófago para a corrente sanguínea quando este é administrado por via oral. Uma solução que é amplamente utilizada na prática clínica, é a neutralização do conteúdo gástrico previamente antes da administração da terapêutica ^[106].

3.3.2.3. Efeitos adversos

Por definição, um efeito adverso é uma resposta nociva e não intencional resultante da interacção do agente terapêutico ou seu metabolito com estruturas diferentes do seu alvo biológico. Deste modo e contrariamente aos antibióticos de largo espectro, o perfil de segurança da fagoterapia é o reflexo da especificidade dos bacteriófagos para as respectivas bactérias alvo ^{[47], [83]}.

Apesar disso, os estudos farmacocinéticos indicam que as partículas virais interagem também com determinadas populações de células eucariotas como as do epitélio intestinal e do sistema reticuloendotelial (SRE), não estando essa interacção associada ao aparecimento directo de efeitos indesejáveis ^[47].

À semelhança dos antibióticos bactericidas ^{[107], [108]} ao induzirem a lise das células hospedeiras os bacteriófagos promovem a libertação de endotoxinas de origem bacteriana geralmente responsáveis por respostas inflamatórias que em casos mais graves podem conduzir à sépsis ou morte ^{[47], [83], [93], [107], [109]}. Como as exotoxinas são naturalmente segregadas pelas bactérias, pensa-se que as partículas virais apenas aceleram o seu processo de libertação e ao lisarem a bactéria ainda contribuem para cessação da transcrição dos genes que codificam a síntese dessa toxina ^[47].

Tal como foi referido anteriormente, para que a lise bacteriana ocorra é essencial que a enzima holina danifique a integridade da membrana citoplasmática de modo a possibilitar que a lisina consiga aceder ao peptidoglicano ^{[107], [109], [110]}.

Apesar da degradação da membrana ser letal para a bactéria, é a acção da lisina que conduz à perda da integridade estrutural e consequente libertação de endotoxinas ^{[107], [109]}.

Baseado neste processo, uma estratégia para minimizar os efeitos nocivos das endotoxinas consiste selecção ou modificação genética dos bacteriófagos com o intuito de evitar a etapa final da lise bacteriana ^[47].

Desta forma, é possível contornar este problema através da remoção do gene *endolisina*. Alternativamente, *Hagens* e *Blasin* modificaram colifagos filamentosos substituindo o gene

holin por genes letais como o *Bg1II* que codifica a síntese da endonuclease de restrição que degradou irreversivelmente o genoma bacteriano sem culminar com a desintegração da estrutura da bactéria, reduzindo consequentemente os níveis de endotoxina e mediadores inflamatórios séricos ^[107]. Posteriormente, um estudo semelhante foi efectuado com *Pseudomonas aeruginosa* e respectivo bacteriófago do qual foi possível retirar as mesmas conclusões ^[109].

3.3.2.4. Restrição na utilização dos bacteriófagos temperados

Tal como explicado anteriormente, os bacteriófagos temperados diferem dos virulentos pela capacidade de integrarem a sua informação genética no genoma bacteriano replicando-se em sintonia com ele ^{[50], [57]}. Para além do ciclo lisógeno não culminar com a lise da célula hospedeira ainda lhe confere imunidade à superinfecção. Isto é, os mecanismos moleculares do prófago inibem a expressão do genoma e a lise celular mediada por outros bacteriófagos do mesmo tipo originando consequentemente uma infecção persistente ^{[47], [73], [111]}.

Como o prófago passa a comportar-se como um segmento do genoma bacteriano, a presença de genes que codifiquem a síntese de toxinas ou outros factores de virulência, tem como consequência o aumento da patogenicidade estirpe bacteriana ^{[47], [73], [111], [112]}. Esta conversão lisógena é responsável por potenciar a virulência das células hospedeiras, podendo inclusivé ser responsável pela transformação de bactérias comensais em patogénicas ^[112]. Além disso, os bacteriófagos ainda podem adquirir novos genes de determinada célula hospedeira e transferi-los posteriormente para as restantes bactérias que vai infectar. Este processo designado por transdução generalizada possibilita a propagação de genes de resistência aos antimicrobianos e outros factores de virulência entre a população bacteriana ^{[47], [111]}.

3.4. Preparação dos bacteriófagos

3.4.1. Isolamento dos bacteriófagos

O actual conhecimento das características biológicas dos bacteriófagos e das respectivas interacções, permitem relacionar a falta de caracterização e a preparação inadequada dos bacteriófagos com a ausência de eficácia e segurança descrita por alguns investigadores [72], [111], [113]. Daqui se destaca a necessidade de submeter os bacteriófagos a um rigoroso processo de optimização de modo a potenciar os resultados finais da terapêutica [38].

Por serem as entidades biológicas mais abundantes na terra, a natureza constitui um recurso ilimitado para o isolamento de novas estirpes de bacteriófagos. No entanto, sempre que possível esta etapa é simplificada pela sua obtenção a partir de um banco de fagos, ou seja, uma colecção de *stocks* de bacteriófagos previamente isolados e caracterizados biológica e geneticamente [38], [73], [95], [111]. De acordo com os dados fornecidos por *Moineau L.*, sabe-se que até 2009 já existiam nas colecções públicas mais de 450 fagos capazes de infectar mais de 120 espécies bacterianas [114].

Deste modo, após o isolamento de um novo bacteriófago deve-se proceder à sua caracterização preliminar que implica não só a sua classificação taxonómica como a determinação do seu espectro de actividade [111]

É de extrema importância que o fago isolado seja adequadamente armazenado de modo a preservar a sua integridade e evitar alterações nas suas características a longo prazo [114].

3.4.2. Etapas da produção da formulação de bacteriófagos

Desta forma, os bancos são recursos de extrema utilidade na fagoterapia personalizada visto que possibilitam a pré-selecção de um determinado número de bacteriófagos possíveis de abranger a estirpe bacteriana envolvida na etiologia da infecção. Como a selecção do(s) bacteriófago(s) mais adequados para administração é uma etapa crítica capaz de condicionar a eficácia do tratamento, esta decisão deve ser baseada no teste sensibilidade da estirpe bacteriana alvo relativamente a cada uma das estirpes virais previamente seleccionadas [73], [111].

No entanto, os bancos de fagos foram implementados por Félix d'Herelle para fins de investigação [114] e como tal nem sempre cumprem os requisitos para serem utilizados na prática clínica.

Desta forma e pelos motivos enunciados anteriormente os fagos temperados devem ser identificados e excluídos previamente com o auxílio de várias técnicas complementares descritas para essa finalidade em literatura.

O teste do *cross-stricking* que também é utilizado como teste de sensibilidade aos bacteriófagos, implica o cruzamento do fago em análise com células bacterianas sensíveis possibilitando a observação do resultado da interacção fago-hospedeiro (Figura 11) ^{[111],[115]}.

Este teste baseia-se no facto do ciclo lítico culminar com a lise bacteriana que se reflecte *in vitro* através da redução ou mesmo ausência do crescimento bacteriano. Tendo em consideração que tanto os fagos virulentos como temperados possuem a capacidade de seguir esta via, a observação deste fenómeno é inconclusiva. Com base no mesmo raciocínio, a continuidade do crescimento de estirpes bacterianas sensíveis podem reflectir o ciclo lisógeno que é exclusivo dos fagos temperados. Como as células bacterianas se caracterizam pela sua capacidade de adaptação o aparecimento de resistência também se manifesta pela continuidade da proliferação bacteriana.

O facto do estado lisógeno ser revertido em resposta ao estímulo adequado pode ser usado como estratégia para essa distinção. De acordo com a metodologia proposta por Miller, a adição de quantidades crescentes de um agente mutagénico às células bacterianas em diferentes alíquotas vai promover a indução do ciclo lítico de eventuais prófagos integrados. A comparação dos resultados obtidos com o controlo negativo vai possibilitar tirar conclusões dos resultados preliminares obtidos pelo teste do *cross-stricking* ^[115].

O sequenciamento genómico e a análise proteómica da partícula viral além de permitir a detecção da presença de genes repressores e integrases envolvidos na regulação do ciclo lisógeno ^{[111], [113]} ainda possibilita a identificação genes responsáveis pela codificação de toxinas e outros factores de virulência ^{[47], [113]}.

Por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, a amplificação do fago seleccionado requer a sua incubação juntamente com as células hospedeiras adequadas. Por aumentar a diversidade de fagos, esta etapa possibilita a selecção das partículas virais mais virulentas ou que possuam outras características vantajosas ^{[47], [111]}.

Como exemplo Jassim *et al* recorreu à adição de um

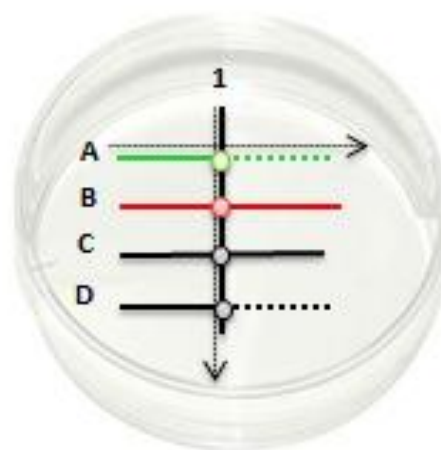


Figura 11: Teste de cross-stricking; 1- Fago em análise; A- Estirpe bacteriana virulenta usada como controlo positivo cujo crescimento é inibido. B- Estirpe bacteriana resistente que por esse motivo o seu crescimento não é afectado; C- Célula bacteriana sensível lisogenizada que se continua a replicar em sintonia com o genoma viral; D- Célula bacteriana sensível lisada como resultado do ciclo lítico do fago;

composto antiviral ao meio de cultura que por degradar os fagos livres, possibilitou a selecção e isolamento dos fagos capazes de adsorver mais rapidamente à célula hospedeira [38].

A recuperação do fago pode ser feita através da indução da lise das células hospedeiras infectadas recorrendo ao auxílio de solventes orgânicos como o clorofórmio, EDTA ou lisozimas. Desta etapa obtém-se não só o bacteriófago mas também detritos bacterianos, partículas fágicas incompletas, metabolitos secundários bacterianos, bactérias sobreviventes, resíduos do meio de cultura e outros compostos não desejados [111]. Por esse motivo, a purificação é sempre uma etapa essencial ainda que o seu grau de exigência dependa da via de administração a que se destinam [47], [111].

Apesar de alguns estudos sugerirem a centrifugação a baixa velocidade seguida de filtração como estratégia eficaz de purificação [47], [111], este método mostrou ser insuficiente visto que apenas permite reter células bacterianas viáveis e outros detritos de grandes dimensões deixando passar através dos filtros as toxinas que possam estar presentes [47], [77].

Vários estudos antigos descrevem graves efeitos adversos como resultado da administração IV de preparações não purificadas, reflectindo o efeito nocivo das toxinas bacterianas e restantes impurezas potencialmente tóxicas [72], [85], [111] e a importância da sua remoção [93].

Como alternativa, é sugerida a adição de PEG para promover a precipitação dos fagos seguida de uma centrifugação em gradiente de cloreto de cézio (CsCl), técnica que permite a separação das partículas fágicas das toxinas e outros detritos que não possuam a mesma densidade [47], [77], [84]. Miller et al verificou que esta técnica era capaz de reduzir as toxinas para 100 vezes menos do que a sua quantidade inicial não conduzindo ao aparecimento de efeitos adversos aos ratos quando administrado por via intraperitoneal [85].

No entanto este método para além de demorado requer a utilização de equipamentos dispendiosos, operadores especializados e não é adequado para a purificação em grande escala, limitando amplamente a sua utilização [111].

Como alternativa, Smrekar et al descreveu a purificação do fago T4 de forma rápida e com um rendimento de 70% recorrendo para isso à técnica da cromatografia em coluna de troca aniónica monolítica [116], [117].

Recentemente, Merabishvili et al descreveu detalhadamente o protocolo da produção, purificação e controlo de qualidade de um cocktail (BFC-1) contra as estirpes prevalentes de *P. aeruginosa* e *S. Aureus*, cujos parâmetros de exigência foram suficientes para ser aprovado num ensaio clínico na Bélgica pela respectiva comissão de ética médica. Segundo este protocolo, o cocktail foi preliminarmente purificado através da sua filtração de modo a remover as células bacterianas e outros detritos de grandes dimensões. Posteriormente as

endotoxinas presentes foram eliminadas com o auxílio do Kit Endotrap® disponível comercialmente ^{[111], [113]}.

que se baseia na passagem do sobrenadante por uma coluna de cromatografia que possui proteínas com elevada especificidade para as LPS covalentemente ligadas à matriz, promovendo consequentemente a retenção das endotoxinas que com ela entre em contacto ^{[113],[118]}.

Para potenciar a segurança da formulação e aprovação pelas entidades regulamentares destaca-se a utilização de meios de crescimento livres de proteínas animais bem como de equipamentos certificados e água estéril apirrogénica com osmolaridade fisiológica na formulação do produto final.

O cocktail foi submetido a ensaios de controlo de qualidade executados por um laboratório externo certificado, que avaliou a morfologia e espectro de acção de cada estirpe bacteriana através da microscopia electrónica de transmissão e procedeu a uma análise genómica e proteómica para confirmar a natureza virulenta do fago e assegurar a ausência de genes desfavoráveis. De acordo com os procedimentos descritos na Farmacopeia Europeia foi ainda avaliado o pH e a esterilidade da solução ^[113].

O BFC-1 foi incubado juntamente com queratinócitos humanos não tendo mostrado qualquer indicio de citotoxicidade bem como a sua administração IV a 3 ratos não originou um aumento de temperatura superior ao limite estabelecido pela Farmacopeia Europeia confirmando a ausência de resposta pirogénica. De acordo com os resultados obtidos no ensaio clínico até ao momento da respectiva publicação nenhum efeito adverso tinha sido notificado confirmando a potencial segurança do cocktail ^[113].

3.5. Fagoterapia na prática clínica

Ao contrário da realidade da Europa Ocidental, países como a Polónia, Rússia e Republica da Geórgia têm recorrido desde o início à fagoterapia como terapêutica de primeira linha no tratamento de infecções de etiologia bacteriana. Desta forma, apesar dos bacteriófagos serem frequentemente encarados como novos agentes terapêuticos, a sua aplicação na prática clínica é mais longa do que a dos antibióticos convencionais. Pelo motivo referido anteriormente, a maioria do conhecimento adquirido é proveniente destes países ^{[70],[119]}.

Desde a fundação do *Instituto Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental (HIET)* em 1952, que milhares de doentes com infecções resistentes a AB têm sido tratados com recurso à fagoterapia na Polónia ^[119]. Desde aí, o Instituto têm-se dedicado ao desenvolvimento de fagos que têm como alvo o tratamento da septicémia, furunculose, infecções do tracto respiratório e urinário e na profilaxia de infecções pós-traumáticas ou pós-cirúrgicas. Baseados na sua experiência clínica publicaram uma série de artigos de revisão relativos ao tratamento de infecções supurativas resistentes a antibióticos de 550 doentes relativos ao período de 1981 a 1986, com taxas de eficácia situadas entre 75-100% (tabela 2) ^{[38], [47], [61], [72], [120]}.

Tipicamente, os estudos documentados pelo HIET caracterizam-se por não serem *double-blind*, não apresentarem grupos de controlo e ocasionalmente usarem antibióticos em paralelo o que reflecte o facto da fagoterapia na Polónia ser encarada como uma terapêutica standard e não como um estudo experimental ^{[38], [47], [72]}. Apesar das limitações, destacam-se por representarem os estudos mais detalhados na língua inglesa que se encontram disponíveis na literatura.

Por sua vez, o EIMBV fundado por d'Herelle na Geórgia rapidamente se tornou um dos principais centros mundiais de investigação e terapia fágica, tendo os seus produtos merecido a aprovação e licenciamento do Ministério da Saúde Soviética ^[119].

Em 1970, este Instituto já possuía 1200 investigadores empenhados na produção de mais de uma tonelada diária de *cocktails* de fagos a partir das amostras de toda a União Soviética ^{[38], [72], [119]}.

Os resultados obtidos promoveram a associação do Instituto com vários hospitais e clínicas que passaram a requerer rotineiramente os seus serviços tanto para fins terapêuticos como profilácticos ^[119].

Actualmente, o *Intestiphage*® por actuar sobre 20 estirpes bacterianas GI diferentes é frequentemente utilizado na profilaxia de infecções nosocomiais na população pediátrica, estando também disponível na farmácia sem necessitar de prescrição médica ^[47].

O Pyophage® tem como alvo as várias bactérias envolvidas nas infecções cutâneas purulentas ou queimaduras. Por este motivo, ambos os cocktails foram extensivamente utilizados pelo exército soviético no tratamento tanto de infecções purulentas e gangrenas como na disenteria e outras patologias GI [38], [47],[119].

Apesar dos estudos publicados pela Geórgia incluírem grupos de controlo, as suas descrições são pouco detalhadas e com análises estatísticas pouco adequadas [119].

Relativamente às publicações russas, além de serem mais escassas que as restantes, geralmente são inacessíveis para todos aqueles que não compreendam russo. Actualmente, o laboratório farmacêutico soviético Microgen é agora o responsável pela produção de uma ampla variedade de formulações de fagos neste país, disponibilizando-os em farmácias sem necessitar de prescrição médica. Esta utilização rotineira da fagoterapia também condiciona os poucos estudos clínicos disponibilizados, que geralmente tendem a comparar a nova formulação de fagos com outras pré-existentes e não com o grupo de controlo [47].

Apesar disso, o elevado número de dados relativos à utilização da fagoterapia em humanos que se encontram documentados são um pequeno reflexo da sua ampla utilização na prática clínica ao longo destes anos. Devido à impossibilidade de serem todos abrangidos no presente trabalho, encontram-se resumidos os estudos mais robustos dos referidos países na tabela 2.

Tabela 2: Resumo de alguns dos estudos mais robustos disponíveis em literatura relativamente à aplicação dos bacteriófagos na prática clínica.

Autor	Patologia	Bactéria(s) alvo	N	Observações
Markoishvili et al	Úlcera venosa	NR	100	70% de eficácia; ⁽¹⁾
Weber-Dabrowska et al	Infecções supurativas	Staphylococcus e várias estirpes bacterianas gram ⁻ ;	56	Dos fagos administrados por via oral 84% foi detectado no sangue e 35% na urina ^{(3),(7),(10)} , resultando numa taxa de cura de 100% dos doentes; ^{(3),(7)}
Slopek et al	Infecções supurativas	<i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> e <i>E.coli</i>	550	A maioria dos casos eram crónicos e resistentes a AB, tendo-se obtido taxas de eficácia entre 70-90%; Não foram incluídos grupos controlo; ^{(1),(2),(3),(4),(5),(7),(8)}
Slopek et al	Infecções do TGI, cutâneas, da cabeça e pescoço	Staphylococcus, Pseudomonas, E.coli, Klebsiella e Salmonella;	550	92% dos doentes ficaram curados; ^{(3),(7)}
Babalova et al	Profilaxia da disenteria	Shigella	30769	Ensaio clínico controlado na população pediátrica, durante 2 anos na Geórgia. Obteve-se uma redução 4 vezes menos incidência de disenteria relativamente ao controlo; ^{(1),(3),(6),(8),(9)}
Markoishvili et al	Úlceras e feridas	E.coli, Proteus, Pseudomonas e Staphylococcus	96	O PhagoBioDerm® mostrou eficácia em 70% dos casos, tendo ainda promovido a cicatrização das úlceras de 22 doentes. ^{(1),(9)}
Lazareva et al	Queimaduras	Proteus, Staphylococcus e Streptococcus	54	O cocktail <i>Pyophage</i> ® normalizou a temperatura e reduziu cerca de 2 vezes a quantidade de Staphylococcus e Streptococcus e cerca de 1,5 a concentração de Proteus; ⁽¹⁾
Sakandelize et al	Infecções alérgicas	<i>Enterococci</i> , <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i>	1390	Do total da amostra, a 360 doentes foram administrados fagos com 86% de eficácia. 404 doentes foram tratados com AB obtendo 48% de cura. Aos restantes doentes foi administrada a terapêutica combinada com uma eficácia de 83%; ^{(1),(3),(7)}

Kochetkova et al	Feridas pós-cirúrgicas em doentes oncológicos	Pseudomonas, Staphylococcus	131	65 doentes foram tratados com fagos e os restantes com AB. A fagoterapia foi bem sucedida em 82% dos casos e os AB em 61% ^{(1),(3),(10)} .
Sakandelidze et al	Peritonite, osteomielite, abscesso pulmonar e feridas pós-cirúrgicas;	Proteus, Staphylococcus e Streptococcus	236	Os fagos administrados por via SC em infecções resistentes a AB durante 5-10 dias e resultou no tratamento da infecção em 92% dos casos ^{(1),(3),(10)} .
Meladze et al	Infecção pulmonar	Staphylococcus	340	Dos doentes tratados com AB (n=117) apenas 64% ficaram curados. Os restantes doentes foram tratados com fagos obtendo 82%de cura ^{(1),(3)} .
Bogovazova et al	Infecção cutânea e da mucosa nasal	K.azaenae, K.rhinoscleromatis e K.pneumoniae	109	Fagos administrados foram efectivos em 100% dos casos; ⁽³⁾
Cislo et al	Úlceras cutâneas supurativas	Pseudomonas, Staphylococcus, Klebsiella, Proteus e E.coli	31	Estudo não controlado em que doentes crónicos foram tratados com fagos por via oral e tópica com uma taxa de sucesso de 74% ^{(3),(4),(7)} . Tratamento interrompido em 7 doentes devido a efeitos GI e eczema ⁽¹⁰⁾ .
Peperanova et al	ITU crónicas	Staphylococcus, E.coli e Proteus	46	92% dos doentes com melhorias clinicas significativas e 84% ficaram curadas ^{(1),(3)} .

3.6. Aprovação regulamentar

Devido à acentuada diferença nas exigências regulamentares entre os países da Europa do leste e a Europa ocidental e EUA, a aprovação regulamentar é um dos maiores desafios da fagoterapia ^[61].

Em 2006 a FDA aprovou o ListShield™, a primeira preparação comercial de fagos a ser permitida como aditivo em alimentos de consumo humano. O facto desta preparação não representar risco para a população, é mais um dos indicadores do perfil de segurança dos bacteriófagos. No entanto, para que possa ser utilizado como agente terapêutico é necessário a realização de ensaios clínicos aleatorizados, controlados e robustos de modo a se evitar possíveis introdução de potenciais viés e possibilitar a obtenção de dados precisos à cerca da segurança e eficácia dos bacteriófagos em humanos ^[82].

Tal como referido anteriormente, as publicações provenientes da aplicação clínica dos fagos documentadas não possuem um desenho de estudo que lhes permita serem comparáveis com os exigentes ensaios clínicos a que os fármacos na Europa ocidental e EUA são submetidos para poderem ter autorização de introdução no mercado (AIM).

Até à data poucos foram os ensaios clínicos aprovados pela EMA e FDA, sendo que só em 2005 foi conduzido o primeiro ensaio de fase I que tinha como objectivo avaliar a segurança do colifago T4 administrado por via oral em voluntários saudáveis. Apesar de ser um estudo pequeno (n=15), não se verificaram efeitos adversos e os bacteriófagos foram bem tolerados ^[92].

Em 2009 foi aprovado pela FDA outro ensaio de fase I que também pretendia avaliar a segurança de um *cocktail* de 8 fagos específicos para estirpes bacterianas de *S.aureus*, *P.aeruginosa* e *E.coli* no tratamento de úlceras venosas nos membros inferiores, não tendo sido reportados efeitos adversos no decorrer do ensaio ^[121].

Ainda no mesmo ano foi conduzido um ensaio de fase I/II aleatório, controlado e *double-blind* que tinha como objectivo a avaliação da eficácia e segurança de uma preparação de bacteriófagos (*Biophage-PA®*) específicos para a *P.aeruginosa* resistente a antibióticos envolvida na etiologia da otite crónica. Para tal, uma pequena dose (2,4ng) foi administrada uma única vez tendo-se obtido uma redução significativa dos níveis da bactéria alvo no ouvido e uma melhoria da condição clínica dos 12 doentes indivíduos submetidos ao tratamento ^[122].

Apesar dos resultados promissores provenientes de uma administração única do *Biophage-PA®*, este foi o primeiro e o único ensaio clínico regulado a testar a eficácia da fagoterapia.

Apesar da EMA considerar os bacteriófagos agentes biológicos, as suas características peculiares como a auto-replicação fazem com que não se enquadrem totalmente na

regulamentação europeia existente para este tipo de agentes terapêuticos. A ausência de guidelines regulamentares específicas representam por isso uma incerteza para os investigadores ao aumentar a probabilidade dos seus investimentos não serem compensados, limitando a aposta no desenvolvimento de novos ensaios clínicos ^[82].

De acordo com a página *online* Clinicaltrials.gov, apenas um ensaio incluindo bacteriófagos no tratamento de doenças infecciosas se encontra a recrutar pacientes ^[123].

Considerações finais

Muitas são as causas prováveis da ausência de investimento na investigação e desenvolvimento de novas classes de antibióticos. Entre elas destaca-se a dificuldade de encontrar um princípio activo que apresente um mecanismo de acção diferente de todos os outros já conhecidos e que simultaneamente apresente outras características essenciais para que possa ser eficazmente usado como antibiótico^{[11], [22]}. Para além da elevada exigência imposta pela FDA e EMA na aprovação de antimicrobianos, o próprio desenvolvimento deste tipo de fármacos é arriscado em termos económicos devido ao elevado risco de toxicidade associado. Pelo mesmo motivo, a aposta no desenvolvimento de fármacos análogos é mais segura dado que o perfil de toxicidade e solubilidade são à partida conhecidos^[5]. É ainda importante ter em conta que caso um potente antibiótico fosse actualmente descoberto o seu uso seria limitado para situações de maior gravidade o que consequentemente iria levar também a um reduzido retorno económico.

Além disso, analisando os fármacos aprovados recentemente pela FDA, é ainda possível verificar que a maioria deles é direccionado para a terapêutica de patologias crónicas ao contrário dos antibióticos que são para tratamentos de curta duração ^{[5], [7], [16]}.

Os obstáculos referidos anteriormente reflectem não só o passado, como permitem prever que a escassez de novos antibióticos se vá manter no futuro. Daqui se destaca a necessidade de investir na investigação de novas alternativas para solucionar as infecções bacterianas multiresistentes.

Recorrendo a novas ferramentas oferecidas pelos novos avanços biotecnológicos, actualmente é possível compreender com maior detalhe tanto a biologia como os mecanismos de interacção dos bacteriófagos. Este conhecimento que foi sendo progressivamente adquirido desde a descoberta dos fagos, possibilita uma interpretação mais crítica dos primeiros estudos publicados em literatura que apontavam para a ausência de segurança e eficácia da fagoterapia e que em parte contribuíram para o seu abandono pela maioria dos países.

Actualmente é possível relacionar os efeitos adversos descritos em alguns desses estudos com a presença de toxinas bacterianas tanto provenientes de formulações de bacteriófagos não purificadas adequadamente como da própria lise celular *in vivo*. Também a ausência de caracterização prévia fazia com que os fagos temperados fossem usados clinicamente, cuja possibilidade de lisogenia se podia reflectir na ausência de eficácia terapêutica. Actualmente sabe-se que os fagos dessa natureza devem ser evitados, não só pelo seu comportamento incerto como pela possibilidade de aumentar a virulência da estirpe bacteriana envolvida na etiologia da infecção.

Além disso, o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes a determinado bacteriófago e a sua rápida eliminação da corrente sanguínea promovida pelo sistema imunitário também representam obstáculos à eficácia da fagoterapia.

No entanto, os avanços biotecnológicos não só disponibilizaram ferramentas para a identificação dos obstáculos como também a capacidade de desenvolver estratégias para os solucionar. Desta forma, algumas destas limitações têm vindo a ser contornadas através da caracterização e selecção prévia dos bacteriófagos a utilizar para fins terapêuticos bem como à purificação e optimização do produto final. Enquanto outras, tem sido minimizadas através da sua modificação genética de modo a que apresentem as características terapêuticas mais adequadas.

Apesar do estigma associado à natureza viral dos bacteriófagos, estes encontram-se omnipresentes na ambiente estabelecendo um contacto íntimo com o homem desde o seu nascimento. Além disso muitas das vacinas comercializadas também elas consistem em vírus atenuados que contrariamente aos fagos, possuem a capacidade de infectar células eucarióticas. Além disso, o *cocktail* (ListShield™) cumpriu os requisitos estabelecidos pela FDA que aprovou a sua utilização como aditivo de alimentos de consumo humano, indicando a sua inocuidade para o organismo.

Desta forma, a aprovação regulamentar destes agentes terapêuticos pela EMA e FDA é provavelmente um dos maiores desafios da fagoterapia.

Além disso, apesar do conhecimento adquirido sobre o comportamento dos fagos *in vitro* e em animais, o pouco conhecimento da sua aplicação *in vivo* tem sido baseado nos estudos publicados pela Europa do leste. A robustez dos resultados que têm sido obtidos pela aplicação clínica da fagoterapia nestes países vai muito além dos exemplos descritos no presente trabalho (tabela 1) visto que desde a descoberta destas partículas virais por d'Herelle que têm representado a terapêutica de primeira linha no tratamento de doenças infecciosas de etiologia bacteriana.

Para além de um grande número destes estudos serem pouco acessíveis devido à barreira linguística, a maioria dos estudos apresentados consistem em relatos dos dados obtidos na prática clínica omitindo por vezes detalhes essenciais como a dimensão da amostra, o modelo estatístico utilizado ou o historial clínico dos doentes, impossibilitando a interpretação dos seus resultados. Além disso, a maioria dos estudos não são aleatorizados, não são double-blind nem possuem controlos, e quando o fazem, fazem-no relativamente a outras preparações de bacteriófagos. Desta forma, apesar dos seus resultados serem entusiasmantes e promissores é essencial a sua distinção de possíveis viés. Esta abordagem é um reflexo não só do menor nível de exigência regulamentar relativamente à imposta pela EMA e FDA como também pelo facto da fagoterapia ser

encarada nestes países como uma terapêutica standard e não como um estudo experimental. É ainda importante referir a actual escassez de estudos farmacocinéticos, que para além dos motivos convencionais são particularmente importantes perante agentes terapêuticos com características tão inovadoras como as dos bacteriófagos.

A contínua emergência de estirpes bactérias multiresistentes associada ausência de novos antibióticos destacam a urgente necessidade de arranjar alternativas para contornar este grave problema de saúde pública. No entanto, na procura de estratégias para contornar este problema é importante ter em consideração o seu carácter provisório. Isto é, como o principal obstáculo à eficácia dos antibióticos consiste na pressão selectiva que eles próprios exercem sobre as bactérias, o desenvolvimento de resistência à terapêutica é inevitável, podendo apenas ser adiado através da sua utilização adequada. De forma semelhante, a interacção fago-bactéria também pode resultar no desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes. No entanto, tal como foi exemplificado anteriormente, as partículas virais diferem dos antibióticos convencionais pela sua capacidade de adaptação espontânea através do desenvolvimento de estratégias de sobrevivência, representando deste modo uma mais-valia em termos terapêuticos. Simultaneamente, o desenvolvimento de resistências pode ser minimizado através do uso de *cocktails* compostos por bacteriófagos com diferentes receptores de superfície para determinada bactéria alvo. Desta forma, caso a célula bacteriana adquira resistência a algum dos fagos, permanece sensível aos restantes que a vão impedir de propagar essa característica à restante população bacteriana ^[103]. Para evitar a ineficácia da terapêutica, na Polónia procedem ainda à monitorização constante da sensibilidade do agente etiológico ao fago administrado, para que caso seja necessário este seja substituído de imediato por outro capaz de infectar a estirpe emergente.

Apesar dos resultados serem promissores, destaca-se a necessidade de desenvolver guidelines regulamentares que abranjam os bacteriófagos bem como a aposta na condução de mais ensaios clínicos e estudos farmacocinéticos de modo a possibilitar uma comparação justa entre a antibioterapia e a fagoterapia.

Face à problemática, hoje mais do que nunca é necessário voltar a analisar criticamente a fagoterapia como uma solução fortemente viável para as infecções multiresistentes.

Glossário

Antibiótico – Designação dada às moléculas naturais ou sintéticas que matam ou inibem o crescimento de bactérias.

Bactericida – Composto que possui a capacidade de promover a morte bacteriana.

Bacterioestático – Composto que possui a capacidade de inibir o crescimento bacteriano.

Estirpe bacteriana multirresistente – Estirpe que possui resistência a três ou mais classes de antibióticos.

Virião - Partícula viral infecciosa completa localizada fora da célula hospedeira.

Nucleocápside – Designação dada à associação da cápside com o nucleóide.

Movimento browniano – Movimento aleatório das partículas originado pela colisão das moléculas de um fluido nas partículas.

Colifagos – Grupo de bacteriófagos cujo hospedeiro são bactérias da espécie *E.coli*.

Profago – Ácido nucleico do bacteriófago integrado no genoma da célula hospedeira.

Lisogenia- Condição da célula bacteriana originada por uma infecção viral em que o bacteriófago não provoca a sua lise, replicando-se juntamente com o genoma bacteriano.

Indução- Alteração de um ciclo de vida lisógeno para um ciclo de vida lítico. Pode ocorrer de forma espontânea ou promovido por um sinal externo.

Estocasticidade celular- Fenómeno aleatório de variações na transcrição e tradução o que se reflecte na variação da expressão dos genes da célula.

RNA antisense- cadeia simples de RNA complementar ao mRNA.

Endotoxina- Porção lipídica do LPS existente na porção externa da parede celular bacteriana, que em contacto com o sistema imunitário do hospedeiro estimulam os macrófagos a libertar citocinas.

Exotoxina- Proteína sintetizada no interior de algumas células bacterianas durante o crescimento e metabolismo celular e que possui a capacidade de destruir parte das células ou inibir determinadas funções metabólicas do hospedeiro.

Endolisina - enzima hidrolase do peptidoglicano que degrada a parede celular bacteriana.

Epitopo – Porção do antígeno capaz de ser reconhecida pelo anticorpo, sendo por isso responsável por induzir a resposta imunitária.

Superinfecção - Termo aplicado em virologia para se referir ao processo em que uma célula hospedeira é co-infectada por mais do que uma estirpe viral.

Virulência - Potencial de um bacteriófago conduzir à lise de uma determinada estirpe bacteriana durante um determinado período de tempo.

Células de Kupffer – Fagócitos mononucleares especializados do fígado.

Resistência adquirida – Ocorre quando uma bactéria que era intrinsecamente sensível a um determinado antibiótico adquire uma mutação ou material genético exógeno que lhe confere capacidade de resistir à actividade do antibiótico.

Anti-codão - Tripleto de bases azotadas que são complementares de um determinado tripleto de bases azotadas existentes no mRNA.

Bibliografia

- [1] A. Fleming, "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929.," *Bull. World Health Organ.*, vol. 79, no. 8, pp. 780–90, Jan. 2001.
- [2] T. Saga and K. Yamaguchi, "History of Antimicrobial Agents and Resistant," vol. 137, no. 3, pp. 103–108, 2009.
- [3] E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, and A. G. Sanders, "Penicillin as a Chemotherapeutic Agent," *Lancet*, vol. ii, pp. 226–228, 1940.
- [4] E. R. M. Sydnor and T. M. Perl, "Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 141–73, Jan. 2011.
- [5] J. Conly and B. Johnston, "Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox.," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 159–60, May 2005.
- [6] J. F. Acar and G. Moulin, "Antimicrobial resistance : a complex issue Pre-existence of antimicrobial resistance determinants Origin of antimicrobial resistance determinants," vol. 31, no. 1, pp. 23–31, 2012.
- [7] B. Spellberg, J. H. Powers, E. P. Brass, L. G. Miller, and J. E. Edwards, "Trends in antimicrobial drug development: implications for the future.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 9, pp. 1279–86, May 2004.
- [8] "Waves of resistance: staphylococcus aureus in antibiotic era European comission," *Research & innovation*. [Online]. Disponivel em: http://ec.europa.eu/research/health/infectious-diseases/antimicrobial-drug-resistance/index_en.html. [Consultado em: 26-Feb-2013].
- [9] A. P. Johnson, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66 Suppl 4, pp. iv43–iv48, May 2011.
- [10] "Bad bugs, no drugs. As Antibiotic Discovery Stagnates... A public health crisis brews.," *Infectious Diseases Society of America*, 2004.
- [11] J. Carlet, V. Jarlier, S. Harbarth, A. Voss, H. Goossens, and D. Pittet, "Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action.," *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 1, no. 1, p. 11, Jan. 2012.
- [12] J. Davies and D. Davies, "Origins and evolution of antibiotic resistance.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 3, pp. 417–33, Sep. 2010.
- [13] D. A. Relman, M. A. Hamburg, E. R. Choffnes, and A. Mack, "Antibiotic resistance: Origins and countermeasures," in in *Microbial evolution and co-adaptation, a tribute to the life and scientific legacies of Joshua Lederberg*, T. national academies Press, Ed. Washington, 2009, pp. 7724–7729.
- [14] "European Centre for Disease Prevention and control," *Annual epidemiological report*, 2012. [Online]. Disponivel em:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/annual-epidemiological-report-2012.pdf>. [Consultado em: 02-Apr-2013].

- [15] R. I. Aminov, "A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future.," *Front. Microbiol.*, vol. 1, no. December, p. 134, Jan. 2010.
- [16] S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, and D. Jabes, "Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 63, no. 8, pp. 423–30, Aug. 2010.
- [17] A. R. M. Coates, G. Halls, and Y. Hu, "Novel classes of antibiotics or more of the same?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, no. 1, pp. 184–94, May 2011.
- [18] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J. Glenn, and M. Jr, "Bacteriophage Therapy MINIREVIEW," vol. 45, no. 3, 2001.
- [19] W. F. C. Ferreira, J. C. Sousa, and N. Lima, *Microbiologia*. Lisboa: Lidel, 2010.
- [20] J. N. Steenbergen, J. Alder, G. M. Thorne, and F. P. Tally, "Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 55, no. 3, pp. 283–8, Mar. 2005.
- [21] P. Murray, K. Rosenthal, and M. Pfaller, *Microbiologia médica*, 6th ed. São Paulo, 2010.
- [22] M. E. Falagas, P. I. Rafailidis, and D. K. Matthaiou, "Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options.," *Drug Resist. Updat.*, vol. 13, no. 4–5, pp. 132–8, 2010.
- [23] K.-F. Kong, L. Schneper, and K. Mathee, "Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology.," *APMIS*, vol. 118, no. 1, pp. 1–36, Jan. 2010.
- [24] R. Raz, "Fosfomycin: an old--new antibiotic.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 1, pp. 4–7, Jan. 2012.
- [25] A. Castañeda-García, J. Blázquez, and A. Rodríguez-Rojas, "Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance," *Antibiotics*, vol. 2, no. 2, pp. 217–236, Apr. 2013.
- [26] M. A. Husain, "Bacitracin, Glycopeptide Antibiotics, and the Polymyxins," pp. 552–556.
- [27] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.," *Am. J. Med.*, vol. 119, no. 6 Suppl 1, pp. S3–10; discussion S62–70, Jun. 2006.
- [28] P. C. Appelbaum, "The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 12 Suppl 1, pp. 16–23, Mar. 2006.
- [29] J. Cremniter, J.-L. Mainardi, N. Josseume, J.-C. Quincampoix, L. Dubost, J.-E. Hugonnet, A. Marie, L. Gutmann, L. B. Rice, and M. Arthur, "Novel mechanism of resistance to glycopeptide antibiotics in *Enterococcus faecium*.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 43, pp. 32254–62, Oct. 2006.

- [30] S. Sujatha and I. Praharaj, "Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review.," *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, vol. 2012, p. 781679, Jan. 2012.
- [31] M. S. Wilke, A. L. Lovering, and N. C. J. Strynadka, "Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 525–33, Oct. 2005.
- [32] A. R. Hauser, *Antibiotic Basics for Clinicians, The ABCs of Choosing the Right Antibacterial Agent*, 2th ed. Philadelphia, 2013.
- [33] W. Ferreira, J. Sousa, and N. Lima, *Microbiologia*. Lidel, 2010.
- [34] J. S. Butel, K. C. Carroll, T. A. Mietzner, E. A. Morse, and G. F. Brooks, "Microbiologia Médica," 2011.
- [35] R. Leclercq, "Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 4, pp. 482–92, Feb. 2002.
- [36] "Ana Raquel Pinto Monteiro Resistência adquirida a quinolonas em," 2011.
- [37] H. Ackermann, "Bacteriophage taxonomy," pp. 90–94.
- [38] G. W. Hanlon, "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 30, no. 2, pp. 118–28, Aug. 2007.
- [39] E. Vandamme, "New phage therapy," no. January, pp. 38–41, 2013.
- [40] M. R. Clokie, A. D. Millard, A. V Letarov, and S. Heaphy, "Phages in nature.," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 1, pp. 31–45, Jan. 2011.
- [41] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J. Glenn, and M. Jr, "Bacteriophage Therapy MINIREVIEW," vol. 45, no. 3, 2001.
- [42] I. U. Haq, W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb, and I. Qadri, "Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review.," *Virol. J.*, vol. 9, no. 1, p. 9, Jan. 2012.
- [43] D. H. Duckworth, "'Who discovered bacteriophage?'," *Bacteriol. Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 793–802, Dec. 1976.
- [44] W. C. Summers, "The strange history of phage therapy.," *Bacteriophage*, vol. 2, no. 2, pp. 130–133, Apr. 2012.
- [45] D. E. Fruciano and S. Bourne, "Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West.," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 19–26, Jan. 2007.
- [46] F. The and F. Of, "An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus," 1917.
- [47] S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections.," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 66–85, Jan. 2011.

- [48] "George Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology." [Online]. Available: <http://www.eliava-institute.org/?rid=2>. [Accessed: 02-Apr-2013].
- [49] A. News, "Phage offer a real alternative To the editor :," vol. 22, no. 5, pp. 505–507, 2004.
- [50] S. Mc Grath and D. van Sinderen, *Bacteriophage, Genetics and Molecular Biology*. 2007.
- [51] E. V. Orlova, "Bacteriophage and Their Structural Organisation," in in *Bacteriophages*, I. Kurtboke, Ed. 2012.
- [52] A. M. King, E. Lefkowitz, M. Adams, and E. B. Carstens, *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2012.
- [53] B. Koskella and S. Meaden, "Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities.," *Viruses*, vol. 5, no. 3, pp. 806–23, Mar. 2013.
- [54] D. V Rakhuba, E. I. Kolomiets, E. S. Dey, and G. I. Novik, "Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell.," *Pol. J. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 145–55, Jan. 2010.
- [55] L. Letellier, P. Boulanger, L. Plançon, P. Jacquot, and M. Santamaria, "Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake.," *Front. Biosci.*, vol. 9, pp. 1228–1339, 2004.
- [56] J. S. Weitz, T. Poisot, J. R. Meyer, C. O. Flores, S. Valverde, M. B. Sullivan, and M. E. Hochberg, "Phage-bacteria infection networks.," *Trends Microbiol.*, vol. 21, no. 2, pp. 82–91, Feb. 2013.
- [57] S. C. Parija, *Textbook of Microbiology & Immunology*. 2009.
- [58] I. Golding, "Decision making in living cells: lessons from a simple system.," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 40, pp. 63–80, Jan. 2011.
- [59] N. Chiaruttini, M. de Frutos, E. Augarde, P. Boulanger, L. Letellier, and V. Viasnoff, "Is the in vitro ejection of bacteriophage DNA quasistatic? A bulk to single virus study.," *Biophys. J.*, vol. 99, no. 2, pp. 447–55, Jul. 2010.
- [60] D. Andres, C. Hanke, U. Baxa, A. Seul, S. Barbirz, and R. Seckler, "Tailspike interactions with lipopolysaccharide effect DNA ejection from phage P22 particles in vitro.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 36768–36775, 2010.
- [61] A. Canada and A. Meeting, "Phage therapy – Everything old is new again," vol. 17, no. 5, pp. 297–306, 2006.
- [62] P. Escherichia, A. Arkin, J. Ross, and H. H. Mcadams, "Stochastic Kinetic Analysis of Developmental Pathway Bifurcation in," 1998.
- [63] C. F. Maurice, T. Bouvier, J. Comte, F. Guillemette, and P. a Del Giorgio, "Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes.," *Environ. Microbiol.*, vol. 12, no. 3, pp. 628–41, Mar. 2010.

- [64] N. In, V. Gene, E. As, A. M. Switch, and F. O. R. V. Latency, "Noise in viral gene expression as a molecular switch" vol. 12, no. 4, pp. 460–466, 2010.
- [65] M. Kaern, T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins, "Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 6, pp. 451–64, Jun. 2005.
- [66] S. Chatterjee and E. Rothenberg, "Interaction of bacteriophage I with its E. coli receptor, LamB.," *Viruses*, vol. 4, no. 11, pp. 3162–78, Nov. 2012.
- [67] R. Losick and C. Desplan, "Stochasticity and Cell Fate."
- [68] A. Sulakvelidze, "The Challenges of bacteriophage therapy," *Microbe*, pp. p.20–24, 2006.
- [69] C. Loc-Carrillo and S. T. Abedon, "Pros and cons of phage therapy.," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 111–114, Jan. 2011.
- [70] R. J. H. Payne and V. a a Jansen, "Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy.," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 42, no. 4, pp. 315–25, Jan. 2003.
- [71] R. J. Payne, D. Phil, and V. a Jansen, "Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 68, no. 3, pp. 225–30, Sep. 2000.
- [72] R. M. Carlton, "Phage therapy: past history and future prospects.," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, vol. 47, no. 5, pp. 267–74, Jan. 1999.
- [73] A. J. Curtright and S. T. Abedon, "Phage Therapy: Emergent Property Pharmacology," *J. Bioanal. Biomed.*, vol. S6, no. 01, 2012.
- [74] G. J. Hildbrand and H. Wolochow, "Translocation of bacteriophage across the intestinal wall of the rat," *Exp. Biol. Med.*, vol. 109, pp. 183–185, 1962.
- [75] R. Keller and F. B. Engley, "Fate of Bacteriophage Particles Introduced into Mice by Various Routes.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 98, no. 3, pp. 577–580, Jul. 1958.
- [76] R. Schubbert, C. Letterman, and W. Doerfler, "Ingested Foreign (Phage M13) DNA Survives Transitly in the Gastrointestinal Tract and Enters de Bloodstream of Mice," *Mol. Genet.*, vol. 242, pp. 495–504, 1994.
- [77] R. Calendar, *The Bacteriophages*, 2nd ed. New York, 2006.
- [78] B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, and S. Slopek, "Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy," vol. 35, pp. 563–568, 1987.
- [79] E. G. Babalova, K. T. Katsitadze, L. . Sakvarelidze, N. S. Imnaishvili, T. G. Sharashidze, V. A. Badashvili, G. P. Kiknadze, A. N. Meipariani, N. G. Gendzekhadze, E. V. Machavariani, K. L. Gogoberidze, E. I. Gozalov, and N. G. Dekanosidze, "Preventive value of dried dysentery bacteriophage," *Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*, vol. 2, pp. 143–145, 1968.

- [80] D. M. Duerr, S. J. White, and H. J. Schluesener, "Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier," *J Virol Methods*, pp. 177–80, 2004.
- [81] A. Górski, E. Wazna, B.-W. Dabrowska, K. Dabrowska, K. Switała-Jeleń, and R. Miedzybrodzki, "Bacteriophage translocation.," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 46, no. 3, pp. 313–9, Apr. 2006.
- [82] H. M. Parracho, B. H. Burrowes, M. C. Enright, M. L. McConville, and D. R. Harper, "The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics.," *J. Mol. Genet. Med.*, vol. 6, pp. 279–86, Jan. 2012.
- [83] S. T. Abedon and C. Thomas-Abedon, "Phage therapy pharmacology.," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 28–47, Jan. 2010.
- [84] J. M. Inal, "Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics.," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 51, no. 4, pp. 237–44, Jan. 2003.
- [85] C. R. Merrill, B. Biswas, R. Carlton, N. C. Jensen, G. J. Creed, S. Zullo, and S. Adhya, "Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 8, pp. 3188–92, Apr. 1996.
- [86] M. R. Geier, M. E. Trigg, and C. R. Merrill, "Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice," *Nat. Rev. Microbiol.*, pp. 221–223, 1973.
- [87] T. Kaur, N. Nafissi, O. Wasfi, K. Sheldon, S. Wettig, and R. Slavcev, "Immunocompatibility of Bacteriophages as Nanomedicines," *J. Nanotechnol.*, vol. 2012, no. i, pp. 1–13, 2012.
- [88] C. J. Inchley, "The activity of mouse kupffer cells t4 bacteriophage," pp. 173–187, 1969.
- [89] a V Sokoloff, I. Bock, G. Zhang, M. G. Sebestyén, and J. a Wolff, "The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display.," *Mol. Ther.*, vol. 2, no. 2, pp. 131–9, Aug. 2000.
- [90] M. Lobočka and W. T. Szybalski, "Advances in virus research, Bacteriophages, Part B," 2013.
- [91] a V Letarov, a K. Golomidova, and K. K. Tarasyan, "Ecological basis for rational phage therapy.," *Acta Naturae*, vol. 2, no. 1, pp. 60–72, Apr. 2010.
- [92] A. Bruttin and H. Bru, "Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally : a Safety Test of Phage Therapy," vol. 49, no. 7, pp. 2874–2878, 2005.
- [93] T. K. Lu and M. S. Koeris, "The next generation of bacteriophage therapy.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 14, no. 5, pp. 524–31, Oct. 2011.
- [94] P. Therapy and J. Ineffective, "Phage in Therapy and Prophylaxis History and Future Prospects," vol. 3, no. 3.
- [95] B. K. Chan, S. T. Abedon, and C. Loc-Carrillo, "Phage cocktails and the future of phage therapy.," *Future Microbiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 769–83, Jun. 2013.

- [96] S. J. Labrie, J. E. Samson, and S. Moineau, "Bacteriophage resistance mechanisms.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 317–27, May 2010.
- [97] H. Deveau, J. E. Garneau, and S. Moineau, "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 64, pp. 475–93, Jan. 2010.
- [98] D. C. Swarts, C. Mosterd, M. W. J. van Passel, and S. J. J. Brouns, "CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition.," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35888, Jan. 2012.
- [99] P. C. Fineran, T. R. Blower, I. J. Foulds, D. P. Humphreys, K. S. Lilley, and G. P. C. Salmond, "The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 3, pp. 894–9, Jan. 2009.
- [100] T. R. Blower, T. J. Evans, R. Przybilski, P. C. Fineran, and G. P. C. Salmond, "Viral evasion of a bacterial suicide system by RNA-based molecular mimicry enables infectious altruism.," *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 10, p. e1003023, Jan. 2012.
- [101] H. Sberro, A. Leavitt, R. Kiro, E. Koh, Y. Peleg, U. Qimron, and R. Sorek, "Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning.," *Mol. Cell*, vol. 50, no. 1, pp. 136–48, Apr. 2013.
- [102] D. Scholl, S. Adhya, and C. Merrill, "Escherichia coli K1 's Capsule Is a Barrier to Bacteriophage T7," vol. 71, no. 8, pp. 4872–4874, 2005.
- [103] A. a Filippov, K. V Sergueev, Y. He, X.-Z. Huang, B. T. Gnade, A. J. Mueller, C. M. Fernandez-Prada, and M. P. Nikolich, "Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice.," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e25486, Jan. 2011.
- [104] B. K. Chan and S. T. Abedon, "Phage Therapy Pharmacology: Phage Cocktails," in *Advances in Applied Microbiology*, 2012, pp. 2–18.
- [105] K.-P. Kim, J.-D. Cha, E.-H. Jang, J. Klumpp, S. Hagens, W.-D. Hardt, K.-Y. Lee, and M. J. Loessner, "PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response.," *Microb. Biotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 247–57, May 2008.
- [106] P. Hyman and S. T. Abedon, *Bacteriophages in health and disease*. 2012.
- [107] S. Hagens and U. Blasi, "Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 37, no. 4, pp. 318–323, Oct. 2003.
- [108] R. G. Holzeimer, "Antibiotic induced endotoxin release and clinical sepsis: a review," *Chemotherapy*, vol. 1, pp. 159–72, 2001.
- [109] S. Hagens, U. Von Ahsen, and A. Von Gabain, "Therapy of Experimental *Pseudomonas* Infections with a Nonreplicating Genetically Modified Phage," vol. 48, no. 10, pp. 3817–3822, 2004.
- [110] V. D. Paul, S. Sundarajan, S. S. Rajagopalan, S. Hariharan, N. Kempashanaiah, S. Padmanabhan, B. Sriram, and J. Ramachandran, "Lysis-deficient phages as novel

- therapeutic agents for controlling bacterial infection.,” *BMC Microbiol.*, vol. 11, no. 1, p. 195, Jan. 2011.
- [111] J. J. Gill and P. Hyman, “Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy.,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 2–14, Jan. 2010.
- [112] T. B. Broudy and V. A. Fischetti, “In Vivo Lysogenic Conversion of Tox Σ Streptococcus pyogenes to Tox 2 with Lysogenic Streptococci or Free Phage,” vol. 71, no. 7, pp. 3782–3786, 2003.
- [113] M. Merabishvili, J.-P. Pirnay, G. Verbeken, N. Chanishvili, M. Tediashvili, N. Lashkhi, T. Glonti, V. Krylov, J. Mast, L. Van Parys, R. Lavigne, G. Volckaert, W. Mattheus, G. Verween, P. De Corte, T. Rose, S. Jennes, M. Zizi, D. De Vos, and M. Vaneechoutte, “Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials.,” *PLoS One*, vol. 4, no. 3, p. e4944, Jan. 2009.
- [114] P. Production and E. S. Lifetimes, “Bacteriophages,” vol. 501, pp. 203–219, 2009.
- [115] R. V. Miller, “Methods for enumeration and characterization of bacteriophages from environmental samples,” in *Techniques in Microbial Ecology*, O. U. Press, Ed. 1998, pp. 218–35.
- [116] A. Manuscript, “NIH Public Access,” vol. 118, no. 1, pp. 1–36, 2011.
- [117] F. Smrekar, M. Ciringer, M. Peterka, A. Podgornik, and A. Strancar, “Purification and concentration of bacteriophage T4 using monolithic chromatographic supports.,” pp. 177–80, 2008.
- [118] “Endrotrap® Standard application protocol.” [Online]. Available: http://www.hyglos.de/uploads/tx_sbdownloader/Standard_Application_Protocol_V0612_02.pdf. [Accessed: 27-Jul-2013].
- [119] E. Kutter, D. De Vos, G. Gvasalia, Z. Alavidze, L. Gogokhia, S. Kuhl, and S. T. Abedon, “Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections.,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 69–86, Jan. 2010.
- [120] S. Chhibber and S. Kumari, “Application of Therapeutic Phages in Medicine,” 2008.
- [121] D. D. Rhoads, R. D. Wolcott, M. A. Kuskowski, B. M. Wolocott, L. S. Ward, and A. Sulakvelidze, “Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial,” *Wound Care*, pp. 240–3, 2009.
- [122] a Wright, C. H. Hawkins, E. E. Anggård, and D. R. Harper, “A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy.,” *Clin. Otolaryngol.*, vol. 34, no. 4, pp. 349–57, Aug. 2009.
- [123] “Clinical trials.gov.” [Online]. Available: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Bacteriophages&Search=Search>. [Accessed: 31-Jul-2013].