

Fagoterapia como alternativa às Infecções Bacterianas

Phagotherapy as an Alternative to Bacterial Infections

Barbosa JD^a e Padilha IQM^b

a: Graduando de Biomedicina da Faculdade Internacional da Paraíba

b: Biólogo, Docente do Curso de Biomedicina da Faculdade Internacional da Paraíba

RESUMO

A antibioticoterapia foi um marco importante, que começou com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (1940), porém a resistência bacteriana aos antibióticos já era uma preocupação. Este trabalho teve como objetivo revisar os resultados e conclusões ao longo de 8 anos sobre a possibilidade e eficácia de se usar a fagoterapia como alternativa aos antibióticos nas infecções bacterianas. O presente estudo se trata de uma revisão de literatura que se utiliza de critérios de inclusão e exclusão para selecionar artigos sobre a temática fagoterapia. Foi evidenciado em pesquisas que bacteriófagos com capacidade lítica considerável em bactérias como, *P. Aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e outras cepas, além de ter atividade antibiofilme. Sendo assim, elencando as últimas pesquisas nota-se que os fagos poderão vir a ser usados como métodos de tratamentos em humanos.

Descritores: Organismos. Vírus. Bacteriófagos. Fagoterapia

ABSTRACT

Antibiotic therapy was a milestone that began with the discovery of penicillin by Alexander Fleming (1940), but bacterial resistance to antibiotics was already a concern. The aim of this work was to review the results and conclusions over 8 years on the possibility and efficacy of using phage therapy as an alternative to antibiotics in bacterial infections. The present study is a literature review using inclusion and exclusion criteria to select articles on the topic of phage therapy. It has been shown in investigations that bacteriophages have considerable lytic ability in bacteria such as *P. Aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and other species and also have antibiofilm activity. Therefore, based on the latest investigations, phages may eventually be used as a treatment method in humans.

Keywords: Organisms. Virus. Bacteriophage. Phagotherapy

INTRODUÇÃO

No século XX, a antibioticoterapia foi um marco importante no combate à doenças infecciosas de origem bacteriana. A partir da descoberta de Alexander Fleming (1940), o primeiro antibiótico biológico, a penicilina, observou-se que a resistência bacteriana já era uma preocupação. Tanto que um ano após essa descoberta, Barber comprovou experimentalmente a capacidade das bactérias de resistir a penicilina, a partir de penicilases que degradavam o antibiótico¹. O uso indiscriminado dos antibióticos permitiu o surgimento dos mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos e consequências negativas no tratamento de doenças causadas por bactérias patogênicas. Com isso, os pesquisadores têm buscado novos fármacos antimicrobianos e formas de combater a resistência antimicrobiana^{1,2}.

Os fagos são vírus (com genomas de DNA ou RNA de fita simples ou dupla) que infectam exclusivamente bactérias. Os fagos individuais são específicos para cepas de espécies bacterianas. Como outros vírus, os fagos não possuem um replissoma completo e, portanto, devem assumir a infecção intracelular de um hospedeiro para se propagar. Os fagos sofrem adsorção mediada por receptores na superfície da bactéria alvo antes de injetar seu material genético no citoplasma, onde a maquinaria de replicação bacteriana é subvertida para produzir novos vírions³. O aumento da resistência antibacteriana estimulou o interesse da comunidade científica ocidental no potencial terapêutico dos fagos, já aprovado para aplicações antibacterianas na agricultura e nas indústrias de processamento de alimentos⁴. De fato, os desafios biológicos em torno da fagoterapia, giram em torno do risco de selecionar bactérias resistentes a fagos, complexidades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e interações com o hospedeiro humano³.

Este trabalho teve como o objetivo revisar os resultados e conclusões ao longo de 8 anos sobre a possibilidade e eficácia de se usar a fagoterapia como alternativa aos antibióticos nas infecções bacterianas.

MÉTODO

O presente estudo se trata de uma revisão de literatura. As consultas foram feitas entre o período de março e setembro de 2022. As pesquisas foram realizadas através de bancos de dados eletrônicos: "Pubmed", Medline, Google Acadêmico, Lilacs e "*Scientific Electronic Library* (SciELO)". As palavras chaves a ser utilizadas são: "Organismos", "Vírus", "Bacteriófagos", "Fagoterapia". Foi agregado dados da fagoterapia nas infecções bacterianas com testes feitos *in vitro* e *in vivo* e a sua eficácia em animais e humanos, de acordo com pesquisa realizada

em órgãos nacionais, internacionais e artigos. As pesquisas foram realizadas em três diferentes línguas: inglesa, portuguesa e espanhola. Considerou-se como critério de exclusão: todas pesquisas que não estejam dentro do tema delimitado, artigos de revisão, resumos expandidos, relatos de caso e que não estejam nos idiomas de interesse, artigos publicados fora do período de interesse (2015 a 2022) serão desconsiderados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca de artigos para revisão bibliográfica rendeu 2.759 artigos, e após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 33 desses estudos foram escolhidos para posterior análise. Destes, 10 foram escolhidos para construção do texto de revisão.

No quadro a seguir, os artigos escolhidos para compor a amostra desta revisão foram identificados e seus conteúdos sintetizados.

Tabela 1: Artigos coletados nas bases de dados Medline, SciELO, pubMED, Lilacs e Google acadêmico sobre o uso da fagoterapia.

Autor	Objetivo(o)s	Principais resultados
Silva ⁵	Isolar, propagar e caracterizar fagos capazes de infectar, <i>Salmonella</i> entérica sorotipo Typhimurium, <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , a partir de resíduos da pecuária brasileira.	Bacteriófagos com capacidade lítica, que não demonstraram elementos de resistência, nem genes codificadores de proteínas controladoras do ciclo lisogênico, sendo os isolados <i>Salmonella</i> E. phage SM1 e phage SECF1 os melhores candidatos com essas características, para o uso no controle de enterobactérias da pecuária brasileira.
Valadares ⁶	Phage display (PD) é uma tecnologia para seleção de peptídeos miméticos e ligantes com objetivos terapêuticos, vacinais e diagnósticos. Nesse trabalho se propõe uma nova abordagem em que o fago M13 apresentando os peptídeos selecionados poderão ser utilizados diretamente como ligante ou mimético em aves.	Esse trabalho mostra que quando a ave é inoculada com ECR infectada com o fago M13, o vírus pode replicar no trato intestinal da ave sem alterar a saúde do animal ou estimular a resposta imune humoral. Essa abordagem permite o uso dos fagos da biblioteca do PD expressando peptídeos selecionados para controle de patógenos no trato intestinal das aves.
Oliveira ⁷	Avaliar a aplicabilidade de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos, visando vencer os desafios associados ao biofilme e à resistência bacteriana.	Os bacteriófagos recém isolados exibiram um amplo espectro lítico e foram capazes de infectar 69,7% das cepas de <i>P. Aeruginosa</i> , incluindo cepas multirresistentes. Todos os

		<p>bacteriófagos foram capazes de reduzir o crescimento de <i>P. Aeruginosa</i> na forma planctônica. Além disso, os bacteriófagos reduziram a carga microbiana, a atividade metabólica e a área recoberta por biofilmes, quando aplicados à biofilmes maduros na superfície de tubos endotraqueais</p>
Gómez ⁸	<p>O principal objetivo foi caracterizar fenotipicamente e molecularmente uma coleção de cepas presumivelmente pertencentes ao gênero <i>Estafilococos</i> e selecionar aqueles que potencialmente apresentam maior grau de virulência. Também foi tentado visualizar o efeito do estafilófago K nas cepas mais virulentas.</p>	<p>Apesar da natureza preliminar do estudo de tipagem fágica realizado contra o estafilófago K, os resultados obtidos abrem novos caminhos de pesquisa sobre a possibilidade de usar este tipo de terapia para controlar cepas patogênicas de <i>S. aureus</i> resistente à metilicina.</p>
Santos ⁹	<p>Este trabalho teve como objetivos aprofundar a caracterização dos fagos ZC01 e ZC03 e avaliar seu potencial para fagoterapia na infecção por <i>P. aeruginosa</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>.</p>	<p>Finalmente, utilizando o modelo animal de <i>G. mellonella</i>, demonstramos que o fago ZC01 é capaz de combater, ainda que parcialmente, a infecção por <i>P. Aeruginosa</i> PA14 no modelo de <i>G. Mellonella</i>. ZC03 também parece ser capaz de combater a infecção por PA14 nesse modelo, ainda que com menor eficácia que ZC01.</p>
Rincon ¹⁰	<p>Avaliar o desempenho de bacteriófagos no controle de biofilmes de cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtor de Carbapanemase (KPC).</p>	<p>Apesar das muitas vantagens dos bacteriófagos e dos resultados obtidos, a penetração pode ser um grande obstáculo em biofilmes heterogêneos, como os formados por <i>K. Pneumoniae</i>, KPC. O uso de ramnolipídio pb18 obtido de <i>P. Aeurogenosa</i> em altas concentrações pode ajudar a difusão de bacteriófagos.</p>
Gabiatti ¹¹	<p>Isolar e caracterizar fagos polivalentes de interesse no controle biológico de bactérias patogênicas. Desenvolver uma estratégia diferenciada de aplicação dos fagos na qual esporos bacterianos sejam usados como carreadores e envoltório de proteção destes fagos durante o controle de crescimento microbiano em ambientes que apresentam condições adversas, como sistemas de tratamento de efluentes urbanos e industriais.</p>	<p>É possível incorporar fagos capazes de infectar <i>Bacillus subtilis</i> a esporos em formação, porém, a eficiência de incorporação de cada fago é diferente, mesmo em condições experimentais iguais. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da abordagem de incorporação de fagos em esporos para garantir a eficácia do controle biológico com fagos em sistemas com condições adversas para a viabilidade das partículas virais.</p>
Hua ¹²	<p>Isolar <i>a. baumannii</i></p>	<p>O fago SH-Ab15519 é um <i>Acinetobacterphage</i>, que é</p>

	-específicos de fagos líticos e avaliar seu potencial efeito terapêutico contra infecção pulmonar causada por cepas clínicas de CRAB.	considerado seguro para aplicação em terapia fágica com base na análise completa do genoma. Além disso, nosso estudo demonstrou que o fago SHAb15519 administrado por via intranasal pode efetivamente resgatar os camundongos da letalidade A. Baumannii infecções pulmonares sem efeitos colaterais deletérios.
Sarker ¹³	Avaliar o uso de bacteriófagos administrados por via oral para o tratamento de diarreia bacteriana de fase aguda.	Os colifagos orais mostraram um trânsito intestinal seguro em crianças, mas não conseguiram alcançar a amplificação intestinal e melhorar o resultado da diarreia, possivelmente devido à cobertura insuficiente de fagos e muito patógenos que requerem doses mais altas de fagos orais. É necessário mais conhecimento sobre a interação fago-bactéria e o papel da E. coli na diarreia infantil para o sucesso do TP
Gonçalves ¹⁴	Descreve o comportamento in vitro de 62 amostras de bacteriófagos líticos isolados de esgoto hospitalar humano usando uma amostra de Salmonella Enteritidis de origem avícola.	Conforme nossa observação compreendeu-se que a virulência demonstrada in vitro por amostras líticas é relativa à capacidade de adsorção e ao tempo curto de replicação, características associadas com alta virulência apresentam um potencial desejado para um possível uso terapêutico.

Fonte: Autoria Própria, 2022

O objetivo deste trabalho foi revisar os resultados e conclusões feitas ao longo dos anos sobre a viabilidade e eficácia do uso da fagoterapia como alternativa aos antibióticos em infecções de origem bacteriana. Diante do conjunto de informações decorrentes dos diferentes procedimentos utilizados nesta pesquisa. Os resultados demonstram mais especificamente que o uso de bacteriófagos em pesquisas in vivo e in vitro combatem de forma significativa espécies de bactérias causadoras de doenças em animais tendo perspectiva em humanos.

Em uma pesquisa exploratória e explicativa utilizando do método de duplo ágar para o isolamento dos bacteriófagos e posterior sequenciamento de nova geração, foi constatado o isolamento de 5 fagos membros da família siphoviridae e myoviridae, 3 destes possuem capacidade de infectar Salmonella enterica servir Typhimurium, 1 infectou P. Aerogenes e outro Klebsiella pneumoniae⁵. Em um estudo semelhante de teor mais quantitativo abordamos cerca de 62 amostras de bacteriófagos líticos os quais foram isolados utilizando-se de uma cepa de Salmonella enterica, a avaliação do potencial líticos dos bacteriófagos foi mensurada

pelos seguintes parâmetros: índice de proliferação (IP), tamanho de halo em gel de difusão (HDG), espectro de halo em superfície (EHS) e escala de virulência (EV), após semeadura e incubação por 24 horas realizou-se a leitura dos resultados, na qual em 2 placas teve formação de halo com crescimento moderado de *Salmonella Enteritidis* e em uma placa com formação de halo sem crescimento de SE¹⁴. Em um segundo estudo com dois fagos ZC01 e ZC03 da família Siphoviridae, teve um aprofundamento deles na sua caracterização por meio de técnicas analíticas como, proteômica, microscopia eletrônica e seu potencial para fagoterapia na infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em modelo *G. mellonella*, foi determinado que o fago ZC01 apresenta atividade despolimerase⁹. Ensaio de eficiência de plaqueamento, foi reavaliado a suscetibilidade de um conjunto selecionado de 16 isolados clínicos de *P. Aeruginosa* a ZC01 e ZC03 em modelo animal *G. melonella*, demonstrou-se que o fago ZC01 é capaz de combater, ainda que parcialmente, infecções por *P. Aeruginosa* e o fago ZC03 também com mesmo potencial, mesmo que em menor eficácia. Em trabalho anterior¹⁵ mostra que os fagos ZC01 e ZC03 possui limitada abrangência de infecção a certos hospedeiros, infectando apenas algumas cepas ou isolados de *P. Aeruginosa*. A melhor infecção ocorreu na cepa PA14, já a cepa PAO1 é totalmente resistente à infecção pelo fago. Os genomas da PA14 e PAO1 e outras 16 cepas foram sequenciados e estão sendo analisados para busca de determinantes potencialmente associados à suscetibilidade ou à resistência à infecção por esses fagos¹⁶.

A dificuldade em se manter equipamentos hospitalares devidamente esterilizados ainda representa uma problemática atual, devido à grande resistência de cepas bacterianas em produzir biofilmes resistentes aos químicos, UV e outros métodos atuais, infecções ocorridas pela presença de biofilmes em cateteres ou outro equipamento de acesso invasivo tem frequência esporádica, levando pacientes a óbito por tais infecções. Em um estudo in vitro feito por⁷ realizado em 4 etapas. Avaliando-se purificação, caracterização dos bacteriófagos, atividade antibacteriana e antibiofilme contra 15 diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* nas formas planctônicas e associados a biofilmes, bacteriófagos da família myoviridae produziram de 27 a 46 partículas virais após 30 minutos de incubação e foram estáveis às variações de pH e temperatura além de exibir um amplo espectro lítico e capazes de infectar *P. Aeruginosa*, incluindo cepas multirresistentes, também reduziram o crescimento de *P. Aeruginosa* na forma planctônica e a carga microbiana é metabólica quando aplicada a biofilmes associados aos tubos endotraqueais. Em outra linha de pesquisa semelhante, sintetizada através¹⁰ no qual se avaliou o efeito de 9 fagos líticos em 15 cepas clínicas de KPC atuando na prevenção da formação de biofilme, no qual um tipo de fago (f2) obteve 95,45% de eficácia no tratamento de antibiofilme, todos os fagos têm potencial como tratamento na remoção de biofilmes, as amostras foram analisadas sob o critério de confiança

de 95%. Vale ressaltar que os bacteriófagos demonstram um melhor desempenho do que muitos dos tipos de tratamento utilizando antibióticos com doses inibitórias mínimas mais altas no controle de cepas clínicas multirresistentes¹⁷.

Infeções no âmbito hospitalar acontecem frequentemente em todo o mundo, cepas bacterianas resistentes aos antibióticos estão se tornando uma realidade muito comum. O estudo elaborado mediante¹² evidenciou que o bacteriófago SH-Ab15519 administrado por via intranasal pode combater infecções pulmonares em camundongos causadas por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB) sem efeitos colaterais deletérios. Segundo¹⁸ afirma que o fago SH-Ab15519 tem potencial para ser usado como mecanismo de profilaxia para pacientes em UTIs com possível infecção nosocomial. O fago SH-Ab15519 é considerado seguro para aplicação em terapia fágica com base na análise completa do genoma¹². Anos depois em um estudo preliminar similar realizado por⁸ pesquisando sobre o estafilófago K e avaliando seu potencial lítico em *Staphylococcus aureus* (MRSA) causadora de infecções de pele, intoxicação alimentar, sepse e pneumonia, o fago foi capaz de gerar lise nas mesmas, quando semeadas em placas de TSA, tais cepas bacterianas apresentavam alto grau de virulência. Em um ensaio clínico efetivado através¹³ para avaliar dois tipos de coquetel de fagos em crianças com diarreia no hospital de Dhaka, não foi observado um resultado significativo, os fagos não mostraram replicação substancial, porém os fagos mostraram um trânsito intestinal seguro em crianças, mas não conseguiram alcançar a amplificação necessária e consequente melhora da diarreia por streptococcus spp. Dois anos depois em um estudo de⁶ que avaliou o fago M13 ligado a peptídeos em aves infectadas com *E. Coli*, administração do fago feita por via oral em frangos com dias de vida diferentes, as fezes das aves foram coletadas e fago M13 quantificado, o vírus se replica no trato intestinal da ave sem prejudicar sua saúde e até 42 dias se utilizando do fago, não à estímulo da resposta imune humoral.

CONCLUSÃO

Mediante o acervo de pesquisas dos últimos 8 anos realizadas no campo da fagoterapia, traz consigo evidências positivas sobre a possibilidade de fazer o uso de bacteriófagos em infecções causadas por bactérias no ser humano, contudo, é preciso entender com mais riqueza de detalhes sobre a interação fago e bactéria hospedeira na fisiologia humana, ainda há muito a ser analisado sobre esta temática que em hipótese alguma deverá ser descartada.

REFERÊNCIAS

1. Rosa JEC. JEC.Multirresistência bacteriana – uma “nova” terapêutica: bacteriófagos [mestrado]. Covilhã: Universidade Beira Interior, Ciências da Saúde; 2015. Disponível em: https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/6448/1/4094_7905.pdf. Acesso em: 20 maio 2022.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats. United States: Department of Health and Human Services; 2013. Chap 1, p.11. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Accessed: May 24, 2022.
3. Caflich KM, Suh GA, Patel R. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(12):1011-1041. DOI:10.1080/14787210.2019.1694905.
4. Vivas R. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb Drug Resist*. 2019 Jul/Aug;v. 25, n. 6, p. 890-908. DOI: 10.1089/mdr.2018.0319. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30811275.
5. Silva R. Isolamento e caracterização de bacteriófagos da pecuária brasileira - ênfase em Santa Catarina. 2022.
6. Valadares Júnior EC. Replicação e efeitos do fago M13 da biblioteca do phage display em frangos de corte. 2022.
7. Oliveira V. Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais: avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme. Ribeirão preto: Universidade de São Paulo, 2021.
8. Gómez I. Detecção de fatores de virulência em cepas de estafilococosp. de origem nasal e epidérmica: estafilotoxinas, resistência a antibióticos e fagoterapia. Espanha, jul. 2020.

9. Santos Junior AP. Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
10. Rincón N. Efecto de bacteriófagos en el control de biopelículas de *klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas (KPC). 2019.
11. Gabiatti NC. Isolamento, caracterização e incorporação de fagos polivalentes em esporos bacterianos para uso em controle biológico. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
12. Hua Y *et al.* Phage therapy as a promising new treatment for lung infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JAN, 9 jan. 2018.
13. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F *et al.* Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*, v. 4, p. 124–137, 1 fev. 2016.
14. Gonçalves GAM, Suehiro BYB, Costa LFZP, Pantoja JCF, Andreatti Filho RL. Análise de critérios para utilização na seleção de bacteriófagos líticos com potencial para utilização médica: dados preliminares. 2015. 1f. *Veterinária Zootecnia*. v. 22, n. 1, p. 72-82, 2015.
15. Amgarten D, Martins LF, Lombardi KC, Antunes LP, Nicastro GG, Kitajima EW, *et al.* Three novel *Pseudomonas* phages isolated from composting provide insights into the evolution and diversity of tailed phages. *BMC Genomics* v. 18, n. 1, p. 1-18, 2017. DOI: 10.1186/s12864-017-3729-z.
16. Rossi FPN. Análise comparativa do genoma de bacteriófagos isolados da *aeruginosa*. 2019. Dissertação de Mestrado. Programa Interunidades em Bioinformática, Universidade de São Paulo, São Paulo.

17. Suárez LP, Zambrano MM, Vives MJ. Phage-antibiotic synergy with bacteriophage M1-Kp1 in clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. 2019.

18. Chanishvili N. Bacteriophages as Therapeutic and Prophylactic Means: Summary of the Soviet and Post Soviet Experiences. *Curr Drug Deliv*. 2016; v. 13, n. 3, p. 309-23. DOI: 10.2174/156720181303160520193946. PMID: 27090515.