



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U.PORTO

Artigo de Revisão Bibliográfica

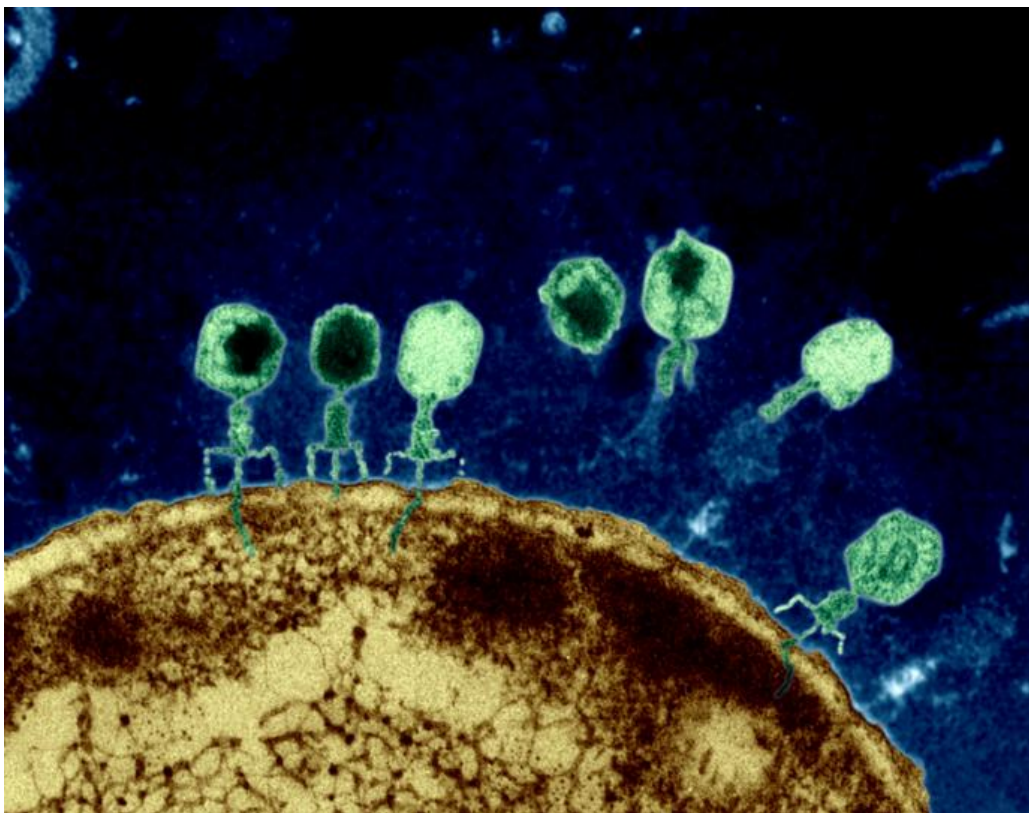
6º ano Profissionalizante

Mestrado Integrado em Medicina

2013/2014

Terapia Bacteriofágica na Prática Clínica: um Estudo de Revisão

David Dario Tamegão Rothwell



Orientadora: Dr.^a Ana Paula Fontes Rocha e Castro

Conteúdo

Acrónimos.....	2
Palavras Chava	2
Resumo	3
Introdução.....	4
História da Terapia Bacteriofágica	4
Princípios biológicos	6
Taxonomia.....	8
Farmacodinâmica	9
Segurança.....	10
Farmacocinética	11
Ensaio Animais	11
Ensaio Humanos <i>Gold Standard</i>	13
Estudo britânico fase I/II: otites por Pseudomonas aeruginosa.....	13
Estudo belga fase I: Queimaduras infetadas com P. aeruginosa e S. aureus	14
Estudo americano fase I: Úlceras venosas	15
Estudo suíço fase I/II (Nestlé): diarreia por E. Coli	15
Abordagens da fagoterapia.....	15
MRSA	15
Úlceras Venosas	16
Profilaxia	17
Infeções Purulentas.....	17
Infeções Gastrointestinais	18
Infeções oftálmicas	18
Infeções Respiratórias.....	18
Vantagens e desvantagens da fagoterapia .	19
Barreiras à Fagoterapia	21
Fagoterapia em Portugal	21
Conclusão.....	22
Referências	22
Agradecimentos.....	27
Anexo 1 - Ensaio Clínicos	

Acrónimos

ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
X_p	Limiar de proliferação
T_p	Tempo crítico de proliferação
UFP	Unidade formadoras de placas
UFC	Unidade formadoras de colónias
MOI	Multiplicadores de infeção
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à metilina
P.H.A.G.E.	<i>Phages for Human Applications Group Europe</i>

Palavras Chava:

História dos bacteriófagos (ou fagos)
Fagoterapia
Bactérias multirresistentes
Tratamento de doenças infecciosas
Farmacologia
Segurança
Ensaio em animais
Ensaio *Gold standard*

Resumo

Bacteriófagos, também denominados fagos, são vírus que infetam bactérias. Estima-se que existam entre 10^{30} a 10^{32} bacteriófagos na biosfera, e que ocorram 10^{23} infecções fágicas por segundo. A cada 48 horas, metade da população bacteriana global é destruída por fagos, o que constitui um processo dinâmico em todos os ecossistemas.

A partir de 1915, ano em que os bacteriófagos foram descobertos por Felix d'Hérelle, a sua potencialidade antimicrobiana foi objeto de estudo tendo-se passado à aplicação humana em 1919. Desde então a terapia fágica é de uso comum nos países do antigo bloco de leste sobretudo na Polónia e Geórgia. No ocidente assistiu-se a uma fase inicial de entusiasmo seguida de ceticismo, depois abandono e recentemente uma fase de interesse e reavaliação desta terapia. Esta evolução deve-se, sobretudo, ao aumento dos casos de infecções multirresistentes e a uma crescente necessidade de desenvolver alternativas terapêuticas aos antibióticos.

A terapia fágica envolve a utilização de bacteriófagos específicos para determinadas bactérias patogénicas com o objetivo de infetar e eliminar essas células hospedeiras. Para além disso, existem estudos que exploram a utilização de componentes de fagos, com reconhecida atividade bactericida, no tratamento de infeções.

Este trabalho debruça-se sobre artigos de revisão, artigos originais de investigação e artigos editoriais e de opinião, publicados em língua inglesa.

Abstract

Bacteriophages, also known as phages, are viruses that infect bacteria. It is estimated that there are between 10^{30} and 10^{32} bacteriophages in the biosphere, and that 10^{23} phage infections take place per second. Every 48 hours, half of the bacteria in the world are killed by phages, establishing a dynamic process in every ecosystem.

The study of the antimicrobial potential of phages began in 1915 when they were discovered by Felix d'Hérelle and in 1919 human applications began. Since then, therapy with phages has been common practice in countries belonging to the old Eastern Bloc, particularly Poland and Georgia. In the West there was an initial phase of enthusiasm, followed by skepticism, then abandonment and recently a phase of renewed interest and reevaluation of this type of therapy. This evolution was primarily due to an increase in cases of multi-resistant infections and an increasing need to find alternatives to antibiotics.

Phage therapy involves the use of bacteriophages specific to certain pathogenic bacteria, to infect and kill these host cells. Moreover, there are studies that explore the use of phage components, with known bactericidal activity, in treating infections.

This work focuses on review articles, original research articles, editorial articles and articles of opinion published in English.

Introdução

A terapia bacteriófágica envolve aplicação dirigida de bacteriófagos (ou fagos) que quando contactam com bactérias patogênicas específicas, as infetam e as destroem. Os fagos lisam as bactérias sendo libertados viriões progenitores que dão continuidade ao ciclo, incluindo a migração para outros locais de infeção no corpo (Burrowes et al., 2011). No contexto de agentes antimicrobianos, os fagos são únicos na medida em que aumentam em quantidade na presença de bactérias alvo (Abedon e Abedon, 2010). É de importância relevante o impacto mínimo que os fagos têm em bactérias não alvo e em tecidos corporais (Górski et al., 2009).

Dentro do tema “Terapia Bacteriófágica na Prática Clínica”, é realizada uma revisão da terapia bacteriófágica e um levantamento das suas possíveis aplicações terapêuticas numa perspetiva médica. Também são discutidos a segurança, outros aspetos farmacológicos e os obstáculos que se colocaram no passado bem como os que se poderão vir a colocar no futuro em relação à aplicação de bacteriófagos na medicina ocidental.

História da Terapia Bacteriófágica

Segundo Chanishvili (2012), durante a Primeira Guerra Mundial, notícias sensacionalistas declararam que vírus "comedores de microrganismos" haviam sido descobertos por Felix d'Herelle (Fig. 1a), que desenvolvera um preparado de fagos para tratar soldados que padeciam de disenteria. Esta notícia despoletou entusiasmo na comunidade médica, dado que existiam artigos publicados a demonstrar a ausência de efeitos nocivos de bacteriófagos em animais e humanos.



Fig. 1 - Retrato fotográfico de: (a) Felix d'Herelle, (b) Ernest Hanbery Hankin, (c) Frederick Twort, (d) George Eliava (Crespo, 2009).

Mas na realidade a história dos fagos começou muito antes deste evento. Em 1896, Ernest Hanbery Hankin (Fig. 1b), um bacteriologista inglês deu nome ao "fenómeno de Hankin" quando verificou que a concentração de *Vibrio cholera* nas águas do rio Ganges diminuía ao atravessar a cidade de Agra por um processo de purificação inexplicável.

Entre 1906 e 1909, Felix d'Herelle estudou isolados de gafanhotos gravemente infetados por uma epidemia desconhecida com interesse em usar o patógeno etiológico como solução contra pragas de gafanhotos. Em culturas de *Enterobacter aerogenes* (assim isolados), ele observou placas transparentes ("*taches vierges*") e deduziu que denunciavam a presença de um vírus causador da doença dos gafanhotos. Mediante este raciocínio, ele isolou o vírus e inoculou gafanhotos sem sucesso. Por isso, continuou a investigação à procura de uma etiologia bacteriana sem ter em consideração as estranhas placas transparentes (Summers, 2001).

Posteriormente, Frederick Twort (Fig. 1c) observou e descreveu placas transparentes ("bordos comidos") em culturas de *Staphylococcus* que apareciam

sucessivamente em estirpes diferentes após filtrações apropriadas (Twort, 1915). Foi a primeira publicação sobre bacteriófagos, contudo, o autor limitou-se a descrever os achados por não compreender o fenómeno. D'Herelle leu o artigo e relacionou os achados com o que ele tinha observado no seu estudo na epidemia de gafanhotos e suspeitou que o agente filtrado era um vírus bacteriano (Summer 2001).

Em 1915, Felix d'Herelle foi contratado para investigar um surto de disenteria hemorrágica em tropas francesas acantonadas nos arredores de Paris. Ele produziu um filtrado livre de bactérias a partir de amostras de matéria fecal dos doentes que misturou e incubou com estirpes de *Shigella* isoladas dos doentes. Parte desta mistura foi inoculada em animais experimentais (na tentativa de desenvolver uma vacina contra a disenteria bacteriana), e parte foi cultivada para observar o crescimento da bactéria. Mais uma vez, ele observou áreas transparentes que ele denominou "*plaques*" (Summers, 1999). Estes achados foram apresentados no encontro da *Academy of Sciences* e posteriormente publicados (d'Herelle, 1917). O autor teve poucas dúvidas quanto à natureza do fenómeno e propôs que era causado por vírus capazes de parasitar bactérias, referindo-se aos mesmos como "bacteriófagos". Esta descoberta era inevitável e havia observações semelhantes feitas por outros cientistas como por exemplo, o "misterioso desaparecimento" de células de *V. cholera* observado por George Eliava (Fig. 1d) (Chanishvili, 2012).

O maior mérito de Felix d'Herelle foi a sua proposta da possibilidade da utilização de bacteriófagos no tratamento de doenças bacterianas em humanos e animais, pela que ele foi nomeado 8 vezes para o Prémio Nobel desde 1925 (Chanishvili, 2012).

Houve então uma incorporação do conceito de bacteriófagos na percepção dos microbiologistas e assistiu-se a uma fase de entusiasmo caracterizada por declarações

exageradas e frequentemente descabidas, enquanto o conhecimento sobre a natureza vírica dos fagos era escasso (do inícios da terceira década a meados da quarta década do século XX). Esta fase de excessivas expectativas entrou em declínio e foi seguida por ceticismo no ocidente, com um desvio de atenção para os antibióticos e a utilização de fagos como modelos de sistemas genéticos. Este ceticismo em relação à terapia fágica, que se prolongou até ao final dos anos 40, foi propagado por uma revisão muito crítica de Eaton Bayne-Jones (1934). Simultaneamente, o desenvolvimento da terapia fágica e suas aplicações continuou a crescer na União Soviética e na Europa de Leste sobretudo para tratar o Exército Vermelho (Housby, 2009).

No ocidente a era dourada do desenvolvimento da biologia molecular baseada em fagos envolveu apenas a infeção de um hospedeiro avirulento (*E. coli* B) por alguns fagos, ao invés de uma vasta seleção de fagos parasitas de patógenos chave (Housby, 2009).

Finalmente, nos anos 80, Smith e Huggins estimularam uma "redescoberta" da terapia fágica pela literatura inglesa. Este renascimento ganhou força nos anos 90 com o acréscimo do acesso a trabalhos soviéticos e polacos. Esta área científica começou a maturar por volta do ano 2000 concomitantemente a uma explosão genómica e uma vasta investigação fágica baseada na ecologia, progredindo até à atualidade (Abedon et al., 2011).

Entretanto, extensos estudos com fagoterapia foram feitos na antiga União Soviética onde a sua investigação e uso clínico se manteve mesmo após a descoberta dos antibióticos. Desde o período soviético que a fagoterapia faz parte das práticas correntes do sistema de saúde da Geórgia. O *Eliava Institute* em Tbilisi, fundado em 1916 por George Eliava em associação com Félix d'Hérelle, foi durante anos o único centro direcionado para esta área de investigação e para a produção dos fagos. Serviu a União

Soviética inteira com a produção de diferentes preparados de fagos para tratamento, profilaxia e diagnóstico. A prática habitual era o isolamento, teste e adaptação de fagos a partir de estirpes de bactérias patogénicas enviadas de toda a União Soviética. Os testes incluíam a verificação da virulência contra bactérias alvo e o espectro de hospedeiros, utilizando um painel das estirpes bacterianas mais problemáticas da altura. O instituto teve a capacidade de produzir até duas toneladas de preparados de fagos por semana, das quais grande parte era enviada para o exército soviético para tratar casos de diarreia e ferimentos, e o resto era disponibilizado em diversas fórmulas para o público em geral (Kutter et al., 2010). Exemplos de preparados de fagos produzidos e vendidos ao público ainda hoje encontram-se na tabela 1.

décadas na Geórgia e noutros países da antiga União Soviética tem havido poucas publicações primárias em revistas científicas de língua inglesa, em grande parte, devido ao secretismo em torno das aplicações científicas militares ocorridas por trás da Cortina de Ferro. Para além disso, estes tratamentos foram aplicados nas práticas correntes dos cuidados de saúde, muitas vezes em doenças consideradas refratárias a outros tratamentos, antes do surgimento de ensaios clínicos duplamente cegos, portanto, até recentemente, não foram produzidos estudos *gold standard*. O facto de muita da literatura mais antiga estar escrita em georgiano e russo, também constitui uma barreira. Contudo, existem esforços para contornar estas limitações, através de revisões em inglês da literatura antiga, como,

Tabela 1 - Cocktails de fagos (Abedon et al., 2011)

Nome	Venda livre	Nº de espécies de fagos	Patogénios alvo
<i>Intestiphage</i>	Geórgia e Rússia	20	<i>Shigella</i> (flexner, newcastle, sonnei), <i>Salmonella</i> (paratyphi A e B, typhimurium, enteritidis, cholera suis, oraneiburg), <i>Proteus</i> (<i>vulgaris</i> , <i>mirabilis</i>), <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , e várias serotipos de <i>E. coli</i> enteropatogénica
<i>Pyophage</i>		5	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> (lesões purulentas da pele ou queimaduras)

São produtos genéricos e como tal, também são produzidos por *Biochimpharm*, outro laboratório georgiano e por várias empresas russas (*Ufa* e *Perm*) que tiveram sucesso durante a era soviética. Não são produtos estáticos visto que há uma atualização periódica em resposta a alterações no patogénios alvo (O *Eliava Institute* actualiza estes preparados pelo menos de seis em seis meses). Para obtenção de aprovação de venda pelo governo da Geórgia, cada lote destes fármacos é testado pelo *Medication Certification Lab* (Abedon et al., 2011).

Kutter et al. (2010) referem que apesar de a fagoterapia já ser utilizada há várias

por exemplo, o trabalho elaborado por Chanishvili e Sharp (2008) e financiado pelo *International Science & Technology Center* (projecto Nr G-1467) e pelo *Secretary of State for Defense* do Reino Unido.

Princípios biológicos

Os bacteriófagos são parasitas naturais das bactérias e são considerados os organismos mais abundantes da biosfera, estimando-se a existência de 10 fagos para cada bactéria (Potera, 2013).

Como explica Burrowes et al. (2011), aquando da infeção de uma bactéria

hospedeira apropriada, o fago é adsorvido para o exterior da célula hospedeira por uma interação mediada por adesinas (proteínas víricas). As adesinas ligam-se

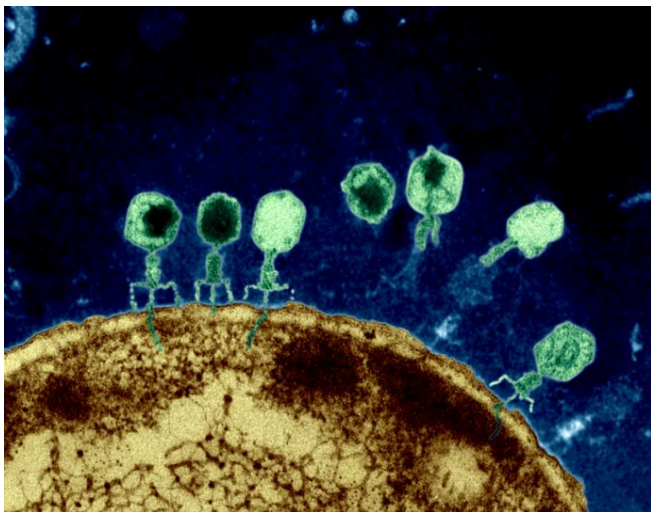


Fig. 2 - Microscopia eletrônica de fagos na superfície de uma bactéria de *Escherichia coli* a injetar material genético para dentro do citoplasma desta (Potera, 2013).

reversivelmente a alvos específicos da superfície celular, geralmente proteicos ou glicosídicos.

De seguida, o fago transfere o seu material genético para o citoplasma bacteriano (Fig. 2) e daí, dependendo do tipo de fago e do seu hospedeiro, desencadeia-se

um de dois possíveis processos. No caso de fagos **temperados**, a sua informação genética é inserida no genoma da célula hospedeira criando-se um profago. Este mantém-se de certa forma reprimido, enquanto a sua informação é copiada juntamente com a do hospedeiro (ciclo lisogénico), até que eventualmente lisa a célula libertando fagos progenitores (Fig. 3 - 2). Os fagos **virulentos** não formam profagos mas, por outro lado, iniciam prontamente reprodução vírica (ciclo lítico) aquando da infeção culminando numa rápida destruição da célula hospedeira dentro de minutos a horas (Fig. 3 - 1).

O ciclo de vida e a genética de vários fagos temperados estão bem estudados, havendo evidência de que vários possuem sequências genéticas de fatores virulentos bacterianos e a capacidade de mobilização destes fatores para espécies ou estirpes previamente pouco patogénicas (Boyd e Brüssow, 2002). Enquanto a possível ligação entre os fagos temperados e a virulência bacteriana está a ser debatida, considera-se desadequada a utilização destes fagos na terapia humana (Henein, 2013).

Fagos virulentos não estabelecem um estado de profago e por isso raramente

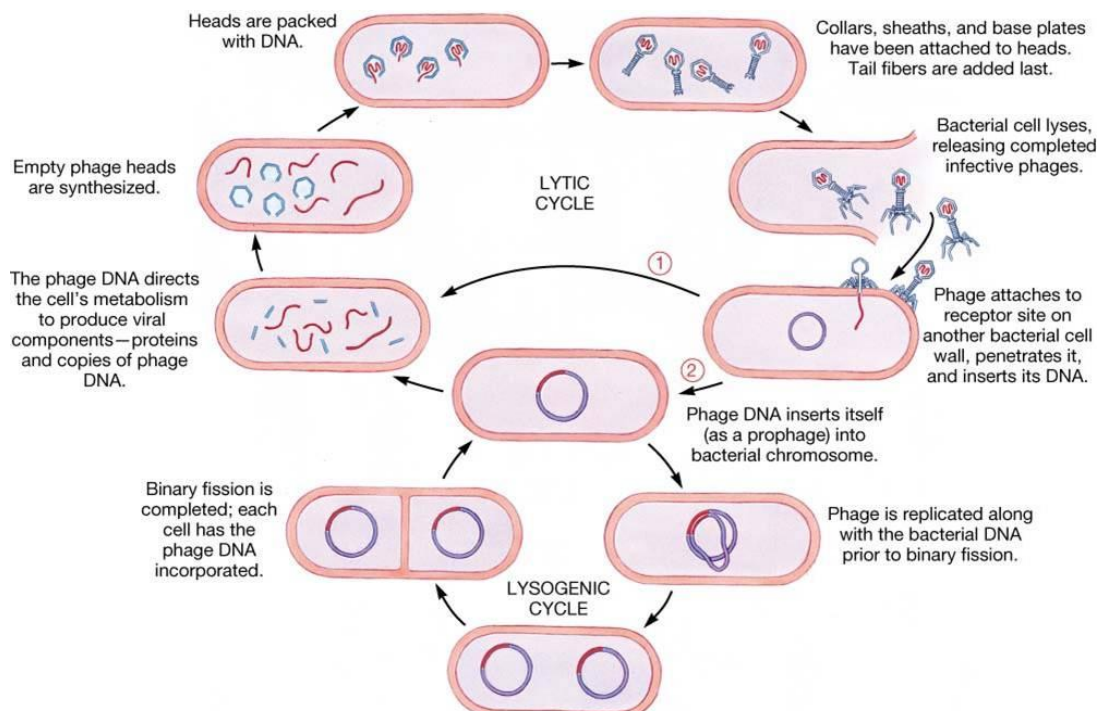


Fig. 3 - (1) Ciclo lítico dos fagos virulentos; (2) Ciclo lisogénico dos fagos temperados. (Elizabeth Kutter et al., 2013)

possuem ou transferem genes de fatores virulentos entre células bacterianas. Após infecção, os fagos virulentos degradam o genoma e outras macromoléculas da célula hospedeira, comprometendo o seu metabolismo desta. Alguns destes fagos codificam os seus próprios mecanismos utilizando as vias metabólicas hospedeiras, e outros alteram simplesmente as vias pré-existentes na célula hospedeira para a sua replicação viral. Contudo, dada a vasta quantidade e variedade de fagos, os processos podem ocorrer em simultâneo dependendo da especificidade fágica e da bactéria hospedeira (Burrowes et al., 2011).

A gama hospedeira do fago é geralmente estreita, restrita a uma única espécie bacteriana ou frequentemente apenas a certas estirpes de uma espécie (Hyman e Abedon, 2010). Todavia, alguns fagos exibem uma gama mais larga de hospedeiros e infetam um subconjunto grande de uma espécie ou até múltiplas espécies (Chen e Novick, 2009). Para um fago ser capaz de infetar eficazmente uma célula hospedeira tem de ser adsorvido para o citoplasma da célula; inserir o seu material genético (e quaisquer proteínas acessórias); manter estável esse material genético enquanto a maquinaria hospedeira é convertida para replicação fágica; gerar e montar componentes em viriões maduros e finalmente lisar a célula e libertar fagos progenitores.

Qualquer um destes passos pode ser bloqueado por mecanismos da célula hospedeira, impedindo assim a infecção produtiva da estirpe bacteriana e excluir esta espécie ou estirpe da gama hospedeira do fago em questão (Abedon e Abedon, 2010). Para além disso, quando um fago é um agente infetante de uma estirpe bacteriana, essa estirpe pode desenvolver resistência ao fago modificando ou regulando negativamente os recetores fágicos. Por vezes, isto é prejudicial para a sobrevivência da estirpe bacteriana no seu ambiente natural e pode reduzir a sua virulência e

consequentemente a sua viabilidade. Em determinadas situações, os fagos são capazes de superar as resistências bacterianas através de mecanismos de adaptação (Levin e Bull, 2004)

De acordo com Weitz et al. (2010) os fagos experimentam mutações que lhes conferem adaptabilidade às alterações tanto do hospedeiro como ambientais. Assim sendo, as bactérias hospedeiras e os fagos perpetuam a sua evolução mutuamente num complexo equilíbrio dinâmico. Além disso, são o grupo de organismos mais abundante e geneticamente mais diverso e por isso as suas interações influenciam fortemente os ciclos bio- e geoquímicos, a incidência de infeções humanas e a diversidade do genoma microbiano.

Taxonomia

Os fagos são classificados pela *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* de acordo com morfologia e ácido nucleico. O genoma destes é composto de ADN em cadeia única ou dupla ou ARN de comprimento muito variável, dispostos de forma linear ou circular. Foram distribuídos em 12 famílias das quais a *Myoviridae*, *Siphoviridae* e a *Podoviridae* representam 95% do número de fagos identificados (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação de fagos (Crespo, 2009)

Família	Ácido Nucleico	Membros e Principais Características
<i>Myoviridae</i>	dsADN	Bacteriófagos T4 (Fig. 4), T2, e Mu. Cauda contráctil
<i>Siphoviridae</i>	dsADN	Bacteriófago λ . Cauda não contráctil
<i>Podoviridae</i>	dsADN	Bacteriófagos P22 e T7. Cauda curta
<i>Tectiviridae</i>	dsADN	Bacteriófagos Bam35 e PRD1, bacteriófagos <i>thermus</i> 37-61. Cápsula dupla, um lípido interno
<i>Plasmaviridae</i>	dsADN	Infetam <i>Mycoplasma</i> . Pleomorficos
<i>Corticoviridae</i>	dsADN	Infetam <i>Pseudomona</i> . Lipidos internos
<i>Microviridae</i>	ssADN	Bacteriófagos G4 e Φ X174. Capsídeo icosaedrico com picos
<i>Inoviridae</i>	ssADN	Bacteriófago M13. Filamentosos
<i>Cysaviridae</i>	ssARN	Infetam <i>Pseudomona</i>
<i>Leviviridae</i>	ssARN	Colifagos MS2 e Q β . Capsídeo icosaedrico; ligam-se a pilos F
<i>Lipothrixviridae</i>	dsADN	Infetam membros de <i>Archaea</i> . Contêm proteínas que se ligam a ADN
<i>Fuselloviridae</i>	dsADN	Infetam membros de <i>Archaea</i>

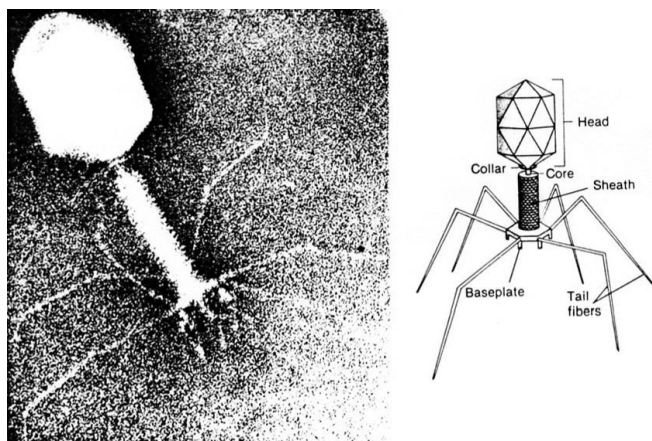


Fig. 4 - Esquerda: Micrografia eletrônica de um bacteriófago T4. Direita: Modelo de um bacteriófago T4. O fago possui ADN linear dentro da cabeça isoédrica que é injetado para a célula hospedeira através do core oco. Os *tail fibers* estão envolvidos no reconhecimento de recetores virais específicos na superfície da célula bacteriana (Elizabeth Kutter et al., 2013).

Farmacodinâmica

São poucos os estudos que abordam a farmacodinâmica no âmbito de terapia fágica, o que pode parecer estranho dado que se trata de questões importantes como o efeito terapêutico *versus* nocivo de um

fármaco e as doses associadas. Abedon e Abedon (2010) sugerem que esta lacuna na literatura pode ser justificada pelo facto de a dose correta de um fármaco autoamplificador poder parecer menos importante para atingir a dose terapêutica, bem como pela relativa segurança destes fármacos. Os autores realçam que a ignorância da farmacodinâmica pode custar a eficácia da terapia fágica e que certamente há casos em que a terapia não é bem sucedida pela administração de doses insuficientes de fagos.

O êxito da terapia fágica depende do fornecimento de uma densidade de fagos suficiente no local das bactérias alvo de forma a destruí-las a um ritmo e magnitude adequados. A densidade de fagos é aumentada para uma densidade adequada através da replicação *in situ* (conhecida como terapia ativa), ou através da dosagem farmacológica convencional (terapia passiva). Estas formas de proporcionar uma densidade adequada têm de ser eficazes de forma a contrariar os mecanismos de perda de fagos (Abedon e Abedon, 2010).

Payne e Jansen (2003) propõem que a dinâmica da terapia ativa é semelhante à

dinâmica populacional de modelos ecológicos de predadores-presas e modelos epidemiológicos de hospedeiro-parasita. Desenvolveram modelos matemáticos simples, preditivos do comportamento genérico de fagos *in vivo*. O limiar de proliferação (X_p) representa a densidade mínima de bactérias suscetíveis, acima da qual o número de fagos aumenta por replicação (pressuposto na terapia ativa). Wiggins e Alexander (1985) acreditam que o limiar é semelhante para a maioria das combinações fago-hospedeiro. O tempo desde a administração dos fagos no local de infecção até este limiar ser atingido, é o tempo crítico de proliferação (T_p). Os autores salientam que fagos administrados num tempo demasiado precoce podem resultar na sua remoção sistémica antes de X_p ser atingido.

De acordo com Payne e Jansen (2003) qualquer abordagem preditiva de terapia fágica deve estimar a magnitude de T_p e se este for muito elevado *in vitro*, deduz-se que a fagoterapia ativa não é viável. Os autores sugerem que no caso de estudos clínicos em que não se conhece a dose e *timing* ideais, o mais importante é assegurar T_p , ou seja é preferível introduzir doses repetidas para assegurar que estes tempos sejam atingidos a administrar um número reduzido de doses elevadas.

Segurança

Os bacteriófagos são geralmente considerados seguros; não há evidência na literatura de que possam causar efeitos secundários importantes, induzir doença, ou lesar células mamíferas (Kutter, 2005; Górski et al., 2009). Uma preocupação especial é a possibilidade de transferência, mediada por fagos, de genes envolvidos em patogenicidade bacteriana (Duckworth, 2002). Portanto, reafirma-se que apenas fagos obrigatoriamente virulentos (ciclo lítico) são considerados adequados na fagoterapia (Henein, 2013). Alguns autores sugerem que, em teoria, a rápida libertação de endotoxinas

bacterianas (fenómeno observado com alguns antibióticos), após lise bacteriana mediada por fagos, pode causar efeitos secundários (Lepper et al., 2002; Dixon, 2004). Contudo, os autores Góski et al., 2009, com notável experiência prática na aplicação de fagoterapia, negam registo deste fenómeno. Foi possível manipular fagos de forma a matarem as bactérias alvo, sem lisá-las (Westwater et al., 2003). Isto impossibilita a terapia ativa, mas pode ser uma alternativa em casos onde endotoxinas bacterianas revelem ser um problema.

Os primeiros preparados de fagos que foram extensivamente estudados no âmbito da segurança genética e toxicidade oral, estão agora registados para utilização na indústria alimentar e agrícola. *LMP-102* e *Listex P100* contêm fagos específicos para estirpes de *Listeria monocytogenes* e são usados na prevenção de infeções por este agente em alimentos (Carlton et al., 2005; *Food Drug Administration*, 2006; *EBI Food Safety*, 2009). Contudo, a fagoterapia pode envolver uma única ou repetidas utilizações com altas titulações, por várias vias de administração, o que é diferente da ingestão de pequenas quantidades em produtos alimentares (Henein, 2013).

A administração intravenosa de fagos foi descrita, sem efeitos nocivos registados, como uma ferramenta de diagnóstico para testar a resposta imunitária de doentes com imunodeficiências (Borysowski e Górski, 2008). Para efeitos semelhantes, Ochs et al. (1971) descrevem a administração intravenosa de doses elevadas do fago ΦX 174 com conhecidas propriedades antigénicas potentes, sem evidência de efeitos secundários.

De acordo com Merril (1975), nos anos 70 foram utilizadas vacinas humanas em larga escala com segurança, que a posteriori se descobriu conterem altas concentrações de fagos. A constatação deste facto não impediu a sua comercialização.

Henein (2013), manifesta surpresa pelo facto de não haver estudos *in vitro* da

citotoxicidade de fagos e explica que isto provavelmente se deve ao uso de longa data de fagoterapia sem registos de efeitos secundários em humanos e animais, especialmente nos países da antiga União Soviética. Também salienta que os fagos podem ser considerados nanopartículas, dado as suas dimensões. Deste modo pode ser útil estudá-los de forma semelhante a nanopartículas, nomeadamente o estudo de cargas de superfície, agregação e nanotoxicidade.

Na presente revisão são descritos, em algum detalhe, os testes de segurança em humanos já executados e documentados, seguindo os critérios *gold standard* da comunidade médica ocidental (Wright et al., 2009; Merbishvili et al., 2009; Rhoads et al., 2009; Bruttin e Brüssow, 2005; e Sarker et al., 2012).

Farmacocinética

A administração de fagos pode ser tópica, entérica, via inalatória, enteral (*per os*) ou via intravenosa. Para além da via enteral, a distribuição sistémica é conseguida através de métodos não injectáveis como a aplicação em membranas mucosas, por exemplo, administração anal, aplicação na pele e aplicação na cavidade nasal (Abedon e Abedon, 2010). Górski et al. (2006) salientam que a translocação fágica para o sangue é surpreendentemente boa sendo que a administração anal, por exemplo, resulta em picos de densidade tão altos quanto aqueles observados na administração intramuscular. Contudo, são necessários mais estudos para compreender como varia a translocação de fagos diferentes, em doentes diferentes (Abedon e Abedon, 2010). Gill e Hyman (2010) explicam que os preparados de fagos têm uma potência oral notável; a administração oral distribui os fagos para uma grande percentagem do corpo e há uma elevada tolerância pelos doentes. Esta

distribuição eficaz inclui o acesso ao sistema nervoso central (Górski et al., 2006).

De acordo com Abedon e Abedon (2010), o declínio fágico, uma redução na densidade de fagos durante o processo de administração, após absorção para a corrente sanguínea, ou após distribuição para outros tecidos, pode se dar por diversos mecanismos. Restrição fágica por endonucleases associadas a bactérias compromete tanto a terapia ativa como a passiva por inativação. O dano de proteínas ou de ácido nucleico dos fagos pode ter impacto na terapia passiva ou ativa, respectivamente. Defesas não específicas dos doentes também podem acarretar uma redução na densidade dos fagos, nomeadamente o ácido gástrico e o sistema reticuloendotelial.

Ensaio Animais

Chhibber et al. (2013) num estudo (ensaio) experimental controlado compararam a eficácia de linezolid e do fago MR-10 (lítico) no tratamento de infeções por MRSA nas patas traseiras de ratos com diabetes induzida farmacologicamente. Os resultados mostraram uma eficácia semelhante entre o fago MR-10 e o linezolid e uma eficácia máxima em terapia combinada (Fig. 5). Em média, dentro de 5 dias, os níveis de infeção reduziram para valores insignificantes nestes três grupos de tratamento comparativamente a 15 dias no grupo de controlo, sem tratamento. A avaliação da progressão da infeção foi feita pela medição da carga bacteriana (Log UFC/ml), atribuição de um score de lesão (0-4), medição de edema (mm), estimação da atividade de mieloperoxidase (U/ml) e leitura histopatológica. Ensaio preliminares com diferentes multiplicidades de infeção (MOI) foram executados para determinar a dose a utilizar.

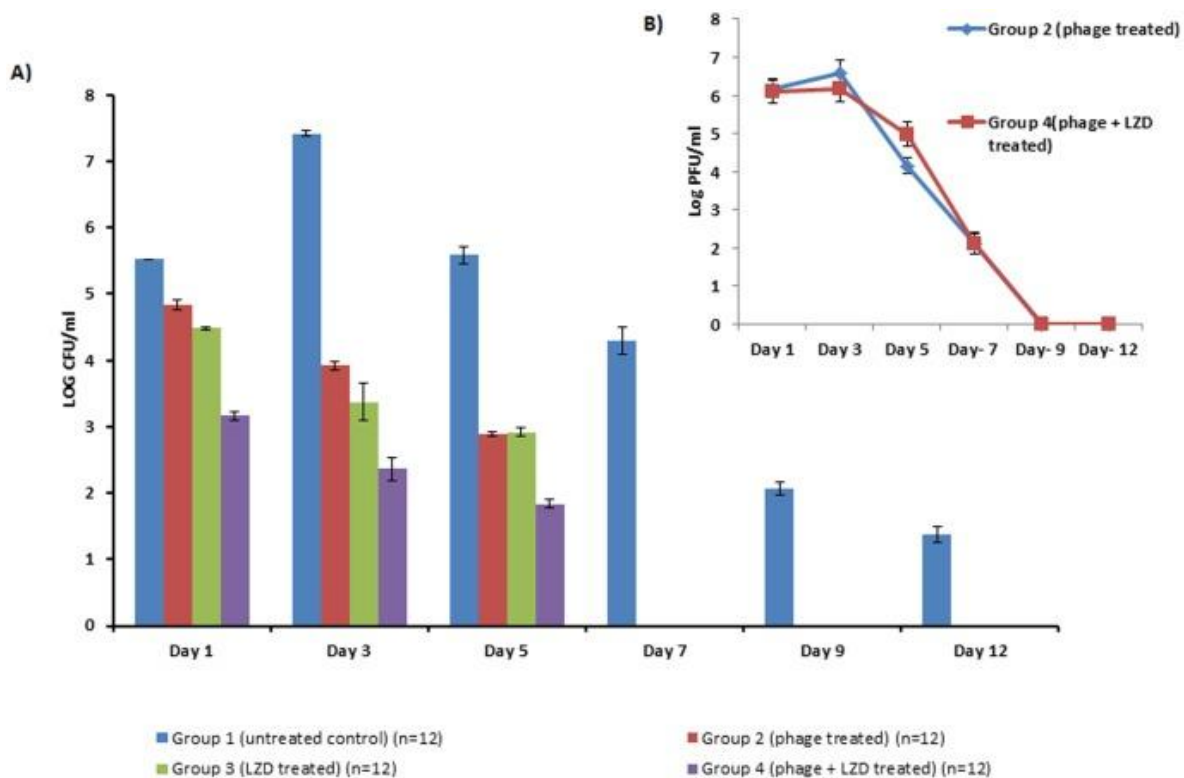


Fig. 5 - A) Carga bacteriana (em termos de Log CFU/ml) nas patas traseiras de ratos diabéticos após o tratamento com fagos MR-10, linezolide e a combinação de ambos (Chhibber et al., 2013).

Um ensaio semelhante foi executado por VinodKumar et al. (2011) na Índia com ratas diabéticas. Esta equipa utilizou uma dose letal (verificada pelo grupo de controlo, sem tratamento) de MRSA, isolado do pé de um doente diabético. Foi isolado e purificado o fago Ø SH-56 (lítico) com uma atividade antibactericida contra 74% das estirpes de MRSA isoladas. As ratas do grupo de controlo inoculadas com 10^9 CFU de MRSA morreram todas no 6º dia de infeção, enquanto os dois grupos infetados e tratados com bacteriófagos e Clindamicina ficaram livres de infeção ao 8º e 10º dia, respetivamente.

Yilmaz et al. (2013) estudaram a eficácia do uso combinado intraperitoneal de bacteriófagos e teicoplanina ou imipenemo/cilastatina mais amicacina no tratamento de MRSA e *P. aeruginosa* relacionados com próteses ortopédicas em ratos. No grupo MRSA, o número de unidades formadoras de colónias por animal foi reduzido 10 vezes pela terapia combinada de fagos e antibióticos, comparativamente ao

grupo de controlo. O tratamento apenas com fagos ou antibióticos foi menos eficaz. A microscopia eletrónica evidenciou que biofilmes formados por MRSA foram totalmente removidos no grupo tratado com fagos e antibióticos, enquanto que a espessura dos biofilmes compostos por *P. aeruginosa* não variou entre os grupos tratados.

Capparelli et al. (2007) executaram uma série de ensaios com ratos infetados com MRSA, em que, para além de demonstrarem a eficácia de fagoterapia em infeções sistémicas, comprovaram outros aspetos relevantes. No âmbito da conhecida limitação farmacodinâmica condicionada pela remoção dos fagos da circulação pelo sistema reticuloendoplasmático, os autores isolaram um fago mutante (M^{Sa}) capaz de persistir durante 21 dias na circulação sanguínea de ratos repetidamente injetados intraperitonealmente com uma dose não letal de MRSA (técnica descrita em 2006 por Capparelli et al.). Mostraram a eficácia do fago M^{Sa} em curar ratos sistemicamente

infetados há 10 dias com a dose mínima de MRSA não removida pela imunidade inata dos ratos (administração IV do fago foi no dia 10 de infecção). Todos os ratos de controlo morreram enquanto todos os tratados sobreviveram. A persistência do fago na circulação sanguínea e os resultados deste ensaio sugerem uma fácil e correta seleção de fagos para utilização profilática e em infeções de maior duração.

Os autores estipularam que o limiar de proliferação (X_p - densidade mínima de bactérias suscetíveis) desta combinação fago-hospedeiro é de 10^4 UFC/ml, infetando ratos com diferentes doses de MRSA e tratando estes com a mesma dose de fago (10^9 UFP). Isto é a favor de o limiar ser semelhante para a maioria das combinações fago-hospedeiro, como descrito por Wiggins e Alexander (1985).

MRSA pode existir como um patógeno intracelular em macrófagos de rato, característica que foi aproveitada para testar a eficácia do fago nestes agentes. O fago M^{Sa} sozinho mostrou-se incapaz de reduzir o número de bactérias intracelulares, contudo quando administrado em ratos já dentro de bactérias de MRSA, a citometria de fluxo confirmou uma redução significativa das bactérias intracelulares presentes antes da administração. Se for assumido que isto acontece *in vivo*, entende-se o facto de 4 dias de terapia fágica resultarem em esterilidade completa dos ratos. Dada a remoção completa do agente patogénico (tanto no sangue, baço, rins e coração) dos 50 ratos infetados, os autores exploraram a formação de resistências aos fagos *in vitro* e encontraram uma frequência de bactérias resistentes de 1.3×10^{-8} . Isto confirma estudos prévios que indicam que o fenómeno é mais raro do que a resistência a antibióticos.

Finalmente esta equipa testou a eficácia do fago em abscessos por MRSA e concluiu que não altera a incidência da formação destas lesões, contudo reduz significativamente a carga bacteriana e o peso dos abscessos. Presumivelmente, não há

uma remoção eficaz dos MRSA no abscesso porque o X_p não é alcançado e por isso há terapia passiva ao invés da terapia ativa assistida na infeção sistémica.

Ensaio Humano Gold Standard

Estudo britânico fase I/II: otites por *Pseudomonas aeruginosa*

A Biocontrol Lda utilizou os resultados favoráveis de um ensaio de fagoterapia contra otites por *Pseudomonas* em cães, para obter aprovação regulamentar para um ensaio humano fase I/II. Este estudo placebo controlado duplamente cego randomizado, aprovado por *UK Medicines and HealthCare Products Regulatory Agency* e pelo *Central Office for Research Ethics Committees*, foi liderado por Wright (2009). Foram seleccionados 6 fagos (5 *podovirus* e um *mirovirus*) preparados pelos laboratórios desta empresa e os casos de otites seleccionados eram sensíveis a pelo menos um destes fagos. Dos 24 doentes seleccionados com otite

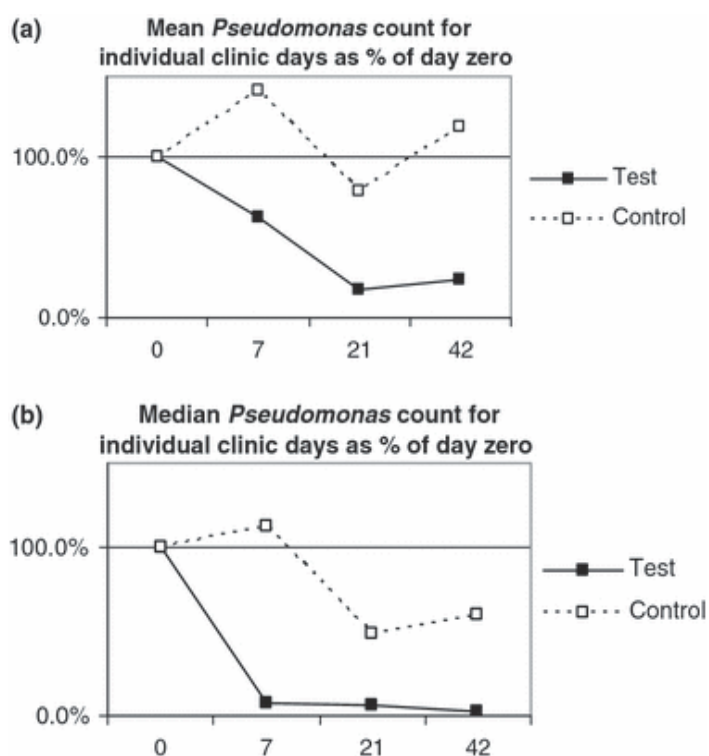


Fig. 6 - Média (a) e mediana (b) de carga de *Pseudomonas aeruginosa*, como percentagem do dia 0, por dias clínicos de tratamento com fagos e placebo (Wright et al., 2009).

crónica (2-58 anos) por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, 12 receberam uma dose única de 10^5 fagos (em 0,2ml) e os outros 12 receberam um placebo sem qualquer outro antibiótico tópico ou sistémico. Tendo os resultados clínicos como indicador primário e contagem bacteriana como secundário, os resultados do ensaio foram positivos dado que não houve registo de efeitos secundários nem evidência de toxicidade local ou sistémica. Além disso, houve uma melhoria significativa nos doentes tratados com fagos, nomeadamente 3 dos 12 doentes estavam abaixo do limite detetável no último dia de observação (Fig. 6 e 7). Também foi reportada a replicação dos 6 fagos testados com uma média de 23,1 dias de duração de replicação.

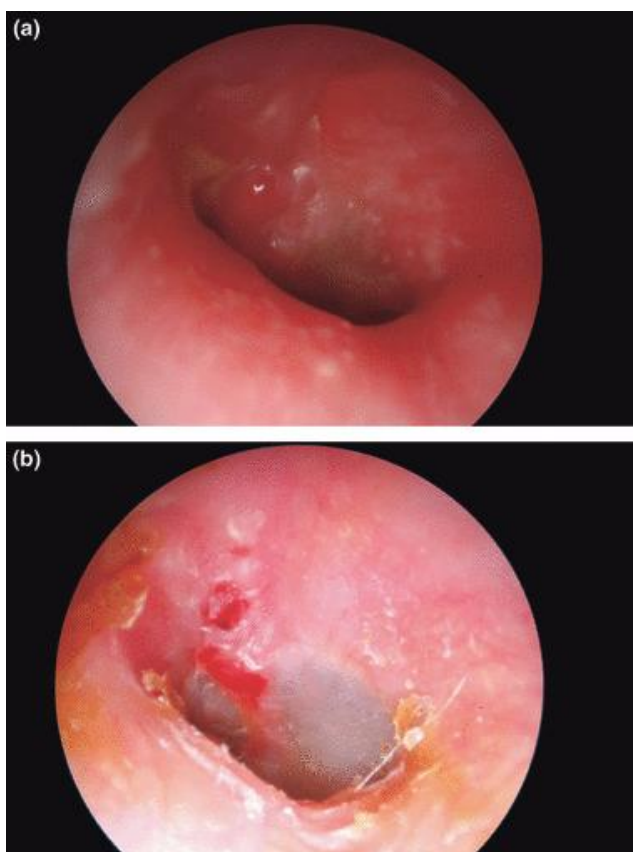


Fig. 7 - Documentação fotográfica do canal auditivo de um doente antes (a) e depois (b) de fagoterapia. Este doente tinha uma otite externa crónica resistente a antibioterapia. Havia edema da pele do canal profundo e ulceração superfície superior do cana (Wright et al., 2009).

Estudo belga fase I: Queimaduras infetadas com *P. aeruginosa* e *S. aureus*

Em colaboração com biólogos de fagos de Moscovo e Tbilisi, um grupo de cirurgiões e cientistas belgas formaram o *Phages for Human Applications Group Europe* (P.H.A.G.E.) com o objectivo de promover investigação e ensaios clínicos regulamentados, sem fins lucrativos. A atenção do grupo foi focada na unidade de queimados do *Queen Astrid Military Hospital* em Bruxelas após um estudo observacional de um ano de Pirnay (2003) divulgando que em 441 doentes queimados internados, 70 foram colonizados com *P. aeruginosa* dos quais 8 morreram durante o internamento. Depois da aprovação ética da comitê competente, e de um estudo de controlo de qualidade rigorosa dos preparados de fagos, descrito por Merabishvili et al. (2009) (determinação da estabilidade em armazenamento, pirogenecidade, esterilidade, citotoxicidade, presença de fagos temperados ou de genes codificadores de toxinas e a confirmação por microscopia electrónica da morfologia das partículas e da interação específica com bactérias alvo) os nove voluntários colonizados foram selecionados para o pequeno ensaio de segurança. O preparado de fagos incluiu 3 fagos, um *Myovirus* e um *Podovirus* contra *P. aeruginosa* e um *Myovirus* contra *S. aureus*. Em cada doente, parte da lesão foi vaporizada com o preparado de fagos, enquanto a restante lesão serviu como controlo. Os doentes foram observados durante 3 semanas e ambas as partes das lesões foram submetidas a biopsia antes e depois da aplicação do preparado de fagos. Não houve registo de efeitos adversos, anormalidades clínicas nem alterações laboratoriais de possível relação com a aplicação de fagos. O ensaio revela pouco quanto à eficácia do tratamento dado que o tempo entre a deteção de colonização, inclusão do doente no ensaio, e a aplicação do preparado de fagos, foi demorado e na maior parte dos casos foi iniciado o

tratamento empírico com antibióticos, o que explica os baixos níveis microbianos em T0.

Este estudo piloto é considerado um importante passo na promoção da fagoterapia na medicina ocidental. Para além disso, estimulou a discussão para o estabelecimento de um enquadramento regulamentar para a aplicação de fagoterapia (Verbeken, 2012).

Estudo americano fase I: Úlceras venosas

A unidade de queimados em Lubbock, no Texas, tem muita experiência com a utilização do preparado *Pyophage* (encomendado do *Eliava Institute*) em doentes com queimaduras complicadas por infeções. Em 2009, Rhoads et al., com a aprovação da FDA, executaram um estudo de fase I prospetivo, duplamente cego e randomizado, no âmbito de fagoterapia no tratamento de úlceras venosas dos membros inferiores. Utilizaram o preparado WPP-201 da Intralytix composto por 8 fagos líticos (incluindo das famílias *Podoviridae* e *Myoviridae*), cada um a uma concentração de 1×10^9 UFP/ml: 5 fagos contra *P. aeruginosa*, 2 contra *S. aureus* e 1 contra *E. coli*. Cada um dos fagos foi caracterizado pela taxonomia, genoma (tamanho, perfil e sequência completa), perfil de proteínas e morfologia das placas em culturas. Os doentes participantes no ensaio tinham úlceras venosas há mais de 30 dias com ou sem sinais de infeção. 39 completaram o ensaio, dos quais 21 serviram de grupo de controlo e 18 foram tratados com o preparado de fagos. Em todos os casos o curativo foi trocado de 3 em 3 dias e o preparado de fagos foi administrado diretamente na lesão uma vez por semana durante 12 semanas no grupo de doentes tratados. Não foram registadas efeitos secundários nem de toxicidade durante o período de tratamento nem à 16^a e 24^a semana. O estudo não foi elaborado para estudar a eficácia do tratamento, contudo, nota-se que não houve diferença entre o grupo de controlo e o tratado. A falta de eficácia pode ser explicada por não ter sido estudada a composição da flora bacteriana

das lesões e da sua sensibilidade ao preparado de fagos.

Estudo suíço fase I/II (Nestlé): diarreia por E. Coli

A terapia fágica oral está a ser avaliada como uma forma de tratamento de casos de diarreia causados por águas contaminadas. Até agora os ensaios humanos, levados a cabo pela empresa multinacional Nestlé, foram focados em *E. coli* (Bruttin e Brüssow, 2005 e Sarker et al., 2012). Dois ensaios de segurança foram executados com indivíduos saudáveis, envolvendo, em um deles, a toma de uma dose de 3×10^3 e 3×10^5 UFP/ml/dia x 2 dias de um preparado de um único fago T4, e no outro, a toma de uma dose de 3×10^9 UFP/ml/dia x 2 dias de um preparado de 9 fagos T4. Não foi registado nenhum efeito adverso. As fezes fago-positivas a uma estirpe de *E. coli* indicadora aumentaram com a dose. Nem fagos T4, nem anticorpos contra os fagos, foram detetados no soro dos voluntários.

Um terceiro ensaio clínico, dirigido por Brüssow do departamento de investigação da Nestlé, e decorrido no Bangladesh para avaliar a segurança e eficácia de um cocktail de fagos (semelhante a *anti-E. Phage*, comercializado na Rússia por Microgen) no tratamento de diarreia por *E. coli* enterotoxigénica e *E. coli* enteropatogénica em crianças (clinicaltrials.gov, ID: NCT00937274), terminou recentemente e os resultados espera-se que sejam publicados brevemente.

Abordagens da fagoterapia

Os temas e respetivos ensaios referidos nesta secção encontram-se resumidos em anexo.

MRSA

Infeções por MRSA são de particular preocupação dada a sua reduzida

suscetibilidade a antibioterapia e vasta prevalência em infeções associadas a cuidados de saúde. O cocktail *Pyophage*, da autoria do *Eliava Institute*, contém fagos anti-*Staphylococcus* potentes da família de largo espectro, sB1-saph fago K, com atividade anti-*S. aureus*. O desenvolvimento de resistência de MRSA para os fagos utilizados é muito pouco frequente, provavelmente porque o recetor primário ainda não identificado é importante para a célula patogénica. Na perspetiva da fagoterapia, o MRSA é apenas outra estirpe de *Staphylococcus* (Abedon, 2011).

Após o aparecimento de antibióticos, o estudo de fagos de *Staphylococcus* motivou-se pela vasta aplicação dos fagos para diferenciar estirpes clínicas. Mais de 230 fagos foram caracterizados morfológicamente e descritos como *Caudovirales*. Fagos utilizados nestas infeções, para além de serem obrigatoriamente líticos, devem infetar um espectro largo de *Staphylococcus aureus* e infetar o máximo de estirpes clinicamente relevantes (Klem, 2013).

Os resultados de ensaios envolvendo MRSA como alvo são especialmente positivos, como por exemplo, o estudo de Slopek et al. (1987) com resultados positivos em 92% dos 550 casos de infeções de etiologia única ou mista, envolvendo *Staphylococcus aureus* multiresistente. Outros ensaios a notar, focados na fagoterapia em casos de sepsis aguda por *Staphylococcus* multiresistente, são o de Weber-Dabrowska et al. (2003) em que houve uma taxa de sucesso de 85%, e o de MacNeal et al. em que houve sucesso terapêutico em todos os casos. Jikia et al. (2005) descrevem a cura de dois doentes

com queimaduras por radiação, infetadas com *Staphylococcus* multiresistente (incluindo ciprofluxacina), refractárias a um mês de antibioterapia, com *PhageBioDerm*.

A fagoterapia de MRSA está descrita como aplicação local, por exemplo a injeção direta para o interior de furúnculos, ou aplicações mais sistémicas, como por exemplo, via intraperitoneal. A prevenção destas infeções é tema de investigação, como por exemplo o trabalho da empresa inglesa, *Novolytics*, na utilização de um gel de fagos contra MRSA, para tratar o estado de portador nasal deste organismo e, conseqüentemente, reduzir a incidência da transmissão (Mann, 2008). Esta empresa, juntamente com outra empresa inglesa (*PhicoTherapeutics*) e uma canadiana (*BioPhage Pharma Inc.*) está a trabalhar para poderem executar ensaios clínicos neste âmbito. A aprovação desta abordagem terapêutica encontra menos obstáculos que uma aplicação sistémica dos fármacos, e conseqüentemente pode levar produtos fágicos para o mercado mais precocemente (Housby, 2009). O'Flaherty et al. (2005), com o mesmo objetivo preventivo, notaram uma redução 100 vezes maior na densidade bacteriana em mãos após lavagem com uma solução de *Ringer* com 10^8 fagos/ml, comparativamente a uma solução controlo sem fagos.

Úlceras Venosas

Apesar de o tratamento de lesões ulcerosas (por exemplo, úlceras diabéticas e úlceras venosas) representar outra área de resultados relativamente positivos e promissores na fagoterapia, e de já haver um ensaio clínico de referência documentado



Fig. 8 - Documentação fotográfica do tratamento de uma úlcera venosa de uma doente com 80 anos de idade com *PhageBioDerm*. De esquerda para a direita: lesão inicial, aplicação de *PhageBioDerm*, dia 10, 30 e 90, respetivamente (Markoishvili K, 2002).

(Rhoads et al., 2009), também exemplifica a dificuldade em determinar rigorosamente a eficácia da fagoterapia. Apesar de a maioria dos casos descritos terem sido tratados com antibióticos durante longos períodos sem sucesso, não se pode excluir a hipótese de haver outros fatores curativos para além dos fagos, ou até a improvável cura espontânea das lesões. Mediante o sucesso demonstrado na aplicação tópica de fagos, a fagoterapia no tratamento de úlceras no contexto da prática médica ocidental parece promissora, mas o suporte por estudos duplamente cegos é menos provável (Abedon, 2011).

Os resultados referidos na secção anterior sobre MRSA, também são aqui relevantes, nomeadamente a utilização do produto, *PhageBioDerm*, desenvolvido pelo *Eliava Institute*. É um polímero biodegradável impregnado com antibióticos e bacteriófagos líticos, de libertação controlada, para ser usado no tratamento de lesões cutâneas, queimaduras, osteomielites e doença periodontal. A venda deste produto foi licenciada na República da Geórgia e em 1999-2000, 107 doentes com úlceras refratárias a tratamento convencional foram tratados com *PhageBioDerm* isoladamente ou em combinação com outros tratamentos. Houve cura completa em 70% dos doentes e os autores referem que os bacteriófagos no polímero ajudaram a eliminar *S. aureus* multirresistente nas lesões (Markoishvili K, 2002) (Fig. 8).

Profilaxia

A profilaxia de lesões tanto cirúrgicas, como traumáticas e de queimaduras, são temas relevantes na fagoterapia. É particularmente indicada na Geórgia em casos de lesões extensas e em situações em que é difícil obter concentrações adequadas de antibiótico. No âmbito de profilaxia, a literatura descreve tanto administrações locais como sistémicas. Desde a extensa utilização de fagos para a profilaxia de gangrena gasosa em lesões traumáticas em soldados (Krestovnikova et al., 1947); à

profilaxia de disenteria em crianças com a toma oral de fagos (Babalova et al., 1968); à profilaxia pós cirúrgica discutida por Chanishvili e Sharp (2009) (ver tabela).

A farmacodinâmica particular dos fagos é também vantajosa no uso profilático, na medida em que a densidade dos fagos é o produto dos administrados e dos gerados por replicação em terapia ativa (Abedon, 2011). Ou seja, teoricamente não é necessário haver uma densidade elevada de fagos para que seja eficaz numa eventual primo infecção.

Infeções Purulentas

O produto *Pyophage*, bem conhecido na Geórgia, é rotineiramente utilizado com sucesso no tratamento de lesões próximas da superfície cutânea. Não são dispensados os passos comuns na antibioterapia destas lesões, nomeadamente a abertura desta; remoção de tecido necrótico, para uma limpeza eficaz e exposição de tecido ainda vivo; assegurar drenagem e finalmente encerramento atempado da lesão. O encerramento prematuro da lesão, sem haver ainda ambiente estéril, pode culminar em complicações, tal como na abordagem com antibióticos (Abedon, 2011).

Slopek et al. (1985) num dos seus artigos relatam uma taxa de sucesso de 92.4% no tratamento de 370 casos de infeções supurativas das quais 241 não estavam a fazer antibióticos concomitantemente. Num outro estudo já referido, Slopel et al. (1987) relatam a cura de 7 doentes com pericardite supurativa e uma alta taxa de sucesso em outras infeções supurativas.

A fagoterapia no combate a infeções cirúrgicas, rotineiramente utilizada na Geórgia e Polónia, tem indicação prioritária em casos de dificuldade de penetração de antibióticos por má circulação e/ou a presença de barreira fibrogranular (p.e. no pé diabético); osteomielite crónica; e lesão de grande superfície (Kutter, 2010).

Weber-Dabrowska et al. (2001) relatam a resolução de infeções pós-

operatórias, em doentes oncológicos, por agentes multirresistentes. Os casos incluíram infecção cutânea, pulmonar, pós-radioterapêutica, meníngea, de decúbito e sépsis bacteriana aguda. As infecções foram resolvidas nos 20 doentes tratados.

Infeções Gastrointestinais

A fagoterapia foi extensamente explorada para tratar/prevenir diarreias incapacitantes em soldados russos durante e depois da Segunda Guerra Mundial. Numa revisão de Chanishvili e Sharp (2009) da literatura russa disponível, está descrita a utilização *per os* de fagos na terapia de disenteria, com replicação fágica até concentrações de 10^{12} fagos/ml, a aplicação de altas doses por ml, a neutralização do pH do trato gastrointestinal para preservar os fagos, a redução de sintomas e da taxa de mortalidade e a administração intravenosa, intraduodenal, intramuscular, rectal e oral no tratamento de *Salmonella*.

Slopek et al. (1987) relatam 91-100% de sucesso no tratamento de 42 casos de "doenças do sistema digestivo" e 6 casos de "doenças infecciosas do trato alimentar".

Para além da literatura sobre fagoterapia contra *Salmonella typhi* (incluindo Mikeladz et al., 1936; Tsouloukidze et al., 1936; Desranleau et al., 1949; Chanishvili e Sharpe, 2009) e no tratamento e profilaxia de disenteria (Babalova et al., 1968; Lurie et al., 1938;), foram executados dois rigorosos ensaios de segurança em humanos já referidos anteriormente. Estes trabalhos demonstram todos os elementos chave de ensaios clínicos modernos com a utilização de fagos, principalmente da família T4, isolados de fezes de doentes pediátricos no Bangladesh.

A grande epidemia de infeções alimentares por estirpes de *E. coli* enterohemorrágicas experimentada na Alemanha durante o verão de 2011, representa uma situação em que bacteriófagos poderão ser utilizados. O surto de O104:H4 provocou 54 mortes e deixou

sequelas em centenas de doentes. O uso de antibióticos foi contra indicado pela possível ativação da expressão de toxina de *Shiga*. Apesar do centro de investigação da Nestlé ter oferecido um preparado de um fago lítico à entidade de saúde pública alemã, este tipo de tratamento não foi utilizado. Merabishvili et al. (2012) utilizaram esta estirpe de *E. coli* para demonstrarem que é possível, no contexto de um surto, selecionar e caracterizar geneticamente um fago terapêutico, de uma fonte ambiental, dentro de 3 dias.

Infeções oftálmicas

A experiência da aplicação oftalmológica é relativamente mais limitada, contudo alguns ensaios em humanos devem ser aqui referidos, nomeadamente o ensaio dirigido por Dautova, em que 30 doentes com queratites traumáticas bacterianas foram mais rapidamente tratados com fagoterapia comparativamente a 30 doentes com a mesma patologia, tratados com gentamicina (Chanishvili e Sharp, 2009). Outro ensaio de Kilasonia e Karanadze em 2001, envolveu 32 crianças com alergias a antibióticos e conjuntivite bacteriana aguda por organismos multirresistentes a antibióticos. Foram todos curados com fagoterapia tópica, sem recaída nos meses seguintes (Chanishvili e Sharp, 2009).

Infeções Respiratórias

Infeções respiratórias bacterianas, por estirpes resistentes a antibioterapia, são habitualmente candidatas a fagoterapia na Europa de Leste, tipicamente com um sucesso que ronda os 80-90%. Slopek et al. (1985) relatam uma taxa de sucesso de 82-92% em 180 casos com infeções respiratórias resistentes. O tratamento eficaz de uma criança com fibrose cística, infetada com *P. aeruginosa* e *S. aureus*, é descrita por Kvachadze et al. (2011) com a nebulização do cocktail *Pyophage*. Weber-Dabroska et al. (2001) trataram pneumonia com fagoterapia em 6 doentes oncológicos, que previamente

havam sido submetidas a antibioterapia sem sucesso.

Friman et al. (2013) verificaram que infecções crônicas de longa duração por *P.aeruginosa* em casos de fibrose cística estão associada a menor resistência a fagos que em casos de infecções agudas. Isto é consistente com os achados que *P. aeruginosa* clinicamente isolada é mais suscetível a fagos que *P. aeruginosa* isolada do ambiente (Selezska et al., 2012).

Vantagens e desvantagens da fagoterapia

(Tabela 3)

Vantagens	
Grande especificidade para patogénios hospedeiros com mínima disrupção da microflora normal.	Klem, (2013)
Devido ao ponto anterior, não há uma seleção de microflora resistente nem risco de infeções oportunistas.	Ramesh et al., (1999)
Grande segurança dos preparados fágicos purificados; não há registos de efeitos secundários importantes.	Ver secção sobre <i>Segurança</i>
Acima do limiar de proliferação (Xp) há replicação dos fagos com aumento de concentração destes nos locais de infeção (terapia ativa). Potencial de dose única pode ter interesse.	Ver farmacodinâmica; Loc-Carrillo & Abedon, (2011)
A ubiquidade dos fagos significa que encontrar novos agentes é um processo muito menos laborioso comparativamente aos antibióticos.	Abedon et al., (2011)
As bactérias hospedeiras e os fagos perpetuam a sua evolução mutuamente num complexo equilíbrio dinâmico e há uma contínua emergência de fagos que superam as resistências das bactérias	Weitz et al., (2010)
Bactérias mutantes resistentes a fagos podem estar associadas a menor virulência e maior suscetibilidade ao sistema imunitário.	Levin & Bull, (2004)
Mutações bacterianas, que conferem resistência a antibióticos, não alteram a suscetibilidade a fagos.	Donna, (2002)
Fagos podem ser geneticamente modificados para contornar limitações e/ou torna-los mais virulentas.	School et al., 2001; Westwater et al., (2003)
Componentes de fagos (por exemplo, enzimas lisinas) podem ser usados como agentes antimicrobianos.	Hagens et al. (2004)
Possibilidade de terapia combinada com outro fago, cocktails de fagos ou antibióticos.	
Possibilidade de diferentes vias de administração eficazes e boa potencia oral. Também são versáteis na forma de aplicação (líquida, creme e impregnados em tecidos ou matrizes).	Ver farmacocinética; Loc-Carrillo & Abedon (2011)
Vasta gama de aplicações possíveis nomeadamente, na conservação de alimentos e em produtos de descontaminação e de higienização	Donna, (2002)
As bactérias, após serem infetadas por fagos líticos, são incapazes de readquirir viabilidade. Antibióticos bacterioestáticos podem permitir a evolução de bactérias para a resistência.	Stratton, (2003)
Capacidade de destruir pelo menos alguns biofilmes.	Loc-Carrillo e Abedon, (2011); Sass e Bierbaum, (2007)
Baixo impacto ambiental dado que são compostos de proteínas e ácidos nucleicos.	Loc-Carrillo e Abedon, (2011)
Custo relativamente baixo.	Loc-Carrillo e Abedon, (2011)
Desvantagens	
Grande especificidade torna desapropriado para terapia presuntiva. A pesquisa recomendada de agente etiológico torna a fagoterapia menos prática em quadros agudos.	Donna, (2002)
As bactérias mutantes resistentes a fagos específicos.	
Comparativamente a agentes químicos, os fagos são organismos complexos com o potencial de transferir genes de toxinas entre bactérias.	ver secção sobre <i>Segurança</i>
Necessidade de formação específica para prescrição e administração de fagos.	Abedon et al., (2011)
Desconhecimento da comunidade médica ocidental de fagos como antimicrobiano.	Loc-Carrillo e Abedon, (2011)
Caracterização detalhada de cada fago pode tornar-se dispendiosa.	Loc-Carrillo e Abedon, (2011)
Necessidade de mais estudos criteriosos, duplamente cegos, randomizados com amostras grandes, que provem eficácia.	
Produção menos apelativa para indústria farmacêuticas comparativamente a antibióticos de largo espectro.	

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da fagoterapia.

Barreiras à Fagoterapia

Henein (2013) explica que enquanto a pressão pública e processos judiciais pressionam as entidades reguladoras e governos a criar esquemas de licenciamento mais rápidos de fármacos no tratamento de VIH, esclerose múltipla e cancro, o mesmo não se aplica à fagoterapia, em grande parte devido à falta de evidência da segurança e eficácia em humanos na forma de ensaios clínicos duplamente cegos randomizados. Para além das taxas de mortalidade devido a infeções por MRSA e *Clostridium difficile*, não existem dados estatísticos disponíveis das taxas de mortalidade de infeções bacterianas, nomeadamente no Reino Unido, e há falta destes dados relativos a estirpes resistentes a antibióticos.

Outra questão importante é a rentabilidade do desenvolvimento e produção destes fármacos. Para as grandes farmacêuticas, o abandono da investigação de agentes anti-infecciosos (com exceção de agentes anti-HIV) está iminente pela falta de lucro desta área comparativamente a fármacos bem estabelecidos no tratamento de doenças crónicas, prevalentes em populações envelhecidas (Alanis, 2005; Taylor, 2005). Limitações impostas no uso de antimicrobianos recentes de largo espectro, para prevenir resistências (p.e. protocolos de prescrição), reduzem as suas vendas.

Empresas mais pequenas que têm surgido nesta área, deparam-se com a perspetiva de financiarem ensaios clínicos controlados de elevados custos (Brüssow, 2012). A obtenção de investidores é limitada pelas possíveis dificuldades em questões de propriedade intelectual. Atualmente é possível patentear fagos inalterados isolados do ambiente, contudo, a proteção é limitada (Pirnay et al, 2012). Ou seja, uma entidade concorrente pode facilmente isolar o mesmo fago do ambiente. Consequentemente, algumas empresas estão a explorar patentear sequências específicas de fagos ou alternativas como fagos geneticamente

alterados como vetores de genes ou moléculas letais; produtos de fagos (lisinas) ou fagos deficientes no sistema lítico (Henein, 2013).

Existe discussão acerca de como devem ser regulados os produtos de fagos: se devem ser considerados "produtos médicos biológicos" ou "produtos médico-terapêuticos avançados". A primeira hipótese requer ensaios clínicos para cada estirpe de fagos aquando de atualizações de cocktails; a segunda hipótese assume que não é possível executar ensaios clínicos convencionais e consequentemente a atualização de cocktails fágicos é mais fácil e barata (Sulakvelidze, 2011). Sulakvelidze sugere que fagos terapêuticos podem ser geridos similarmente a vacinas da *influenza* de forma a permitir atualizações das estirpes de fagos em resposta à evolução das bactérias resistentes a antibióticos dominantes.

Os produtos de fagos rentáveis não são necessariamente aqueles para terapia humana mas possivelmente os para uso veterinário (menores custos em colocar no mercado) ou produtos de descontaminação. Ou seja, parcerias entre setores públicos e privados poderão ser necessárias para a integração de fagoterapia no combate à crise de resistências bacterianas (Henein, 2013).

Fagoterapia em Portugal

Portugal não é exceção quanto à escassa investigação e divulgação da fagoterapia. No entanto existem duas empresas: A *Innophage* e a *Technophage*, da Universidade Católica do Porto e do Instituto de Medicina Molecular, respetivamente. Ambas pretendem desenvolver produtos que utilizam fagos no tratamento de infeções bacterianas. A *Technophage* tem 4 produtos desta área em desenvolvimento, contudo não há informação disponível sobre os estudos destas empresas.

Conclusão

A fagoterapia não é um conceito novo, pelo contrário esta terapia tem já uma longa história. A sua investigação e prática foram negligenciadas no mundo ocidental durante muito tempo. No entanto, fica aqui demonstrado que existem vários ensaios animais e alguns ensaios *gold standard* humanos que evidenciam a sua segurança e, até um certo ponto, eficácia, para além de um vasto reportório de literatura menos rigorosa oriunda do antigo Bloco de Leste.

A compreensão da atividade biológica dos fagos e das diferenças farmacocinéticas destes comparativamente aos antibióticos, salvaguardará o risco de a sua natureza e potencial serem mal entendidos e de a fagoterapia falhar novamente no ocidente. Henein (2013) explica que este problema pode ser evitado por uma gestão de fagos semelhante à dos antibióticos restritos: dispensando-os a doentes individuais apenas no contexto de recomendação especialista e após testes de suscetibilidade e adequação.

Por outro lado, o possível desinteresse das farmacêuticas multinacionais em investir nesta tecnologia poderá condicionar e atrasar a sua emergência nas práticas terapêuticas correntes o que justificará a colaboração internacional entre entidades académicas, organizações governamentais e empresas privadas com este objetivo.

Finalmente, perante os estudos existentes e a sua escassez, pode-se considerar que é eticamente inaceitável não investir na fagoterapia, na busca de alternativas mediante a presente e crescente crise dos antibióticos.

Referências

- Abedon e Abedon (2010) Phage Therapy Pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol* 11:28-47
- Abedon et al. (2011) Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1(2):66-85
- Adam MH (1959) *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York, N.Y.
- Alanis (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36(6):697-705.
- Babalova et al. (1968) Preventative value of dried dysentery bacteriophage. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2:143-5.
- Borysowski e Górski (2008) Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *Int J Infect Dis* 12(5):466-71
- Boyd e Brüssow (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* 10(11):521–529.
- Brüssow (2012) What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* 434(2):138-42
- Bruttin e Brüssow (2005) Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7):2874-8.
- Burrowes et al. (2011) Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9(9):775-85
- Capparelli et al. (2005) Selection of an *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infect* 12:248–253.
- Capparelli et al. (2007) Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51(8):2765-73
- Carlton (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* 43(3):301-12
- Cervený et al. (2002) Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in

iron - dextran -treated mice. *Infect Immun* 70(11):6251–6262.

Chanishvili (2012) Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res* 83:3-40

Chanishvili e Sharp (2009) A Literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research. Tbilisi, Georgia: Eliava Institute.

Chen e Novick (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* 323(5910):139-4.

Chhibber et al. (2013) Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections. *PLoS One* 8(2):e56022

Cislo et al.(1987) Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Arch Immunol Ther Exp* 35(2):175-83.

Curtin e Donlan (2006) Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1268-75.

d'Hérelle (1917) F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci Ser D* 165:373-375

Desranleau (1949) Progress in the treatment of typhoid fever with Vi bacteriophages. *Can J Public Health* 40(11):473-8.

Dixon (2004) New dawn for phage therapy. *Lancet Infect Dis* 4:186.

Duckworth (2002) Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs* 16(1):57-62.

Eaton e Bayne-Jones (1934) Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *J Am Med Assoc* 103:1769-1776.

EBI Food Safety (2009) Regulatory Position Listex™ P100. Wageningen, the Netherlands.

Elizabeth Kutter et al. (2013) Phage Therapy: Bacteriophages as Natural, Self-limiting Antibiotics. In *Textbook of Natural Medicine* (Joseph E Pizzorno & Michael T Murry, ed), pp 945-956. Elsevier Churchill Livingstone

Food & Drug Administration (2006) Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. *Fed Regist* 71:47729–47732.

Friman et al. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* Adaptation to Lungs of Cystic Fibrosis Patients Leads to Lowered Resistance to Phage and Protist Enemies. *PLoS One* 8(9):e75380.

Gill e Hyman (2010) Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 11(1):2-14.

Górski et al. (2006) Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46(3):313-9.

Górski et al. (2009) Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig D* 10:766–774

Górski et al. (2009) Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig Drugs* 10(8):766-774.

Henein (2013) What are the limitations on the wider therapeutic use of phage? *Bacteriophage* 3(2):e24872.

Henry e Debarbieux (2012) Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology* 434(2):151-61

Housby e Mann (2009) Phage Therapy. *Drug Discov Today* 14n°11/12:536-540

Hyman e Abedon (2010) Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 70:217-48.

Hyman e Abedon (2010) Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 70:217–248.

Jikia et al. (2005) The use of a novel biodegradable preparation capable of the

sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol* 30(1):23-26.

Klem et al. (2013) Bacteriophage therapy against staphylococci. *Acta Microbiol Immunol Hung* 60(4):411-22.

Krestovnikova (1947) Phage treatment and phage prophylactics and their approval in the works of the Soviet researchers. *J Microb Epidemiol Immun* 3:56-65.

Kutateladze & Adamia (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect* 38(8):426-30

Kutter et al. (2010) Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology* 11(1):69-86

Kvachadze et al. (2011) Evaluation lytic activity of staphylococcal bacteriophage against freshly isolated clinical pathogens. *Microb Biotechnol* 4(5):643-50.

Lang et al. (1979) [Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery]. *Rev Chir Orthop Repar Appar Mot* 65(1):33-7.

Larkum (1929) Bacteriophage treatment of *Staphylococcus* infections. *J Infect Dis* 45:34-41

Lepper et al. (2002) Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intens Care Med* 28:824–833.

Letkiewicz et al. (2010) Pathogen eradication by phage therapy in patients with chronic bacterial prostatitis (poster no. 374). 25th Anniversary EAU Congress in Barcelona

Levin e Bull (2004) Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol* 2:166–173.

Loc-Carrillo e Abedon (2011) Pros and cons of phage therapy *Bacteriophage*. *Bacteriophage* 1(2):111-114.

Lurie (1938) Treatment of dysentery and haemolytic intestinal diseases among children and adults. *Selected Articles of Azerbaijani Institute of Epidemiology and Microbiology* 6:31-34.

MacNeal et al. (1942) Staphylococcemia 1931–1940. Five Hundred Patients. *Am J Clin Pathol* 12:281-94.

Mann (2008) The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res Microbiol* 159(5):400-5

Markoishvili et al. (2002) A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol* 41(7):453-458.

Merabishvili et al. (2009) Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* 4(3):e4944.

Merabishvili et al. (2012) Selection and characterization of a candidate therapeutic bacteriophage that lyses the *Escherichia coli* O104:H4 strain from the 2011 outbreak in Germany. *PLoS One* 7(12):e52709.

Merril (1975) Phage in human vaccines. *Science* 188:8

Mikeladze et al. (1936) Sur le traitement de la fièvre typhoïde et des colites aiguës par le bacteriophage de d'Herelle. *La Médecine* 17:33-8.

O'Flaherty et al. (2005) Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environ Microbiol* 71(4):1836-42.

Ochs et al. (1971) Immunologic responses to bacteriophage ϕ X 174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* 50(12):2559–2568.

Parisien et al. (2008) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13

- Paynee Jansen (2003) Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin Pharmacokinet* 42(4):315-325.
- Perepanova et al. (1995) [The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic diseases]. *UrolNephrol* (5):14–17
- Pirnay et al. (2003) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol* 41(3):1192-202
- Pirnay et al. (2012) Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virology* 7:379-90.
- Potera (2013) Phage Renaissance: New Hope Against Antibiotic Resistance. *Environ Health Perspect* 121nº2:49A-50ª.
- Ramesh et al. (1999) Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocectitis with bacteriophage. *Anaerobe* 5:69–78
- Rhoads et al. (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *18(6):237-8, 240-3*
- Salmon e Symonds (1963) Staphage lysate therapy in chronic staphylococcal infections. *J Med Soc N J* 60:188–193
- Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, NY.
- Sarker et al.(2012) Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* 434(2):222–232.
- Sauvé (1936) Le bactériophage in chirurgie. *La Médecine* 17:49-54.
- Selezska et al. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environ Microbiol* 14(8):1952-67
- Slopek et al. (1985) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. IV. Evaluation of the results obtained in 370 cases. *Arch Immunol Ther Exp* 33(2):219-40.
- Slopek et al. (1987) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the year 1981-1986. *Arch Immunol Ther Exp* 35(5):569-83.
- Stratton (2003) Dead bugs don't mutate: susceptibility issues in the emergence of bacterial resistance. *Emerg Infect Dis* 9(1):10-6
- Sulakvelidze (2011) The Challenges of Bacteriophage Therapy. *European Industrial Pharmacy* 10:14-8
- Sulakvelidze e Kutter (2005) Bacteriophage therapy in humans. In *Bacteriophages: Biology and Applications* (ed Kutter e Sulakvelidze), pp377-428. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Summers (1999) Felix d'Herelle and the Origins of Molecular. *Med Hist* 45(2):294–295
- Summers (2001) bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 55:437-51
- Taylor et al. (2002) New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today* 7(21):1086-91
- Tsulukidze (1936) Sur l'application du bacteriophage dans la peritonite par perforation au cours de la fièvre typhoïde. *La Médecine* 17:41-2.
- Tsulukidze (1936) Sur l'application du bacteriophage dans la peritonite par perforation au cours de la fièvre typhoïde. *La Médecine* 17:41-2.
- Twort (1915) An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 186:1241-3
- Verbeken (2012) Optimizing the European regulatory framework for sustainable bacteriophage therapy in human medicine. *Arch Immunol Ther Exp* 60(3):161-72.
- VinodKumar et al. (2011) Abrogation of *Staphylococcus aureus* Wound Infection by Bacteriophage in Diabetic Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 3(3):202-207

Weber-Dabrowska et al. (2001) Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. *Clin Appl Immunol* 1:131-4.

Weber-Dabrowska et al. (2003) Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia *Transplant. Transplant Proc* 35(4):1385-6.

Weitz et al. (2013) Phage-bacteria infection networks. *Trends in Microbiology* 21(2):82-91

Westwater et al. (2003) Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4):1301-7.

Wiggins e Alexander (1985) Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 49(1):19–23

Wright et al. (2009) 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* 34(4):349-57

Yilmaz et al. (2013) Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 95:117–25.

Zilisteanu et al. (1971) [Treatment of urinary infections with bacteriophage-autovaccine-antibiotics] *Arch Roum Pathol Exp M crobiol* 30(2):195-207.

Agradecimentos

Agradeço à Dr^a Ana Paula Fontes Rocha e Castro por todo o apoio e encorajamento que me deu na orientação deste trabalho. Quero também agradecer à Joana, aos meus pais e à minha irmã.

Anexo 1 – Ensaio Clínicos

Ano	Autores	País	Organismos alvo	Doença	Número de casos	Detalhes	Modo de aplicação
Infeções Cutâneas e MRSA							
1929	Larkum	EUA	<i>Staphylococcus aureus</i>	furunculose crónica	208	78% dos caso tratados eficazmente sem recorrências durante pelo menos 6 meses. 3% sem melhoria	Injeção em cada pústula individual e revestimento por compressa embebida em fármaco. Repetido em lesões novas e/ou não evidenciadas anteriormente.
1947	Krestovnikova	Durante campanha finlandesa	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> e anerobios	gangrena gasosa em soldados	767	Taxa de mortalidade de 19% em soldados infetados, comparativamente a 42% do grupo de controlo, tratado por outros métodos.	Fagos produzidos pelo <i>Eliava Institute</i>
1957	Vartepetov	Geórgia	<i>Staphylococcus aureus</i>	Furunculose e idradenite	6000	70-100% curados dentro de 4-8 dias. Injeções intradérmicas revelaram-se mais eficazes que subcutâneas.	Dose escaladas (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5ml perfazendo um total de 7-8 injeções) com administração dia sim, dia não.
2005	Jikia	Geórgia	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vários antibióticos incluindo ciproflxacina	Graves lesões locais pós-radiação (estôncio-90)	2	Várias tentativas de antibioterapia durante o primeiro mês de lesão. Secreções purulentas cessaram nos primeiros 2-7 dias de fagoterapia com eliminação completa do agente etiológico ao 7 dia (culturas estéreis).	<i>PhageBioDerm</i> aplicado em ambos os casos
Úlceras venosas							
1987	Cislo	Polónia	<i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigela</i> e/ou <i>Pseudomonas</i>	Úlceras venosas	31	Melhoria muito marcada, marcada e transitória em 16, 7 e 2 casos respetivamente. 2 a 16 semanas de tratamento. Co-medicados com vaso dilatador periférico. Náuseas em 10% dos casos após toma oral e intensificação da dor em 2 casos. Evolução microbiológica seguida com ajuste de fagos usados.	Administração local e <i>per os</i> .
2002	Markoishvili K	Geórgia	Flora multi-resistente	Úlceras venosas	107	Casos refratários a antibioterapia habitual prévia. Cicatrização total em 70% dos casos.	<i>PhageBioDerm</i> aplicado em todos os casos

Anexo 1 – Ensaio Clínicos

Infeções Gastrointestinais							
1936	Mikeladze	Geórgia	<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide	21 (64)	Redução na mortalidade de 15.6% para 4.8% e complicações de 56.2% para 13% comparativamente ao grupo de controlo tratado com terapêutica habitual. Taxa de recorrência duplicou em casos em que fagoterapia foi adiada para 10 ^o -15 dia.	3 a 5 dias seguidos, <i>per os</i> . IV durante 3 dias em doentes com hemocultura positiva e com sistema cardiovascular saudável.
1936	Tsouloukidze	Geórgia	<i>Salmonella typhi</i> + comensais intestinais	Febre tifóide complicada por perfuração intestinal	20	<i>Bacté-Pyo-Phage</i> e <i>Bacté-Intesti-Phage</i> resultou na redução de mortalidade de 85% para 35%.	Após laparotomia e reparação da perfuração, 8-20ml do cocktail foi introduzido na cavidade peritoneal. A cavidade foi suturada sem dreno nem revestimento
1938	Lurie	Geórgia	Grupo 1: <i>Shigella flexneri</i> e <i>Shigella shiga</i> Grupo 2: etiologia desconhecida	Grupo 1: disenteria Grupo 2: hemocolite e colite	219: 138 crianças e 81 adultos	Antibioterapia prévia sem sucesso em alguns doentes. Todos os tratamentos suspensos antes de início de fagoterapia em todos os casos. Houve melhoria clínica ou cura em 74% dos casos com fagoterapia. 26% não mostraram melhoria.	<i>Intestiphage</i> administrado <i>per os</i> uma vez por dia. 10ml em adultos e 2,5-5,0ml em crianças antes de refeições e após neutralização gástrica. Administração alternativa via rectal (50-100ml) em crianças novas (neutralização prévia por enema).
1949	Desranleau	Quebec	<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide	56	Mortalidade reduzida para 1.8%	3 ou 4 injeções dois em dois dias.
1968	Babalova	Geórgia	<i>Shigella sonnei</i> , <i>S. boydi</i> , <i>S. flexneri</i> , e <i>S. newcastle</i>	Profilaxia de disenteria	30769 (metade destes)	O ensaio foi executado em bairros em que as crianças de um lado da rua receberam o preparado de fagos enquanto as restantes crianças receberam placebo. 3,8 vezes menor incidência em casos tratados profilaticamente com fagos, comparativamente aos grupo placebo.	<i>per os</i> em forma de comprimido (fagos e placebo)
Infeções Oftálmicas							
2001	Karanadze e Kilasonia	Geórgia	Resistentes a antibioterapia	Conjuntivite bacteriana aguda em crianças	32	Para além de os agentes etiológicos serem resistentes, os doentes eram alérgicos a antibioterapia. Ao 3 ^o dia todos os casos melhoraram e ao 7 ^o todos estavam curados. Não houve recaídas durante os meses seguintes.	Aplicações sucessivas de gotas oftálmicas

Anexo 1 – Ensaio Clínicos

	Dautova	Geórgia	Sem resistências evidenciadas	Queratite traumática bacteriana e úlceras purulentas da córnea	30 (30)	Casos tratados com <i>Pyophage</i> exibiram recuperação clínica em média de 11 dias comparativamente a 15 dias no grupo tratados com gentamicina. Não houve antibioterapia prévia em nenhum dos grupos nem registo de resistências.	Aplicações sucessivas de gotas oftálmicas
Infeções do trato urinário							
1971	Zilisteanu	Roménia	Agentes multirresistentes numa grande parte dos casos	ITU aguda	87	Grande melhoria clínica e laboratorial com referência a descida em temperatura corporal e redução da leucocitúria em grupo com agente multirresistente que fez só fagoterapia. Efeito sinérgico observado em grupo de terapia combinada.	
1994	Boratynska	Polónia	<i>E.coli</i> , 9; <i>P.aeruginosa</i> , 2; <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 2; <i>Proteus vulgaris</i> , 2; <i>Enterobacter aerogenes</i> , 2 e <i>S.aureus</i> , 2	ITUs com algumas exacerbações por ano no contexto de pielocistite, nefrolitíase, refluxo vesicouretral crónico ou rim flutuante e ITU pós transplante renal	15	A média de tratamento foi de 5,4 meses e houve cura em 5 casos, em 3 dos quais a remissão deu-se após 3-6 meses. Apenas o doente transplantado fez terapia combinada com antibiótico durante estudo.	10ml <i>per os</i> de preparado de um fago específico, 3-4 vezes por dia após neutralização de pH gástrico.
1995	Perepanova	Rússia	<i>Staphylococcus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Proteus</i>	ITU aguda e crónica	46	Melhoria clínica em 92% dos casos com comprovação bacteriológica em 84% dos 46 casos.	Administração local com aplicação direta na bexiga e <i>per os</i>
2010	Letkiewicz	Polónia	<i>Enterococcus faecalis</i> , 16; <i>E.coli</i> , 5; <i>K.pneumoniae</i> , 2; <i>P.aeruginosa</i> , 1; e <i>Staphylococcus haemoliticus</i> , 1. (4 doentes com etiologia mista)	Prostatite bacteriana crónica	22	O tratamento durou em média 47 dias com erradicação patogénica em metade dos casos. Houve uma redução no volume da próstata (de 38,3+/-2.5 para 20,7+/-1.4ml) e um aumento no volume máximo de fluxo urinário.	Receberam fagos específicos <i>per os</i> (5), via retal (20) e/ou topicamente na glândula do pénis (2)
Diversas infeções							
1963	Salmon e Symonds	EUA	<i>Staphylococcus</i>	Diversas infeções crónicas	607	Houve resolução da infeção em 80% dos casos, melhoria em 18% e não se observou alterações em 2%.	Via intranasal por aerossol, tópica, subcutânea, intravenosa e <i>per os</i> .
1987	Slopek	Polónia	<i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Shigela</i> , <i>Pseudomonas</i> e/ou <i>Salmonella</i>	Diversas infeções purulentas crónicas	550	Maioria dos casos foram refratários a antibioterapia prévia. Resultados positivos em 92% dos casos. Melhores resultados em grupo de doentes com menos de 60 anos.	<i>Per os</i> após neutralização de acidez gástrica. Aplicação tópica em alguns casos.

Anexo 1 – Ensaio Clínicos

2001	Weber-Dabrowska	Polónia	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Doentes oncológicos com infeções pós-operativa, cutânea, pulmonar, pós-radioterapêutica, meningea, de decúbito e sépsis bacteriana aguda.	20	Antibióterapia prévia sem sucesso em todos os casos. Regressão completa dos quadros infecciosos, em 3 dos quais houve marcada melhoria do estado geral para além da resolução da infeção em questão. 2 a 9 semanas de tratamento.	Per os 3 vez por dia e aplicação local em 8 dos casos.
Infeções respiratórias							
1987–1999	Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy	Polónia	<i>S.aureus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , ou <i>E.coliphages</i>	Bronquite crónica mucopurulenta, laringite, rinite, broncopneumonia ou pleurite	377	313 (83%) dos casos recuperaram com irradicação completa do agente, e 51 (13.5%) dos casos experimentaram uma melhoria significativa ainda com deteção de algumas bactérias alvo.	Cocktail de fagos em solução de nebulização
Sepsis bacteriana							
1936	Sauvé	França	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sépsis bacteriana aguda	9	Melhoria evidente em horas com resolução da infeção nos 9 casos.	Infusão lenta (40-50 minutos) de preparado de fagos diluído em 200 ml de soro. 2a e 3a toma com dois dias de intervalo.
1942	MacNeal	EUA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sépsis bacteriana aguda	500	Casos tratados com um cocktail de fagos líticos <i>in vitro</i> com resultados muito positivos.	
1979	Lang	França	Resistentes a antibióterapia	Complicação séptica crónica pós cirurgia ortopédica	7	5, 1 e 1 casos tratados com êxito, êxito parcial e sem êxito, respetivamente.	Diferente abordagem descrita para cada caso com um fago selecionado para cada doente.
2003	Weber-Dabrowska	Geórgia	33 doentes com infeção por agente único (<i>Staphylococcus aureus</i> , 15; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 8; <i>Escherichia coli</i> , 7; <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 3) e 61 doentes com flora bacteriana mista (envolvendo patogénios da lista anterior, bem como <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i> , e <i>Enterobacter</i>)	Sépsis bacteriana aguda	94	Antibióterapia foi instituída previamente e continuada em 71 dos casos, enquanto que em 23 casos foi suspensa. Houve recuperação total em 80 casos e nos restantes 14 não houve eficácia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupo só com fagoterapia e um grupo selecionado aleatoriamente de terapia combinada.	Fagos específicos para cada caso utilizados, administrados <i>per os</i> 3 vezes por dia (10ml e 5ml em crianças) 30 minutos antes das refeições, após neutralização da mucosa gástrica.