



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Multirresistência bacteriana - uma “nova” terapêutica: Bacteriófagos

José Eduardo Cardoso da Rosa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientadora: Doutora Leopoldina Vicente

Covilhã, maio de 2015

Agradecimentos

À Doutora Leopoldina Vicente, pelo apoio prestado durante todo o processo; pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Faculdade de Ciências da Saúde, por toda a aprendizagem, acadêmica e pessoal, ao longo destes anos.

À minha família, por tudo o que me ensinaram, em particular, a nunca desistir dos meus sonhos e pelo seu amor e carinho.

Aos meus amigos, e em particular ao Cantinho do Engodo, por tudo o que levo e que me ensinaram.

Epigrafe

“L'art de la médecine consiste à distraire le malade pendant que la nature guérit la maladie.” – Voltaire

“The art of medicine consists of amusing the patient while nature cures the disease.”
– Voltaire

Resumo

Os fenômenos de resistência bacteriana tem adquirido uma importância crescente como problema de saúde, tanto a nível económico como a nível de morbidade e mortalidade. O uso desmedido levou a uma pressão seletiva positiva sobre os mecanismos de resistência, possibilitando o aumento da prevalência destes fenômenos. A terapêutica com bacteriófagos, uma tecnologia centenária, começou de uma forma primitiva com os primeiros resultados de d'Herelle, tendo sido esquecida nas últimas décadas. O aparecimento da resistência aos vários tipos de antimicrobianos voltou a despertar o interesse neste tipo de terapia. Atualmente muitos estudos estão a ser centrados nas características dos fagos, como a segurança e farmacocinética. Além disto, estão a ser conduzidos ensaios com o objetivo de estudar as capacidades terapêuticas destes em comparação com os antimicrobianos. Depois de devidamente enquadradas as características dos fagos, estes poderão não só ser utilizados como alternativa aos antibióticos, mas também em combinação com estes. Atualmente já existem alguns produtos baseados em bacteriófagos em utilização, como as lisinas, e que apresentam resultados promissores. Assim sendo, a terapêutica com bacteriófagos tem o potencial de se tornar mais uma ferramenta ao serviço da Medicina.

Palavras-chave

Bactérias; Multirresistência Bacteriana; Terapêutica; Bacteriófagos

Abstract

The bacterial resistance phenomena had acquired a growing importance as a health problem, both economically and in terms of morbidity and mortality. The excessive use led to a positive selective pressure on the resistance mechanisms, enabling the increasing prevalence of these phenomena. Therapy with bacteriophages, a century-old technology, began in a primitive form with the first results of d'Herelle, having been forgotten in recent decades. The emergence of resistance to various antibiotics has reawakened interest in this type of therapy. Currently many studies are being focused on the features of the phages, such as safety and pharmacokinetics. Moreover, tests are being conducted in order to study the therapeutic capabilities as compared with those antibiotics. After properly studied the characteristics of the phage, these can not only be used as an alternative to antibiotics, but also in combination with these. Nowadays, there are some products based on bacteriophages, such as lysines, which showed promising results. Thus, bacteriophage therapy has the potential to become a tool of medical service.

Keywords

bacteria, bacterial multiresistance, therapeutic; bacteriophage

Índice

Agradecimentos	ii
Epigrafe.....	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Acrónimos.....	ix
Nota Introdutória	1
1. Multirresistência bacteriana	2
1.1 Etiologia e Epidemiologia	3
1.2 Mecanismos de resistência.....	4
1.3 Antibióticos.....	5
2. Bacteriófagos.....	7
2.1 História.....	7
2.2 Tipos de bacteriófagos, mecanismos de ação e seus produtos.....	8
2.3 Principais tipos de bactérias - alvo	10
2.4 Aplicações dos bacteriófagos.....	10
2.5 Implicações práticas da terapia por Bacteriófagos.....	12
2.6 Métodos de produção de bacteriófagos	13
2.7 Vantagens e desvantagens da terapia por Bacteriófagos.....	14
2.8 Ensaios clínicos	16
Conclusão	17
Bibliografia.....	19

Lista de Figuras

Figura 1 - Formas de aquisição de resistência. Adaptado de Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell. 2007 Mar 23;128(6):1037-50	4
Figura 2 - Mecanismos de ação de vários antibióticos. Adaptado de http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm	5
Figura 3 - Morfologia das Bactérias Gram -Negativas e Positivas. Adaptado de williamenatashabioifes.wordpress.com	10

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número de isolamento com resistência à ampicilina em relação ao número total de isolamentos resistentes por espécie.....	4
---	---

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
EARS-Net	Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana
ESKAPE	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
OMS	Organização Mundial de Saúde
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
UV	Ultravioletas
VIH	Vírus Imunodeficiência humano

Nota Introdutória

Esta monografia teve por objetivo fazer uma revisão atualizada da bibliografia existente sobre a relação entre antibióticos e bactérias multirresistentes, os seus mecanismos de resistência e em particular, os bacteriófagos como uma arma terapêutica alternativa aos antimicrobianos. Esta revisão foi realizada através da pesquisa, em inglês, na base de dados *PubMed*, utilizando as seguintes palavras-chave: *bacteria*, *multiresistence*, *therapeutical* e *bacteriophage*. Houve seleção dos artigos mais relevantes, principalmente por data de publicação, sendo dada prioridade aos mais recentes. Acrescenta-se que toda a bibliografia utilizada foi em língua inglesa. Além disto, foram também pesquisados na OMS, na Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (*EARS-Net*) dados sobre os microrganismos mais prevalentes e quais os antimicrobianos mais atingidos pela resistência. Foram igualmente analisados dados sobre esta temática, entre 2010 e 2014 no Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB).

1. Multirresistência bacteriana

A terapia antibiótica foi um dos principais avanços da Medicina no século XX tendo-se tornado um recurso essencial para o tratamento das doenças infecciosas. Os primeiros antibióticos a serem descobertos foram químicos sintéticos, como o Salvarsan, descoberto por Ehrlich no início do século XX e os inibidores do metabolismo do folato, as sulfonamidas, desenvolvidas por Domagz em 1930. Posteriormente em 1940, Alexander Fleming, um pouco através de sorte e de espírito científico descobriu o primeiro antibiótico biológico - a penicilina. Da descoberta desta aos primeiros achados de resistência foi um pequeno e rápido passo, algo já antecipado por Fleming, em 1946, quando afirma que - “there is probably no chemotherapy drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by in some way acquiring ‘fastness’ [resistance].”. A comprovar este fato, existe o estudo realizado por Barber em 1947, cujos dados comprovam que houve resistência à penicilina, na forma de penicilases que degradavam o antibiótico [1].

A resistência aos antibióticos tornou-se um dos problemas mais sérios de saúde atuais não só pela pressão seletiva exercida pelo uso intensivo de antibióticos, nestas últimas décadas, como pela longa duração do processo de desenvolvimento de novos antibióticos. Para ilustrar a gravidade desta situação e a título de exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA), anualmente, pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes. Além da utilização humana, há a acrescentar o uso de antibióticos na agricultura e pecuária, responsável por cerca de 80 % destas substâncias utilizadas nos EUA (segundo dados de 2011 do Congresso Norte Americano). Segundo um estudo de Chee-Sanford et al. 2009 a maioria destes antibióticos não são transformados e entram em contacto com o ambiente. Estes podem interagir com as bactérias e facilitar um processo de aquisição de resistência. Estas bactérias podem depois contaminar todo o ambiente em redor, não só através da água como através de vetores como animais [2] [3].

A resistência aos antimicrobianos atualmente atinge custos bastante onerosos, sendo que nos EUA tem um impacto estimado de 20 mil milhões de dólares anualmente [4]. Na Europa, o custo total anual associado à resistência bacteriana atinge mais de 1500 milhões de euros, um valor que poderá estar subestimado [5]. Inerente à falência terapêutica está também subjacente o aumento dos dias de internamento, de morbilidade, da persistência do processo infeccioso com consequências a nível da infeção nosocomial, de mortalidade e consequentemente dos custos associados [6]. Por ano, só um organismo - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) - mata mais americanos que o enfisema, VIH/SIDA, doença de Parkinson e homicídio combinados. Este problema pode-se tornar ainda mais grave visto que muitas infeções comuns podem tornar-se intratáveis assim como muitos procedimentos interventivos hoje vistos como naturais, desde cirurgias, à quimioterapia,

transplantação de órgãos ou cuidados de neonatologia, correm o risco de se tornarem impraticáveis. [4] [7].

1.1 Etiologia e Epidemiologia

As principais bactérias, na Europa, onde os mecanismos de resistência surgem são a gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies *Acinetobacter*. Em relação às bactérias gram-positivas estas singem-se principalmente ao *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e espécies de *Enterococcus*. Na maioria dos casos relatados na Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana em 2013 as bactérias são resistentes a pelo menos um dos grupos de antibióticos, em particular às fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3.^a geração e aminoglicosídeos. O fenómeno de resistência tem um padrão na Europa que aumenta do Norte para o Sul e de Oeste e para Este com algumas variações, o que poderá ser explicado pela utilização mais moderada e com maior racionalidade nos países do Norte da Europa [8].

Em Portugal, entre 2003 e 2013, os organismos mais isolados são a *E. coli* e o *S. aureus*, com mais do dobro de casos que *S. pneumoniae*, *Enterococcus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Verifica-se também uma evolução no padrão de resistência, com variações tanto aos diferentes antibióticos como às diferentes estirpes de bactérias [8].

De acordo com os dados, relativos a 2010-2014, fornecidos pelo Serviço de Patologia Clínica do CHCB, no género *Staphylococcus* a espécie *S. aureus* foi a mais isolada e com um padrão de resistência de 92% à penicilina. No género *Enterococcus* a espécie mais representada foi a *E. faecalis* com um padrão de resistência de cerca de 61% à eritromicina. Nos bacilos Gram-negativos (BCN) foi a *E. coli* foi o microrganismo mais representativo e com um padrão de resistência à ampicilina de 51%. No grupo de bacilos não fermentadores a *Pseudomonas aeruginosa* foi a espécie mais isolada e com um padrão de resistência de 100% à ampicilina. Em relação à estirpe *Acinetobacter baumannii* o padrão de resistência foi de 100% em relação à ampicilina [9].

Recorrendo a uma das ferramentas disponíveis, a estatística de isolamentos resistentes distribuída pelo tipo de antibiótico, neste caso específico a ampicilina, no CHCB entre os anos 2010 e 2014, verifica-se que de um modo geral houve um aumento no número de casos com bactérias resistentes à ampicilina, sendo que este antibiótico foi dos que tem um padrão mais alto de resistência, que chega em algumas estirpes aos 100%. Em relação ao *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à ampicilina, o número de casos é relativamente baixo [9].

Tabela 1 - Número de isolamento com resistência à ampicilina em relação ao número total de

Bactérias	Ano				
	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	139/139	138/138	99/100	58/58	2/2
<i>Escherichia coli</i>	423/822	401/830	339/765	442/977	557/1093
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	152/152	170/170	170/170	189/189	265/265
<i>Proteus mirabilis</i>	38/100	39/92	49/109	46/107	55/121
<i>Enterococcus faecalis</i>	36/128	27/110	54/139	60/153	2/143

isolamentos resistentes por espécie

1.2 Mecanismos de resistência

As bactérias podem adquirir resistência através de várias formas, ou seja, estes ganhos de função podem ser de vários tipos, quer através da produção de novas proteínas ligantes à penicilina, mecanismos enzimáticos de alteração de fármacos, alvos terapêuticos alterados, aumento da expressão de bombas de efluxo e alterações da permeabilidade da

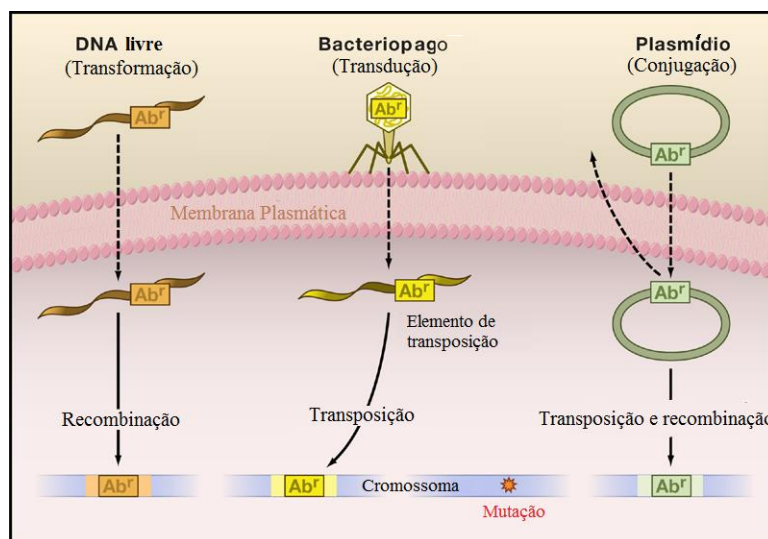


Figura 1 - Formas de aquisição de resistência. Adaptado de Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell. 2007 Mar 23;128(6):1037-50

ocorrer de forma intrínseca ou adquirida. A forma intrínseca é especificada pelos genes presentes no código genético da bactéria, já a adquirida deve-se a mutações nos genes alvos dos antibióticos e pela transferência de determinantes de resistência através de plasmídeos, bacteriófagos, transposões entre outros, por transferências horizontais de genes, dentre as quais transformação, transdução e conjugação [10].

1.3 Antibióticos

Fazendo uma resenha direcionada aos mecanismos de ação de alguns antimicrobianos e em particular aos mecanismos de resistência adquiridos, as **fluoroquinolonas**, constituído por ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina, têm um mecanismo de ação por inibição das enzimas Topoisomerase ou ADN Girase, enzimas essenciais à sobrevivência bacteriana. Os microrganismos adquirem estas aptidões por mutações cromossômicas nas enzimas, alteração de permeabilidade da membrana celular e bombas de efluxo. As principais espécies com resistência são *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* [1] [8].

Os **macrólidos**, eritromicina, espiramicina, miocamicina, azitromicina actuam inibindo a síntese proteica bacteriana. A resistência ocorre por alteração da permeabilidade da membrana celular e inibição enzimática. A espécie bacteriana mais prevalente é *S. pneumoniae* [1] [8].

Os **beta-lactâmicos**, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemes tem um mecanismo de acção por inibição da síntese de peptidoglicano, um componente da parede celular bacteriana. O processo de resistência ocorre por aquisição de informação genética, que codificam enzimas - Beta-lactamases - especificada por plasmídeos e transposões, assim como mutações cromossômicas, que diminuem a permeabilidade bacteriana. A resistência aos carbapenemes surge por alteração na expressão das porinas. As principais espécies representadas são *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *K. pneumoniae* [1] [8].

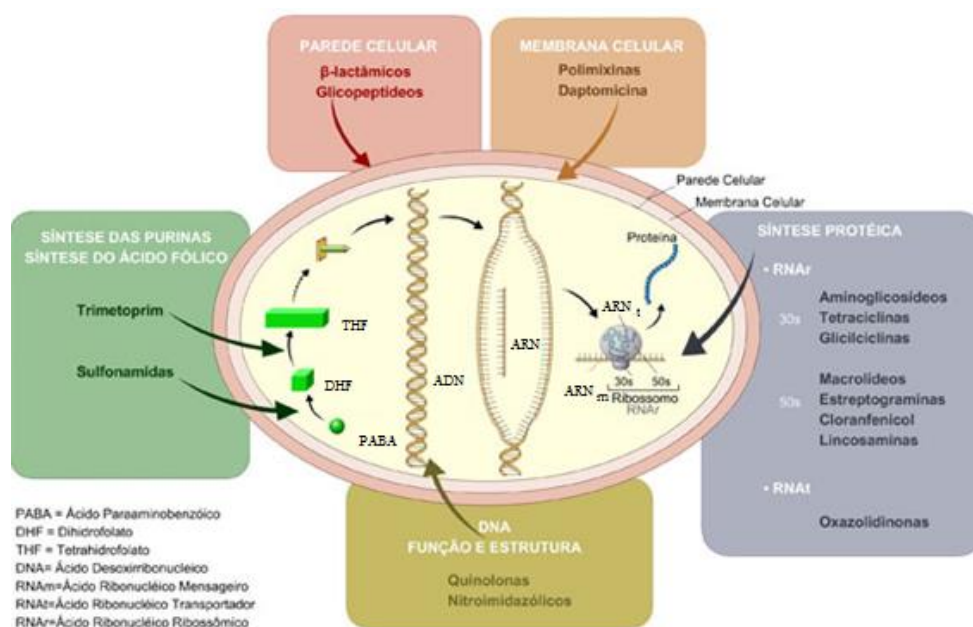


Figura 2 - Mecanismos de ação de vários antibióticos. Adaptado de http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_w eb/modulo1/pop_mecanismo.htm

Os **aminoglicosídeos**, constituído pela estreptomicina, gentamicina, tobramicina e netilmicina, atua por inibição da síntese proteica bacteriana. A resistência deve-se também a enzimas, codificadas por transposões e outros elementos genéticos - acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Além disso também pode ocorrer alterações na permeabilidade. As principais espécies com resistência são *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, e *P. aeruginosa* [1] [8].

Os **glicopéptidos**, como a vancomicina e teicoplanina agem por inibição da síntese do peptidoglicano e alterações da permeabilidade bacteriana. O mecanismo de resistência ocorre pela produção de uma parede celular espessada e pela modificação na síntese do peptidoglicano. As principais espécies com resistência são *E. faecalis* e *E. faecium* [1] [8].

2. Bacteriófagos

Todas as superfícies humanas são colonizadas por microrganismos, tanto bactérias, como fungos, parasitas ou vírus e as interações entre estes e o nosso organismo são responsáveis pelo nosso estado de saúde. Essa correlação tem influência na nutrição, inflamação e imunidade, entre outros. A doença de Crohn é um destes exemplos. Analisando a flora intestinal nos indivíduos afetados por esta patologia, verificou-se que há uma menor variedade de fagos presentes, mas, um maior número de partículas [11].

Sendo os vírus entidades biológicas classificadas como parasitas intracelulares obrigatórios, podem infectar qualquer tipo de célula e estar presentes em todos os ecossistemas [11].

Um dos grupos de vírus mais comuns são os bacteriófagos, cujo nome vem da junção das palavras gregas “*phagein*” e “*bacteria*”, que significam respetivamente comer e bactéria. Estes vírus coexistem com as bactérias e foram um dos principais estímulos à evolução bacteriana, por fornecerem pressão evolutiva, induzirem mutações e adaptações, e por alterarem as *pools* genéticas das bactérias. Existem numa grandeza superior às bactérias que se estima atingir valores de 10^{31} , sendo deste modo ubíquos na natureza. Devido à sua especificidade são considerados antimicrobianos “inteligentes” [11] [12] [13]. Daí que, há coexistência de uma correlação viral com determinadas patologias infecciosas, nomeadamente com a infeção bacteriana, *Streptococcus pneumoniae*, com inerência direta ao vírus da gripe sazonal num número variável de casos [11] [12] [13].

Os bacteriófagos podem ser classificados de diferentes formas, de acordo com a sua morfologia; pelo seu conteúdo genético, ADN ou ARN; pelo seu hospedeiro específico; pelo local onde estão presentes e de acordo com o seu ciclo celular, lítico, lisogénico, pseudo-lisogénico ou infeção crónica [14] [15].

2.1 História

Desde os tempos antigos que se conhecem relatos de curas de certas doenças por águas de rios, como num excerto do Livro dos Reis, em que o General Naamã, doente com Lepra, é aconselhado pelo profeta Eliseu a mergulhar no rio Jordão por sete vezes, ficando curado [16].

Em 1896, o bacteriologista Ernest Hankin demonstrou que as águas dos rios Ganges e Yamuna, na Índia, continham um componente que destruía as culturas de *Vibrio cholerae*, ou seja, que era bactericida para as mesmas, tendo publicado vários artigos sobre uma substância não identificada, que era responsável por este fenómeno e por limitar a disseminação desta

epidemia. Uns anos depois, um bacteriologista russo, Gamaleya, observou um fenómeno semelhante mas com *Bacillus subtilis* [4] [14].

Já em 1915, o microbiologista Frederick Twort, a trabalhar com o vírus *Vaccinia*, em meios de cultura detetou a destruição das culturas bacterianas por um agente filtrável, e além disto, tinham a capacidade de destruir *de novo* outras colónias bacterianas e podiam ser transmitidas por um número infinito de gerações. Este agente não seria capaz de crescer na ausência de bactérias. Twort descreveu-o então como “um fermento, segregado pelo microrganismo”. Twort não perseguiu os seus achados por várias razões e permitiu que os bacteriófagos fossem oficialmente descobertos por Félix D’Herelle [4] [14].

Félix D’Herelle descobriu os bacteriófagos no México em 1910, onde se encontrava a estudar meios de controlo para pragas de gafanhotos e posteriormente nos arredores de Paris em 1915 durante um surto de disenteria hemorrágica grave. Ele acompanhou alguns destes doentes e efetuou filtrados de matéria fecal dos mesmos. Estes filtrados foram cultivados em meios de cultura de ágar e aí D’Herelle identificou pequenas áreas livres - placas - onde estavam presentes os vírus com capacidade de parasitar bactérias [17].

Após a descoberta dos bacteriófagos, D’Herelle começou a utilizar fagos para tratar a disenteria e posteriormente Bruynoghe e Maisin trataram doenças dermatológicas relacionadas com *Staphylococcus*. Houve licenciamentos a empresas privadas como a L’Óreal® em França e a Eli Lilly Company® nos EUA. As aplicações foram maioritariamente em condições infecciosas como abscessos, feridas supurativas, vaginites, infeções respiratórias, mastóideas e intestinais (febre tifoide, disenteria e cólera) [14] [17] [18].

Com a emergência da terapia antibiótica durante os anos 30 e 40, a terapia de fagos foi relegada para um papel secundário, em particular nos países ocidentais, continuando o seu desenvolvimento na União Soviética (Geórgia - *Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology* e Polónia - *Institute of Immunology and Experimental Therapy*) e num menor grau na França. A perda de interesse nos bacteriófagos ocorreu devido a múltiplos fatores, nomeadamente falhas na metodologia dos estudos como a falta de randomização e de grupos controlo. Além disto, certos fenómenos como a fisiologia do fago, a falta de standardização, a resistência bacteriana, o processo de depuração, entre outros, foram ignorados. No entanto, o principal determinante desta perda de interesse foi a introdução da penicilina. Em termos históricos e em jeito de curiosidade, para perceber a importância dos fagos, durante a Segunda Guerra Mundial, o exército alemão utilizava terapia com bacteriófagos, e, alegadamente invadiu a Geórgia com o intuito de controlar um dos principais centros de produção de fagos [14] [18].

2.2 Tipos de bacteriófagos, mecanismos de ação e seus produtos

Os bacteriófagos podem ser de vários tipos - lítico, lisogénico, pseudo-lisogénico e infeção crónica. Todos eles penetram na célula bacteriana através da adsorção aos recetores de membrana bacteriana, o que se revela uma ação reversível. Após a adsorção, o fago liga-se ao recetor, ligação esta irreversível, onde induz a criação de um poro na membrana e injeta o seu material genético no interior da célula, permanecendo todo o material restante fora da bactéria. Os seus genes podem depois ser integrados no genoma hospedeiro ou permanecer no citoplasma [14] [15].

No caso dos bacteriófagos líticos, o material genético inserido vai dirigir a maquinaria celular bacteriana de forma a replicar a informação viral transmitida. Esta replicação ocorre de um modo muito mais rápido que o da própria bactéria. Depois de reunidos e montados os fagos, eles serão libertados por lise da célula bacteriana e tem a capacidade de iniciar um novo ciclo de replicação. Por esta razão, são considerados os agentes antimicrobianos de controlo natural [2] [14] [15].

Em relação aos bacteriófagos lisogénicos, ou fagos temperados, os ácidos nucleicos virais vão ser inseridos no cromossoma bacteriano, onde poderão permanecer silenciosos por longos períodos de tempo, replicando-se juntamente com o restante material genético. Esta capacidade, a lisogenia, vai manter-se até que ocorra indução do início do ciclo lítico. Os principais indutores são os raios UV, peróxido de hidrogénio, alterações de temperatura, hidrocarbonetos poliaromáticos e mitomicina C, entre muitos outros. A lisogenia fornece também imunidade contra a infeção de outros fagos do mesmo tipo, além de que tem muita importância na patogenia bacteriana, pois transmite fatores de virulência através de transferência de genes [2] [14] [15].

A pseudo-lisogenia pode ser considerada uma infeção persistente, em que os fagos apenas se multiplicam numa fração do número total de bactérias, ou seja, existem bactérias sensíveis e resistentes aos fagos. Além disto, é um estado intermédio entre o estado lítico e a lisogenia [15].

A infeção crónica ocorre quando a bactéria, previamente infetada com o fago lisogénico, sofre mutação e perde a capacidade de induzir a lise. Neste caso, a bactéria hospedeira continua a produzir novos fagos, que são libertados por extrusão ou “brotamento” sem que ocorra lise. O material genético fica integrado no cromossoma bacteriano e poderá ser transmitido às gerações futuras [14] [15].

Além da ação antimicrobiana direta dos bacteriófagos, existem outros produtos derivados destes com atividade bactericida como as endolisinas, péptidos antimicrobianos e “facilitadores” terapêuticos [19]

Os bacteriófagos também podem ser utilizados como facilitadores terapêuticos, na medida em que permitem a introdução de material genético nos cromossomos bacterianos, que codificam genes de antimicrobianos tóxicos para as bactérias, através da lisogenia. Além disso, os fagos lisogênicos podem ser utilizados para reverter a resistência aos antibióticos pela inserção de genes que predispõem à sensibilidade a determinados antimicrobianos [19] [20].

As lisinas são enzimas específicas dos fagos que tem a capacidade de degradar a parede celular bacteriana, em particular as ligações do peptidoglicano e deste modo destruir bactérias isoladamente. Estas enzimas permitem uma lise pelo exterior, ou seja, uma lise sem a infecção pelo fago. Contudo, as lisinas possuem uma limitação, uma vez que são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas e não tão eficazes contra as Gram-negativas, uma vez que estas últimas têm uma membrana exterior que impede a atuação das enzimas [3] [21].

Existem diferentes tipos de péptidos antimicrobianos como os fatores líticos e os complexos de fagos com cauda (*tailed phages*). Os fatores líticos, como o nome indica, provocam lise, e, deste modo, assemelham-se às endolisinas. Os complexos de fagos com cauda ligam-se aos seus recetores específicos na membrana bacteriana, penetram através da membrana externa e lisam o peptidoglicano, inserindo de seguida o genoma do fago na bactéria [19].

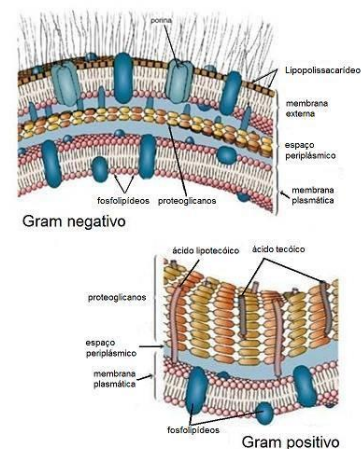


Figura 3 - Morfologia das Bactérias Gram -Negativas e Positivas. Adaptado de

williamenatashabioifes.wordpress.com

2.3 Principais tipos de bactérias - alvo

Um dos principais e mais comuns microrganismos com fenómenos de resistência, e, assim consequentemente alvo para os bacteriófagos é o *Staphylococcus aureus*, além de outros elementos do chamado grupo ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Existem também outros alvos possíveis como o *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* e *Mycobacterium tuberculosis* [22].

2.4 Aplicações dos bacteriófagos

A descoberta dos fagos por Twort e D’Herelle, ocorrida há 100 anos, permitiu, como disse John Kendrew, laureado com o prêmio Nobel “the most dramatic and rapid development in the whole of biology since Darwin and Mendel”. Foi através do estudo dos fagos que se compreendeu a componente genética de transmissão de informação, a própria regulação genética e a relação entre o genótipo e o fenótipo. De uma forma simplista, pode-se dizer que os fagos foram a correia de transmissão de conhecimento, que deram origem às atuais Biologia e Genética Molecular [12].

Embora tenha ocorrido um grande desenvolvimentos no estudo dos fagos, houve poucos resultados no uso de novos bacteriófagos na prática clínica, devido aos muitos constrangimentos, o que provocou uma evolução direcionada para outras aplicações. Na segurança alimentar, um dos exemplos são os produtos dirigidos à *Listeria monocytogenes* e que atuam como agentes esterilizantes de alimentos processados - ListerShield e Listex P100 - e que já se encontram aprovados pela FDA Norte Americana (*Food and Drug Administration*). No ramo da agricultura, houve desenvolvimento de fagos contra a *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas syringae* - Omnilytics Agriphage. Foi recentemente aprovado pela FDA um teste sanguíneo para detetar infeção por *S. aureus*, que recorre a fagos marcados fluorescentemente e por expressão da luciferase, esta última transmitida por fagos através da lisogenia. Outra aplicação é na agropecuária, que desenvolveu fagos contra bactérias que infetam o gado, como *Campylobacter*, *E. coli* e *Salmonella* [4] [13] [23].

O tratamento de águas residuais é outro dos campos de interesse, pois poderá permitir, devido à especificidade dos bacteriófagos, eliminar os microrganismos patogénicos sem impacto nos benéficos. Um dos exemplos de bactéria-alvo dos fagos nesta situação é a *E. coli*, considerada um marcador de contaminação fecal [21] [24].

Uma outra modalidade clínica com bastante relevância no campo dos bacteriófagos é o combate aos biofilmes que contaminam muitos biomateriais utilizados em instrumentos médicos como pacemakers, válvulas cardíacas, algalias, próteses articulares, cateteres de diálise e hemodiálise e tubos de entubação. Os biofilmes são agregados microbianos, eucariotas ou procariotas, que tem um arranjo espacial específico, produzem substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) e deste modo, possuem uma menor suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. Os bacteriófagos atuam contra os biofilmes por produção de enzimas capazes de degradar o SPE, as depolimerases (ou polissacarídeo-liases). Este processo de destruição depende do metabolismo bacteriano, sendo mais eficaz em células em fase de crescimento. As principais bactérias associadas são o grupo ESKAPE e o *Proteus mirabilis* [25].

Existem, atualmente, várias companhias internacionais a produzir fagos ou produtos relacionados entre as quais a Innophage®, sediada no Porto, e que se especializou em infeções bacterianas, assim como produtos cosméticos e ambientais [26].

2.5 Implicações práticas da terapia por Bacteriófagos

A terapia por fagos para ser efetiva depende de uma miríade de fatores como: as suas características-base, se é lisogénico, se produz lisinas, entre outros; as formas de administração mais eficientes; a farmacocinética e farmacodinâmica; à imunologia; os efeitos adversos, com enfoque também para as causas e condições que aumentam ou diminuem a sua síntese. Além disto, a eficácia terapêutica depende de outras condicionantes: o rácio bactéria/bacteriófago; fatores físico-químicos, temperatura, pH; neutralização ou resistência ao fago; extrapolação dos dados *in vitro* para os dados *in vivo*; taxa de adsorção, período latente, período de lise; e finalmente da taxa de depuração das partículas do fago, através do sistema reticuloendotelial ou de anticorpos neutralizantes [13].

Existem outros aspetos a ter em conta, como o rácio bactéria/bacteriófago terem influência na terapêutica, devido ao facto de poderem ser feitas duas abordagens alternativas, a passiva ou a ativa. A passiva baseia-se no princípio de replicação em que o número de bacteriófagos é superior ao de bactérias, e deste modo todas as bactérias serão infetadas e lisadas com fagos primários. A abordagem ativa baseia-se na administração de um número inferior de bacteriófagos em relação às bactérias, mas dependente da capacidade dos fagos se multiplicarem ao longo das várias infeções líticas [13] [19].

Também os fatores físico-químicos podem alterar as condições de sobrevivência dos fagos, visto que o pH pode provocar a desnaturação de determinadas enzimas essenciais ao fago, como por exemplo, se a administração for oral, também o pH gástrico pode acarretar a destruição dos fagos ou sua inativação. A temperatura e os eletrólitos podem igualmente influenciar os bacteriófagos, como a duração do período de latência. O local da infeção também pode influenciar, pois, o acesso às bactérias alvo pode ser dificultado, como no caso das bactérias intracelulares. Contudo, os fagos também tem uma limitação, visto que não se conseguem difundir através das membranas celulares [13].

Em relação à circulação e depuração dos fagos, estes tem a capacidade de circular no sangue e em diferentes tecidos, mas podem ser neutralizados por anticorpos. Esta reação imune não tenderá a ocorrer de forma instantânea, mas ocorrerá de forma faseada, visto que terá de ocorrer primeiro uma exposição e sensibilização aos fagos e posteriormente, através de uma exposição repetida haverá a tal neutralização. [13] [27].

Devido à elevada especificidade dos fagos, pode ser útil a utilização de cocktails com vários tipos de bacteriófagos com o objetivo atingir efeitos sinérgicos e diminuir a probabilidade das bactérias desenvolverem resistência [28].

Os bacteriófagos podem ser administrados de várias maneiras, desde via oral a tópica, intraperitoneal, intravenosa ou intranasal, entre outras. A forma escolhida vai depender da concentração da bactéria, do local da infeção, da dose, do tipo de fago e das condições do meio. Deste modo, existem implicações práticas das diferentes vias, em que por exemplo, a

administração de fagos por via local tem o potencial de produzir anticorpos, ao contrário da administração por via oral. Já na administração intravenosa ocorre uma rápida diminuição dos níveis de fagos, devido ao sistema imune inato, mediado por neutrófilos, macrófagos, e fagocitose no sangue e no fígado [13] [29].

A farmacocinética e farmacodinâmica dos fagos é deveras complexa, pois além de serem estruturas muito maiores que os antibióticos, o número de fagos presentes determina a eficácia da terapêutica, e esta, está totalmente dependente dos fagos conseguirem atingir uma infecção produtiva, através da libertação dos novos fagos pelas bactérias lisadas. Além disto, a virulência dos diferentes fagos também é variável [29].

Como referido, a utilização de fagos pode desencadear reações imunológicas, embora a probabilidade dependa da localização da infecção e do tipo de fagos utilizados. Estas interações entre os bacteriófagos e o sistema imune ocorrem de várias formas. Uma delas é a indução de respostas imunes pela administração dos fagos, principalmente por produção de anticorpos contra os antígenos fágicos, em particular as proteínas da cápside. Estes anticorpos vão impedir a infecção por ligação às caudas dos fagos, assim como iniciar a ativação pelo complemento, que posteriormente irá provocar a eliminação do bacteriófago. A produção de anticorpos requer uma interação entre variadas células imunes, como as células apresentadoras de antígenos, células B produtoras de anticorpos e células T. Ocorrem interações por atividade imunomodulatória, através de alterações nas funções imunes, inata e adaptativa. Os fagos podem aumentar o *turnover* de neutrófilos, aumentando as células imaturas e diminuindo as maduras. Além disto, existem outros efeitos como alterações na expressão genética, como na inibição de um gene pró-inflamatório, o NF- κ B. Assim sendo, os bacteriófagos têm uma ação imunossupressora [27] [29].

No que respeita à terapêutica com bacteriófagos um dos principais riscos advém da libertação de toxinas bacterianas aquando da lise de um número elevado de bactérias. Além disso, pode também ocorrer libertação de lipopolissacarídeos, que também são altamente alergénicos e irão ativar a cascata de citocinas e assim poder levar à multifalência orgânica [14] [29].

2.6 Métodos de produção de bacteriófagos

Está descrito na literatura que o processo de desenvolvimento de terapia com bacteriófagos tem que assentar sobre uma variedade de fatores, essenciais à produção de um bacteriófago eficaz e eficiente. Este método deve assentar primeiro na seleção de um fago altamente lítico, com uma elevada especificidade para a bactéria alvo, com pouca resistência; e se a aplicação vai ser através de um cocktail de vários tipos de fagos ou de um único tipo de fago, permitindo contornar a elevada especificidade. Posteriormente, neste tipo de terapia deve ser estudada a eficácia por estudos de standardização assim como *in vivo* e

in vitro. Depois de caracterizado o fago, devem ser apuradas as doses com efeito bactericida por cálculo do rácio bactéria/bacteriófago e por ensaios visando os efeitos terapêuticos num determinado período de tempo. Os métodos e procedimentos de administração deverão ser otimizados de acordo com o tipo de infeção e o local onde se localiza. A duração do tratamento deve ser previsto através da comparação do tipo de abordagem. Se passivo, se ativo, e dependendo do cálculo do tempo de circulação dos fagos, bem como da resposta imune por eles induzida. A farmacologia, a farmacodinâmica são outros dos parâmetros a serem avaliados antes do início da terapia. Depois de concluídos estes passos, a terapêutica por fagos deve ser monitorizada e revista, através da gestão de riscos, avaliando a imunogenicidade, a presença de endotoxinas e alterações génicas nos preparados de bacteriófagos. Depois desta avaliação rigorosa, estes preparados deverão ser avaliados pelas autoridades competentes com objeto de registo e patenteamento, controlo de qualidade e uniformização do processo [2] [30].

Salientar que a investigação e terapia com bacteriófagos na Europa encontra-se neste momento sem um quadro regulatório específico. Tal pode influenciar negativamente o desenvolvimento de novos fagos, sendo essencial proceder-se a uma regulamentação legal por parte das entidades competentes [30].

2.7 Vantagens e desvantagens da terapia por Bacteriófagos

Como já foi referido anteriormente, a terapêutica com bacteriófagos é um processo bastante complexo que possui algumas barreiras à sua utilização, sendo estas muito variadas. Tanto a ecologia como a heterogeneidade das bactérias e fagos não é totalmente conhecida [2] [19].

A terapia deve ser personalizada para cada doente, sendo a seleção dos fagos altamente específica para poder permitir o desenvolvimento de fagos que não afetarão outras bactérias não patogénicas, além do alvo. Uma outra dificuldade é determinar de uma forma rápida e precisa qual o microrganismo que está a causar a infeção [2] [14] [19].

Podem ocorrer alterações genéticas por transferência de genes de virulência e de resistência bacteriana através da lisogenia. Alternativamente, podem ocorrer alterações na membrana celular bacteriana que impedem a infeção. A perda de genes específicos, necessários à replicação e montagem de fagos também é passível de ocorrer. Assim sendo, a escolha do bacteriófago deve estar limitado a fagos líticos [2] [14] [19].

As condições ambientais também alteram as interações entre o fago e o hospedeiro, devendo os dados sobre fagos serem extrapolados de *in vitro* para *in vivo*, pois uma bactéria produzida em condições laboratoriais não irá obrigatoriamente comportar-se da mesma forma no corpo humano, podendo neste alterar-se de fago lítico para fago lisogénico. [2] [19].

Em casos de doenças provocadas por agentes intracelulares, como a *Salmonella*, não se conhece o mecanismo através do qual o fago é eficaz, uma vez que as bactérias estão localizadas dentro da célula hospedeira, e deste modo, estão inacessíveis ao fago [2].

O isolamento e cultura de bacteriófagos para uso terapêutico é um processo demorado e complexo, em que a preparação de fagos deve, por exemplo, evitar a presença de endotoxinas [2] [19].

Se a administração do fago for por via oral, deve ser feita uma neutralização gástrica [2] [19].

O desenvolvimento e presença de anticorpos bem como a inativação dos bacteriófagos pelo baço, pode afetar a eficiência da terapia [2] [19].

Uma vez que os bacteriófagos são agentes auto-replicantes, a farmacocinética deve ser estudada [2] [19].

Assim sendo, torna-se imprescindível a exigência de um quadro regulatório com suporte legal, pois este é o principal estímulo ao desenvolvimento de fagos, também ao nível do patenteamento. Neste momento, os bacteriófagos não são considerados como produtos medicinais, o que acaba por inviabilizar e tornar incipiente o progresso nesta área [2] [14] [19].

Embora a terapêutica com bacteriófagos possua alguns riscos, necessite de uma avaliação criteriosa e monitorização constante, o que torna este processo e terapia morosas, existem contrapartidas vantajosas que poderão permitir a substituição de antibióticos, e em alguns casos específicos, a sua utilização combinada.

Os fagos são eficazes contra bactérias Gram-negativas e positivas, incluindo os microrganismos com multirresistências.

Ao contrário dos antibióticos, que persistem no ambiente após o seu uso, os fagos são destruídos após a cura da infecção [30].

Outro aspeto importante reside no fato dos fagos serem altamente específicos para a bactéria alvo, e enquanto esta estiver presente, são capazes de se auto-replicar, tornando deste modo desnecessário administrações repetidas. Assim sendo, são autorreplicantes e auto-limitantes. Por serem específicos, diminuem a pressão seletiva o que permite desenvolvimento de estirpes resistentes, e, não têm o efeito adverso de provocar o crescimento secundário de agentes patogénicos, como *Clostridium difficile* e *Candida albicans* [2] [14] [19] [31].

Devido à ubiquidade de fagos presentes na natureza, existe a possibilidade de escolha de fagos com capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica [14].

A terapêutica com bacteriófagos têm também um efeito imunossupressor, através da inibição da resposta inflamatória à infecção [14].

Os recetores dos fagos na membrana celular bacteriana são principalmente fatores de virulência. Nesse contexto, se surgirem estirpes de bactérias resistentes aos bacteriófagos, estas serão menos virulentas. Como os fagos tem uma maior frequência de mutações em

relação às bactérias, se uma bactéria resistente surgir, o bacteriófago deverá rapidamente contornar esta resistência [2] [19] [32].

A terapia com fagos tem muito poucos efeitos secundários. Adicionalmente, não infetam células humanas nem células animais, sendo assim seguros para a utilização clínica. Além disto, podem ser úteis em caso de alergia aos antimicrobianos. [2] [19].

Em termos monetários, outro aspeto também relevante, comparando o custo dos antibióticos com o custo dos fagos, estes últimos, são cerca de 50 % mais baratos, o que permitirá poupanças a nível dos custos de saúde se houver uma maior utilização dos bacteriófagos [7].

2.8 Ensaios clínicos

A terapêutica com fagos começou com d’Herelle em 1919, que utilizou bacteriófagos para tratar várias crianças com disenteria grave. Posteriormente foram utilizadas preparações contra outros vários microrganismos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Serratia*, *Shigella* e *Salmonella*. As indicações eram bastante variadas desde infeções dermatológicas, septicémia, osteomielite, abscessos, infeções urinárias e otorrinolaringológicas, colites e peritonites [4] [14].

Atualmente, na Geórgia e Rússia, ainda são utilizadas formulações de fagos criadas por d’Herelle denominadas *Pyophage* e *Intestiphage*. O cocktail *Pyophage* é dirigido a *S. aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* e várias espécies de *Streptococcus*. A formulação *Intestiphage* tem por alvo várias bactérias entéricas: *Shigella*; *Salmonella*; *E. coli*; *Proteus*; *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Enterococcus*. Um outro campo com utilização de fagos é na área dos queimados [33].

Ao invés da utilização de cocktails praticada na Geórgia, na Polónia recorre-se principalmente a um banco de dados, com centenas de amostras de fagos ativos contra *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*.

Já em 2001 foi realizada uma análise sumária de 1400 pacientes tratados com bacteriófagos que obteve uma taxa de cura de 90%, em casos de otites e meningites purulentas e furunculose. Um outro exemplo foi um estudo sobre terapêutica com fagos em septicémias antibiótico-resistentes com uma eficácia (ou cura) de 85.1% [33].

Nos EUA os ensaios basearam-se em terapêutica para a septicémia e meningite estafilocócicas assim como no tratamento de SARM. Além disso, os fagos também foram utilizados para tratar pneumonia. Em 2008 a FDA aprovou um cocktail de fagos, direcionado à *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, para tratar úlceras venosas crónicas da perna [4] [21].

A bactéria *Propionibacterium acnes*, presente na flora da pele e envolvida na patogénese da acne foi outro dos alvos dos ensaios [21].

Um outro ensaio, realizado no Reino Unido, teve por objetivo avaliar a eficácia de bacteriófagos no tratamento local de otite crônica por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibiótico. Os indicadores clínicos foram de melhor qualidade no grupo tratado com fagos comparativamente com o grupo placebo e adicionalmente também não foi relatado qualquer tipo de efeito adverso [34].

Na Bélgica, através de uma equipa internacional, foi testado um tratamento local com bacteriófagos para tratar queimaduras. Estes fagos tinham por alvo as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O estudo acabou por provar que a terapêutica com fagos é segura, mas devido a constrangimentos da metodologia, acabou por não comparar a eficiência dos fagos com a terapia antibiótica [35].

Conclusão

O presente trabalho permitiu conhecer uma realidade e uma abordagem alternativa aos problemas infecciosos, em particular os casos de resistência bacteriana. Esta abordagem consiste em utilizar bacteriófagos, vírus trópicos das bactérias, por oposição ou em combinação com antibióticos.

Uma vez que a descoberta dos fagos ocorreu precisamente há 100 anos e pelo crescente número de fenómenos de multirresistência bacteriana, que afetam não só outras estirpes bacterianas como os novos antimicrobianos, esta opção encontra-se cada vez mais atual devido também à ubiquidade da problemática da resistência, que tem uma abrangência local, no caso específico do CHCB, mas também a nível nacional, europeu e mundial.

A terapêutica com bacteriófagos já é uma ciência centenária, mas possui atualmente ainda muitas limitações, decorrentes de falhas cometidas na metodologia dos estudos por falta de ensaios com controlo, por desconhecimento de muitos fatores que influenciam a eficácia e eficiência, como as interações entre os fagos e o sistema imune, os processos de depuração, bem como pela falta de um enquadramento regulatório. Outros fatores que afetam a adaptabilidade desta terapêutica a um maior número de doentes e centros de tratamento, e deste modo diminuírem a sua utilização, são a elevada especificidade dos fagos, que exigem uma personalização da terapia, o que acaba por tornar a aplicabilidade da terapêutica um processo demorado e complexo. Devido à antiguidade da aplicação de fagos, existe uma dificuldade acessória, que é o obstáculo de patentear, o que diminui o interesse das companhias farmacêuticas em investir nestes produtos.

Comparativamente à terapia antimicrobiana convencional, a terapêutica com fagos acarreta vantagens que poderão, depois de ultrapassados os obstáculos já anteriormente identificados, instigar uma maior utilização como alternativa ou em combinação com antibióticos para atingir resultados mais promissores a níveis de cura, remissão, assim como a nível financeiro.

Os bacteriófagos além das suas utilizações terapêuticas, possuem outras aplicações possíveis, como a destruição de biofilmes, segurança alimentar, agricultura, diagnóstico clínico, entre muitos outros.

Embora nos últimos anos a investigação tenha estado limitada principalmente à Polónia e Geórgia, começa agora a ocorrer um intercâmbio de conhecimento com uma maior colaboração entre estes últimos e os centros de investigação ocidentais, que permitirão no futuro uma maior presença da terapêutica com bacteriófagos nas opções de tratamento disponíveis.

Em suma, a terapêutica por fagos tem potencial de vir a minorar um dos principais problemas de saúde atual, permitindo melhores desfechos. Além disso, as principais instituições responsáveis pela promoção de saúde e não só, devem manter uma atitude de sensibilização cada vez mais criteriosa e pró-ativa na prescrição de antibióticos, uma vez que foi devido ao uso imoderado e muitas vezes sem controlo de antimicrobianos, o fator condicionante à emergência de um cada vez maior número de estirpes bacterianas com multirresistência.

Bibliografia

- [1] Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1037-50.

- [2] Jassim SA, Limoges RG. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Ag;30(8):2153-70.
- [3] Kaźmierczak Z, Górski A, Dąbrowska K. Facing antibiotic resistance: Staphylococcus aureus phages as a medical tool. *Viruses*. 2014 Jul 1;6(7):2551-70.
- [4] Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistant crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014. 8(2):129-136.
- [5] ECDC/EMA Joint Technical Report: **The bacterial challenge: time to react**. 2009. EMA/576176/2009.
- [6] World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014. Geneva. 2014
- [7] Verbeken G, Huys I, Pirnay JP, Jennes S, Chanishvili N, Scheres J, Górski A, De Vos D, Ceulemans C. Taking bacteriophage therapy seriously: a moral argument. *Biomed Res Int*. 2014;621316.
- [8] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014.
- [9] Microrganismos mais frequentemente isolados e padrão de resistência aos agentes antimicrobianos no Centro Hospitalar Cova da Beira em 2010-2014. Serviço de Patologia Clínica. 2015 Jan.
- [10] Balcazar JL. Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *Plos Pathogens*. 2014 Jul;10(7).
- [11] Abeles SR, Pride DT. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *J Mol Biol*. 2014 Nov 25;426(23):3892-906.
- [12] Keen, EC. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*. 2014;37:6-9
- [13] Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:51.
- [14] Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):226-35.
- [15] Weinbauer MG. Ecology of Prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 2004;8:127-181
- [16] Il Livro dos Reis 5.1-19
- [17] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris, JG. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar; 45(3): 649-659.
- [18] Fruciano E, Bourne S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2007;18:1:19-26

- [19] Ghannad MS, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iran J Basic Med Sci.* 2012 Mar;15(2):693-701.
- [20] Yosef I, Kiro R, Molshanski-Mor S, Edgar R, Qimron U. Different approaches for using bacteriophages against antibiotic-resistant bacteria. *Bacteriophage.* 2014 Jan 1;4(1).
- [21] Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect.* 2013 Fev;121(2):a48-53.
- [22] Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010 Dez 28(12):591-5.
- [23] Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol.* 2011 Out;14(5):524-31.
- [24] Maal KB, Delfan AS, Salmanizadeh S. Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform's Phage Therapy. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Mar; 8(3).
- [25] Parasion S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):137-45.
- [26] Housby JN, Mann NH. Phage therapy. *Drug Discov Today.* 2009 Jun;14(11-12):536-40.
- [27] Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Golaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 2012;83:41-71.
- [28] Sagor MM, Islam KK, Ali MR, Abdul-Awal SM, Adhikary PP, Sarker PK, Rakib ASM. Bacteriophage: a potential therapeutic agent (A Review). *J Med Sci.* 2005;5:1-9.
- [29] Nilsson AS. Phage therapy--constraints and possibilities. *Ups J Med Sci.* 2014 Mai;119(2):192-8.
- [30] Verbeken G, Pirnay JP, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, Huys I. Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014 Abr;62(2):117-29.
- [31] Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1999;47(5):267-74.
- [32] Ormälä AM, Jalasvuori M. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage.* 2013 Jan 1:3(1)
- [33] Kutter, E., D. De Vos, G. Gvasalia, Z. Alavidze, L. Gogokhia, S. Kuhl, and S. T. Abedon. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2010;11:69-86.
- [34] Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. 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.* 2009 Ag;34(4):349-57.

[35] Rose T, Verbeken G, Vos DD, Merabishvili M, Vaneechoutte M, Lavigne R, Pirnay JP. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. *International Journal of Burns and Trauma*. 2014;4(2), 66-73.