

**Flávio Miguel do Carmo Pinto**

**ALTERNATIVAS AOS ANTIBIÓTICOS QUÍMICOS  
CONVENCIONAIS: ESTADO-DA-ARTE**



**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

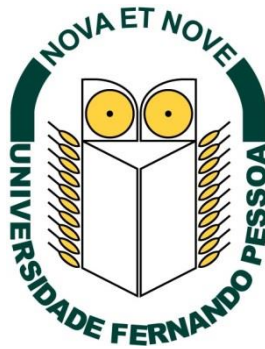
Porto

2013



**Flávio Miguel do Carmo Pinto**

**ALTERNATIVAS AOS ANTIBIÓTICOS QUÍMICOS  
CONVENCIONAIS: ESTADO-DA-ARTE**



**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

Porto

2013

**Autor:** Flávio Miguel do Carmo Pinto

**Orientadora:** Professora Doutora Carla Moutinho

**Co-orientador:** Professor Doutor Victor Balcão

## **Alternativas aos antibióticos químicos convencionais: Estado-da-arte.**

**O aluno**

---

*(Flávio Miguel do Carmo Pinto)*

Trabalho de conclusão de ciclo apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

## **Resumo**

Com a fácil transferência das bactérias quer nos cuidados hospitalares, quer a nível comunitário, com o aumento do número de pessoas a necessitar de cuidados de saúde provocado pelo envelhecimento populacional, com o aumento do número de infeções associadas aos cuidados de saúde, com as viagens internacionais ao dispor de qualquer cidadão, com o uso irracional e exagerado dos antibióticos por parte da população e em explorações animais, a resistência aos antibióticos atingiu um nível tão elevado que coloca em risco a saúde pública mundial. Presentemente torna-se indispensável a adoção de estratégias alternativas que promovam a eliminação destas estirpes resistentes do meio ambiente. Nesta dissertação serão abordadas e analisadas diversas estratégias terapêuticas alternativas aos antibióticos.

A terapia fágica é uma delas, e esta recorre à utilização de bacteriófagos estritamente líticos, como alternativa, ou complemento, no tratamento de infeções bacterianas, tendo-se revelado um método seguro pelo facto destas entidades biológicas não possuírem qualquer afinidade para as células eucarióticas. Já a terapia com lisinas estabelece-se como outra opção terapêutica inovadora, sendo que a administração tópica de preparações contendo lisinas recombinantes purificadas, numa concentração na ordem dos nanogramas, em bactérias Gram-positivo, demonstraram elevada capacidade terapêutica, provocando rapidamente a lise da bactéria alvo. Adicionalmente, esta terapia evidencia sinergismo quando combinado com determinados antibióticos já disponíveis no mercado. Outra alternativa terapêutica baseia-se na utilização dos tubos peptídicos formadores de poros. Estes são polipéptidos anfifílicos que provocam disrupção da membrana celular, podendo ser utilizados no combate de infeções bacterianas, fúngicas e víricas, na prevenção de biofilmes e como antitumorais. Curiosamente, as bacteriocinas estabelecem-se como uma estratégia de defesa comum das bactérias contra outros agentes bacterianos, eliminando potenciais oponentes e aumentando o número de nutrientes disponíveis no meio ambiente para o seu próprio crescimento, podendo ser aplicadas na indústria alimentar, como probióticos, e no combate bactérias multirresistentes. A utilização de anticorpos antibacterianos promete ser segura e extremamente eficaz. Já a vacinação estabelece-se como uma das estratégias mais promissoras a nível preventivo.

**Palavras-chave:** Antibioterapia; Resistências; Alternativas aos antibióticos convencionais; Bacteriófagos; Terapia fágica; Terapia com lisinas; Tubos peptídicos formadores de poros; Bacteriocinas; Anticorpos; Vacinas.

## **Abstract**

With the easy transfer of bacteria on hospital care and at community level, with the increasing number of people needing health care caused by the aging of population, with the increasing number of infections associated with health care, with international travel available to any citizen, with exaggerated and irrational use of antibiotics by the population and in farm animals, antibiotic resistance has reached such a high level that endangers world public health. Presently it's essential the adoption of alternative strategies that promote the elimination of these resistant strains from the environment. In this dissertation it will be discussed and analysed several alternative strategies to antibiotics.

Phage therapy makes use of lytic bacteriophages as an alternative, or a complement, in the treatment of bacterial infections. It is a safe method because these biological entities don't possess any affinity to eukaryotic cells. Lysins therapy is recognized as novel therapeutic option, because the topical administration of preparations containing purified recombinant lysins at a concentration in the order of nanograms, in Gram-positive bacteria demonstrated a high potential therapeutic causing immediate lysis of the target bacteria. Additionally, this therapy shows synergism when combined with certain antibiotics already available on the market. Another alternative therapy is based on the use of antimicrobial peptides. These are amphiphilic polypeptides that causes disruption of the bacterial membrane and can be used in treatment of bacterial, fungic and viral infections, in prevention of biofilms formation and as antitumor agents.

Interestingly, bacteriocins are a common strategy defence of bacteria against other bacterial agents that eliminates potential opponents and increases the number of available nutrients in the environment for their own growth and can be applied in the food industry, as food preservative, as probiotics and in fighting of multi-resistant bacterial strains.

The use of antibacterial antibodies promises to be extremely safe and effective. The vaccination is the most promising preventive strategy.

**Keywords:** Antibiotics; Resistance; Alternatives to conventional antibiotics; Bacteriophages; Phage therapy; Lysins therapy; Antimicrobial peptides; Bacteriocins; Antibodies; Vaccines.

## **Agradecimentos**

Após a conclusão do trabalho de conclusão de curso, não posso deixar de agradecer a todos os que me orientaram da melhor maneira possível.

Quero agradecer de forma especial à professora Dr.<sup>a</sup> Carla Moutinho e ao professor Dr. Vítor Balcão, pela sua paciência, disponibilidade e simpatia, assim como pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Agradeço também à minha família e à Isabela Vieira, pelo apoio em todos os momentos durante o meu percurso académico e em especial aos meus pais por terem tornado este sonho realidade.

<b><u>Índice Geral</u></b>	<b>Pág.</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xiii</b>
<b><u>I. Introdução</u></b>	<b>1</b>
<b><u>II. Capítulo 1: Terapia Fágica</u></b>	
<b>1.1. Os Bacteriófagos e a terapia fágica</b>	<b>5</b>
<b>1.2. História da terapia fágica</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Taxonomia dos fagos</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Processo de infecção fágica: via lítica vs via lisogénica</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Terapia fágica e seus pré-requisitos</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Vantagens e desvantagens da terapia fágica face à antibioterapia</b>	<b>10</b>
<b>1.7. Resistência bacteriana aos bacteriófagos e cinética dos bacteriófagos</b>	<b>11</b>
<b>1.8. Aplicações da terapia fágica</b>	<b>12</b>
<b><u>III. Capítulo 2: Terapia com lisinas</u></b>	
<b>2.1. As lisinas</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Classificação das lisinas e mecanismo de ação</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Estrutura das lisinas</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Vantagens, desvantagens e limitações da terapia com lisinas</b>	<b>21</b>
<b>2.5. Resistência bacteriana às lisinas</b>	<b>23</b>
<b>2.6. Aplicações da terapia com lisinas</b>	<b>23</b>
<b>2.6.1. As lisinas na medicina e na biotecnologia</b>	<b>23</b>
<b>2.6.2. Sinergismo das lisinas com os antibióticos</b>	<b>25</b>
<b>2.6.3. Outras aplicações da terapia com lisinas</b>	<b>26</b>

<b>IV. <u>Capítulo 3: Terapia com tubos peptídicos formadores de poros</u></b>	
3.1. Tubos peptídicos formadores de poros (PAMs)	27
3.2. Estruturas, propriedades e os vários mecanismos de ação dos PAMs	28
3.3. Vantagens e desvantagens	31
3.4. Resistências	32
3.5. Aplicações	33
3.5.1. Sinergismo dos PAMs com os antibióticos	38
<b>V. <u>Capítulo 4: Terapia com bacteriocinas</u></b>	
4.1. Bacteriocinas	39
4.2. Classificação das bacteriocinas	40
4.3. Estrutura e mecanismo de ação das bacteriocinas	41
4.4. Resistências bacterianas às bacteriocinas e toxicidade	44
4.5. Aplicação das bacteriocinas	45
4.5.1. Aplicação das bacteriocinas como bioconservantes	45
4.5.2. Aplicações das bacteriocinas como agentes terapêuticos	46
4.5.3. Aplicação das bacteriocinas produzidas por probióticos	49
<b>VI. <u>Capítulo 5: Outras alternativas</u></b>	
5.1. Estratégias antivirulentas	51
5.2. Anticorpos antibacterianos	52
5.2.1. Radioimunoterapia	53
5.3. Vacinas	53
<b>VII. <u>Conclusão e perspectivas futuras</u></b>	55
<b>VIII. <u>Bibliografia</u></b>	57
<b>Anexos</b>	73

<b><u>Lista de Figuras</u></b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático do ciclo de infecção de um bacteriófago	<b>74</b>
<b>Figura 2.</b> Bacteriófago T4 na superfície da <i>Escherichia coli</i>	<b>74</b>
<b>Figura 3.</b> Decréscimo da população bacteriana em UFC ao longo do processo de infecção por múltiplos bacteriófagos	<b>75</b>
<b>Figura 4.</b> Bacteriófago PAK-P1 utilizado no tratamento e prevenção de infecções pulmonares provocadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>75</b>
<b>Figura 5.</b> Diferentes tipos de lisinas fágicas, mecanismo de ação e local onde atuam no peptidoglicano da célula hospedeira	<b>76</b>
<b>Figura 6.</b> Disrupção da membrana do <i>Bacillus cereus</i> por administração da lisina PlyPH	<b>76</b>
<b>Figura 7.</b> Estrutura básica das lisinas	<b>77</b>
<b>Figura 8.</b> Processo de disrupção da parede celular de <i>Staphylococcus aureus</i> estabelecido após a administração de 250 µg de ClyS	<b>77</b>
<b>Figura 9.</b> Gráfico que evidencia um efeito sinérgico entre a lisina ClyS e a Oxacilina	<b>78</b>
<b>Figura 10.</b> Estrutura da lisina PlyC	<b>78</b>
<b>Figura 11.</b> Motor de pesquisa de lisinas da “Enzibase”	<b>79</b>
<b>Figura 12.</b> Estrutura geral dos péptidos antimicrobianos	<b>80</b>
<b>Figura 13.</b> Os diversos mecanismos de ação dos PAMs	<b>82</b>
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por alterações na carga de superfície	<b>83</b>

<b>Figura 15.</b> Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por neutralização ou ligação ao PAM	<b>83</b>
<b>Figura 16.</b> Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por bombas de efluxo ou desnaturação proteica provocada por proteases	<b>84</b>
<b>Figura 17.</b> Evolução da infecção cutânea provocada por <i>Staphylococcus aureus</i> de ratos que receberam placebo e sem e com tratamento com Kn2-7	<b>84</b>
<b>Figura 18.</b> Efeito da cecropina B nas membranas celulares de células tumorais	<b>86</b>
<b>Figura 19.</b> Análise do Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a exposição ao LL-37	<b>87</b>
<b>Figura 20.</b> Exemplos de estruturas de diversas bacteriocinas das classes I e II	<b>89</b>
<b>Figura 21.</b> Exemplos de mecanismos de ação da nisina A, lacticina 3147 e lactococina A, pertencentes às classes I e II das bacteriocinas	<b>89</b>
<b>Figura 22.</b> Efeito bactericida da laterosporulina na <i>Escherichia coli</i>	<b>90</b>
<b>Figura 23.</b> Organelo bacteriano com a estrutura em agulha que permite a libertação das toxinas diretamente para o interior das células eucarióticas	<b>92</b>

<b><u>Lista de Tabelas</u></b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Classificação dos bacteriófagos	<b>73</b>
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de vários PAMs, tendo em conta a sua estrutura, origem e mecanismo de ação	<b>80</b>
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos PAMs segundo a sua estrutura terciária e o número de ligações dissulfeto	<b>81</b>
<b>Tabela 4.</b> Exemplos de concentrações mínimas inibitórias de Kn2-7 e BmKn2, em µg/mL, contra diversos tipos de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo	<b>85</b>
<b>Tabela 5.</b> Exemplos e aplicações de vários tipos de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativo e Gram-positivo	<b>88</b>
<b>Tabela 6.</b> Classificação e características das LAB bacteriocinas	<b>88</b>
<b>Tabela 7.</b> Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias isoladas do ambiente marinho	<b>90</b>
<b>Tabela 8.</b> Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias probióticas e sua aplicação	<b>91</b>
<b>Tabela 9.</b> Exemplos de anticorpos que se encontram em ensaios clínicos	<b>92</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**anti-LTA:** Anticorpos antiácidos lipoteicóicos.

**ATP:** Adenosina trifosfato.

**BAL:** Bactérias ácido-láticas.

**CE<sub>50</sub>:** Concentração máxima eficaz em 50%.

**CI<sub>50</sub>:** Concentração inibitória em 50%.

**DLPC:** Domínio de ligação à parede celular.

**DNA:** Deoxyribonucleic acid.

**ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control.

**EMA:** European Medicines Agency.

**ERV:** Enterococos resistentes à vancomicina.

**Fc:** Fragmento cristalizável.

**FDA:** Food and Drugs Administration.

**GRAS:** Generally recognized as safe.

**HCV:** Vírus da hepatite C.

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana.

**HPLC:** Cromatografia líquida de alta pressão.

**IACS:** Infecções associadas aos cuidados de saúde.

**INFARMED:** Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

**IFN- $\gamma$ :** Interferão-gama.

**LPS:** Lipopolissacarídeos.

**Man-PTS:** Manose fosfotransferase.

**mRNA:** Messenger ribonucleic acid.

**MRSA:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

**MTAN:** 5'-metiltioadenosina nucleosidase.

**NAG:** Ácido *N*-acetilmurâmico.

**NAMA:** *N*-acetilglicosamina.

**NDM-1:** New Delhi Metallo-beta-lactamase-1.

**PAM:** Péptido antimicrobiano.

**PBP:** Penicillin-binding proteins.

**PCR:** Polymerase chain reaction.

**RIT:** Radioimunoterapia.

**RNA:** Ribonucleic acid.

**SigB:** Sigma B.

**T3SS:** Sistema de secreção tipo III.

**UFC:** Unidades formadoras de colônias.

**UFP:** Unidades formadoras de placas.

**UNMC:** University of Nebraska Medical Center.

**VI:** Via Intravenosa.

**WAAR:** World Alliance against Antibiotics Resistance.

**WHO:** World Health Organization.

## I. Introdução

O termo antibiótico foi referido em 1942 pelo microbiologista Selman Waksman, o qual defendia que o antibiótico era uma “substância” produzida por microrganismos, tais como bactérias e fungos, que possui atividade antagônica ao desenvolvimento, ou à vida, de outros agentes antimicrobianos, em altas diluições e no meio bioquímico do organismo humano (Mckenna, 2001). Após Ehrlich ter dado início à era dos antibióticos através da descoberta da “magic bullet” (uma substância com atividade antimicrobiana, usada no tratamento da sífilis), Sir Alexander Fleming, bacteriologista do St. Mary’s Hospital, descobriu acidentalmente a penicilina, quando verificou que uma das suas placas contendo culturas de estafilococos possuía um halo de inibição de crescimento, devido à presença de uma substância bactericida, produzida por um fungo contaminante denominado *Penicilium notatum* (Fleming, 1929; Mckenna, 2001; Ligon, 2004). Somente, entre 1930 a 1940, Florey e Chain, dois talentosos investigadores, decidiram retomar a investigação iniciada por Fleming e conseguiram purificar e determinar a eficácia da penicilina, o que possibilitou a sua aplicação clínica e produção à escala industrial, desencadeando um avanço extraordinário para a medicina da época, ficando a penicilina conhecida como “o medicamento milagroso” (Mckenna, 2001; Rang *et al.*, 2008; Carlet *et al.*, 2011). Ao longo dos seguintes anos, a antibioterapia tornou-se indispensável no tratamento de infeções bacterianas e nos dias de hoje, os antibióticos constituem um dos grupos de medicamentos mais receitados a nível mundial, devido à sua indiscutível utilidade terapêutica (INFARMED, 2009; INFARMED, 2011).

Contudo, as resistências a estes milagrosos grupos terapêuticos têm aumentado dramaticamente ao longo dos últimos anos, acabando por se chegar a uma nova era pré-antibiótica em que a sociedade é colocada em perigo. Atualmente, segundo a “World Alliance against Antibiotics Resistance” (WAAR), os antibióticos podem perder a sua eficácia nos próximos cinco anos, devido à automedicação e ao uso irracional destes agentes terapêuticos, o que conduziu ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes e algumas delas resistentes a todos os antibióticos disponíveis. Por isso, a necessidade do desenvolvimento de alternativas aos antibióticos torna-se cada vez mais indispensável para a saúde pública mundial (Carlet *et al.*, 2011; Carlet e Mainardi, 2012; Carlet *et al.*, 2012b; Escobar-Paramo *et al.*, 2012).

O “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC) declarou que anualmente morrem cerca de 25 000 pessoas por infecções causadas por bactérias multirresistentes e acrescentou igualmente que estes microrganismos debitam dos cofres europeus cerca de 1,5 bilhões de euros em cuidados médicos extra e perdas produtivas por ano (Carlet e Mainardi, 2012).

Após a antibioterapia ter sido colocada em prática clínica, verificou-se que certos microrganismos, como a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae* (bactérias comensais e patogénicas quer em humanos, quer nos animais), que numa fase inicial eram suscetíveis aos antibióticos convencionais, passaram a adquirir resistências ao tratamento, inclusive com cefalosporinas de 3ª geração (Carlet *et al.*, 2011 e Carlet e Mainardi, 2012).

Atualmente, com a fácil transferência das bactérias quer nos cuidados hospitalares, quer a nível comunitário, com os hábitos de higiene por parte da população estarem bem longe de serem os melhores, com as viagens internacionais ao dispor de qualquer cidadão, com o uso irracional e exagerado dos antibióticos e, por fim, com as bactérias em constantes mutações, ou a promover transferências de genes contendo as resistências por plasmídeos, ocorre muito facilmente a “globalização da resistência”, como o que recentemente aconteceu com a enzima NDM-1 (Walsh, 2011; Charan *et al.*, 2012).

A NDM-1 ou “New Delhi Metallo-beta-lactamase-1” é uma enzima produzida pela *Klebsiella pneumoniae* ou pela *Escherichia coli*, que as tornam resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A referida enzima foi descoberta numa primeira fase, num indivíduo indiano na Suécia, sendo mais tarde encontrada em bactérias na Índia, Paquistão, Estados Unidos, Canadá, Japão e Reino Unido (Yong *et al.*, 2009; Walsh, 2011; Charan *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2012).

O cenário revela-se ainda mais assustador, quando a resistência das bactérias se une com os seus fatores de virulência, proporcionando um surto como o decorreu na Europa, em Maio de 2011, tendo afetado mais de 3469 pessoas e morto cerca de 50 pacientes, provocado pela *Escherichia coli* 0104:H4, produtora da toxina Shiga, presente em saladas, que desencadeou a síndrome hemolítica-urémica, provocando insuficiência renal, trombocitopenia e anemia hemolítica nos indivíduos infetados por esta estirpe bacteriana (Buchholz *et al.*, 2011).

Os principais exemplos de mecanismos de resistência são: i) redução da permeabilidade bacteriana (“uptake”), causando resistência à passagem do antibiótico; ii) produção de enzimas que inativam os fármacos, como as  $\beta$ -lactamases; iii) alteração dos recetores do fármaco; iv) redução da concentração do fármaco na bactéria, através de bombas de efluxo presentes nas membranas plasmáticas; v) modificação da via enzimática, reduzindo suscetibilidade da bactéria para o antibiótico e vi) perda de enzimas utilizadas na ativação do pró-fármaco (Łęski e Tomasz *et al.*, 2005; Piddock, 2006; Rouveix, 2007; Stavri *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2008; Romanelli *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2010; Wardal *et al.*, 2010; Martínez-Júlvez *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, tem-se constatado um acréscimo do uso de antibióticos, em grande parte provocado pelo aumento do número de pessoas a necessitar de cuidados de saúde, como consequência do agravamento do envelhecimento populacional e do consequente aumento da prevalência de doenças crónicas e das infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS), também denominadas de infeções nosocomiais, as quais constituem um problema de saúde pública, quer a nível nacional, quer a nível mundial (Pina *et al.*, 2010a; Pina *et al.*, 2010b).

A automedicação constitui outro fator de “peso” que contribui para o agravamento deste problema, pois conduz a um consumo exagerado de antibióticos, até mesmo em países europeus onde se podem comprar estes fármacos, sem prescrição médica, em farmácias, supermercados, ou pela Internet. Estes medicamentos incorretamente utilizados pela população, são muitas das vezes usados para tratar constipações comuns e/ou infeções do trato respiratório, maioritariamente provocadas por vírus (Campos *et al.*, 2007; Mainous *et al.*, 2009).

Adicionalmente, o uso excessivo de antibióticos nas explorações animais, quer para fins terapêuticos, quer para fins profiláticos e até mesmo como promotores de crescimento, veio agravar ainda mais a situação, pois induz a seleção de microrganismos patogénicos e comensais resistentes às moléculas farmacológicas, as quais podem ser transmitidas por contacto com o animal ou pela cadeia alimentar. Neste contexto, e uma vez que vários estudos europeus vieram comprovar a existência de elevadas percentagens de resistência a tetraciclinas em *Enterococcus spp* isolados de animais e de suiniculturas, a União Europeia entendeu abolir o uso dos antibióticos como promotores de crescimento

animal (Aarestrup *et al.*, 2000; Donabedian *et al.*, 2003; Wegener, 2003; Johnsen *et al.*, 2005; INFARMED, 2007; Katsunuma *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2008).

Por fim, a resistência aos antibióticos atingiu um nível tão elevado que coloca em risco a raça humana e, com a atual crise na União Europeia, verifica-se que as verbas direcionadas para os cuidados de saúde e de investigação serão cada vez mais reduzidas, logo pode esperar-se uma mais rápida e fácil disseminação destas bactérias na comunidade e nos hospitais.

Torna-se necessário descobrir novos antibióticos com mecanismos de ação distintos dos que estão disponíveis no mercado, tarefa árdua pois a cada ano, apenas 0,01% das novas moléculas testadas, ou seja apenas 5 em 260 000 a 530 000, apresentam atividade antibacteriana, para além de possuírem custos de produção elevados, sínteses extremamente complexas e elevados níveis de toxicidade (Fernebro, 2011).

É imperativo que sejam executadas novas medidas a nível hospitalar e comunitário com o intuito de alterar a forma como se diagnosticam e se tratam as infeções bacterianas, como também é fundamental a adoção de estratégias alternativas que promovam a eliminação destas estirpes resistentes do meio ambiente, recorrendo, por exemplo: i) à terapia fágica; ii) à terapia com lisinas; iii) aos tubos peptídicos formadores de poros; iv) ao uso de bacteriocinas; entre outras (Hanlon, 2007; Housby e Mann, 2009; Theuretzbacher, 2009; Abedon *et al.*, 2011; Fernebro, 2011; Freire-Moran *et al.*, 2011; Wijagkanalan *et al.*, 2011; Carlet *et al.*, 2012a; Escobar-Paramo *et al.*, 2012; Parracho *et al.*, 2012).

Face ao exposto, os objetivos deste trabalho de conclusão de ciclo centram-se na pesquisa, compilação e análise das estratégias atrás referidas e que se apresentam como alternativas aos antibióticos químicos convencionais.

## **II. Capítulo 1: Terapia fágica**

### **1.1. Os Bacteriófagos e a terapia fágica**

Os bacteriófagos, ou também conhecidos como fagos, são vírus que infetam exclusivamente bactérias. São entidades biológicas conhecidas há mais de um século. Contudo, só atualmente é que se verifica um especial interesse sobre os fagos, como uma potencial alternativa, ou complemento, aos antibióticos devido às suas propriedades específicas e únicas no combate às bactérias resistentes a este grupo de fármacos (Hermoso *et al.*, 2007; Housby e Mann, 2009; Hagens e Loessner, 2010).

Os fagos, não possuem metabolismo próprio, logo são considerados parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam de uma bactéria para se multiplicarem, através do seu material genético, usando a maquinaria bioquímica das células bacterianas (Skurnik e Strauch, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Hyman e Abedon, 2010).

A maioria dos fagos descobertos até os dias de hoje, é especializada em interagir com bactérias que expressam recetores específicos e, caso a bactéria não apresente à superfície o recetor para um dado bacteriófago, esta não é afetada, logo o fago torna-se naturalmente específico para um determinado hospedeiro bacteriano. Estima-se que, para cada célula bacteriana, existam dez diferentes bacteriófagos, sendo alguns deles altamente específicos para o seu hospedeiro, ou seja reconhecem exclusivamente um tipo de recetor (monofago), enquanto outros apresentam uma gama de hospedeiros mais ampla, ou seja reconhece mais do que um tipo de recetores (polifago) (Skurnik e Strauch, 2006; Hyman e Abedon, 2010; Chan e Abedon, 2012).

A terapia fágica tem vindo a ser aplicada como tratamento de infeções bacterianas, ao longo de algumas décadas, em certos países como acontece na República da Geórgia (Instituto Eliava) e na Polónia, onde foram construídos centros de investigação para a pesquisa de bacteriófagos e desenvolvimento da terapia fágica. Os estudos realizados nestes centros demonstraram resultados clínicos notáveis. No entanto, e até à data, poucos foram os ensaios clínicos efetuados em humanos e aceites pelas autoridades de saúde pública, como a “Food and Drugs Administration” (FDA) e a “European Medicines Agency” (EMA) (O’flaherty *et al.*, 2009; Maura e Debarbieux, 2011).

## 1.2. História da terapia fágica

O início da história da terapia fágica envolve muita controvérsia e ainda hoje existem debates na comunidade científica sobre este tema. Contudo pensa-se que o primeiro bacteriófago foi descoberto em 1915 por Frederick Twort, microbiólogo britânico, quando este tentava cultivar vírus em meios de cultura artificiais. Twort verificou que devido à contaminação das placas por bactérias, algumas das colónias ficavam transparentes e presumiu que teria descoberto um vírus que provocava lise bacteriana (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Summers, 2012).

Todavia, outros investigadores defendem que a descoberta dos fagos foi oficialmente feita em 1917, por Félix d’Herelle, um microbiólogo Franco-canadiano. Usufruindo de técnicas laboratoriais da época, Félix d’Herelle especulou que o uso de fagos para o tratamento antibacteriano era seguro e eficaz, ingerindo ele próprio uma preparação fágica específica para *Shigella dysenteriae*, a qual viria a ser, posteriormente, um sucesso na cura de doentes com disenteria. Félix d’Herelle seria mais tarde congratulado como pai da Virologia Moderna, pois nomeou estes vírus como bacteriófagos e, após desenvolver diversos estudos, conseguiu isolar diversos fagos e conceber um método de quantificação viral (d’Herelle, 1916; Summers, 2012).

No entanto, e apesar do sucesso, a partir de 1940 com o surgimento da era dos antibióticos, o interesse nesta abordagem terapêutica foi reduzindo gradualmente e só atualmente é que a terapia fágica volta a suscitar atenção por parte da indústria farmacêutica, com o intuito de combater o crescimento exponencial das bactérias multirresistentes aos antibióticos químicos convencionais (Summers, 2012).

Adicionalmente, os fagos são ubíquos no ambiente e das entidades mais abundantes no planeta. Estima-se que 20 a 50% da mortalidade bacteriana está associada aos bacteriófagos e, por isso, apresentam um papel fundamental para a manutenção da quantidade de matéria orgânica envolvida nos ciclos biogeoquímicos (Wommack e Colwell, 2000; Maura e Debarbieux, 2011). No entanto, os bacteriófagos não induzem o declínio global da biomassa bacteriana, existindo uma evolução dinâmica entre ambos, ou seja, as bactérias tentam constantemente promover mecanismos de resistência contra os fagos, e estes “respondem” superando-os (Rohwer *et al.*, 2009; Rodriguez-Brito *et al.*, 2010; Maura e Debarbieux, 2011).

### 1.3. Taxonomia dos fagos

Relativamente à sua morfologia e classificação, os fagos encontram-se divididos por 6 grandes grupos. No entanto, e de uma forma global, todos eles apresentam uma estrutura bem definida, contendo uma cápside, usualmente icosaédrica, que envolve o material genético. Podem conter no interior da cápside DNA de cadeia simples (ssDNA), ou dupla (dsDNA), ou RNA de cadeia simples (ssRNA) ou cadeia dupla (dsRNA), como está ilustrado na Tabela 1, em anexo (Ackermann, 2007; Hanlon, 2007).

Desde os anos 60, já foram estudados, mais de 5 100 fagos e conclui-se que cerca de 96% deles, possuem cauda e podem pertencer às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (Weber-Dabrowska *et al.*, 2005; Ackermann, 2007; Hanlon, 2007).

### 1.4. Processo de infeção fágica: via lítica vs via lisogénica

O processo de infeção fágica (consultar Figura 1, em anexo) inicia-se quando sucede a adsorção do bacteriófago à superfície da bactéria. É um processo complexo, constituído por três fases. Numa primeira fase, ocorre o contacto entre fago e bactéria por difusão e movimentos brownianos. Posteriormente estabelece-se uma ligação reversível, não específica, entre ambos por forças electrostáticas, seguindo-se de uma ligação irreversível entre as proteínas da cápside fágica e um recetor da superfície bacteriana, que, dependendo do tipo de fago em questão, podem ser: i) glicoproteínas; ii) lipopolissacáridos; iii) aminoácidos; iv) ácidos teicóicos e v) *pili* (Skurnik e Strauch, 2006; Maura e Debarbieux, 2011).

Após a ligação do fago à superfície da bactéria, ocorre a penetração de uma porção fágica ou da estrutura fágica completa no hospedeiro seguido da libertação do material genético para o meio intracelular. Este processo deve-se ao facto de grande parte dos fagos, através de enzimas, tornarem a parede celular permeável e, dessa forma, pode ocorrer a injeção do material genético por endocitose, translocação ou fusão do invólucro. No caso do bacteriófago T4, o qual é específico para a *Escherichia coli*, ocorre uma fraca interação entre o fago e os lipopolissacáridos existentes na superfície desta bactéria, desencadeando, posteriormente, uma interação forte e irreversível entre as duas estruturas. Seguidamente, a injeção do material genético viral para o citoplasma

bacteriano dá-se através da bainha contrátil do fago, como está ilustrado na Figura 2, em anexo (Alberts *et al.*, 2004; Potera, 2013).

A etapa seguinte sucede após a injeção do material genético no citoplasma da bactéria e, desta forma, dependendo do tipo de fago, pode ocorrer uma resposta lítica ou lisogénica. No caso da resposta lítica, causada por fagos líticos, ou também designados como virulentos, o metabolismo do hospedeiro é direcionado para a produção de novos fagos por replicação do material genético viral no citoplasma, levando à produção de mais fagos líticos em ciclos de 30 minutos que posteriormente lisam a bactéria. É também importante salientar que o DNA fágico encontra-se metilado, ou seja, por ação de uma metilase ocorre a introdução de um grupo metilo no carbono 5 da citosina do anel pirimidínico, que protege o DNA exógeno da ação destrutiva das endonucleases de restrição presentes nas bactérias. Numa fase inicial, a RNA polimerase é atraída para o local devido à presença de uma sequência promotora no genoma fágico e inicia-se o processo de transcrição, levando à produção do mRNA viral. Este é posteriormente traduzido levando à síntese de proteínas virais que inibem o processo de transcrição no hospedeiro, estimulam a replicação do material genético exógeno e permitem assumir e controlar a maquinaria celular, como também estimulam a replicação tardia de alguns genes que codificam proteínas da cápside e de enzimas que provocam a lise da parede celular que são fundamentais para a libertação dos novos viriões. Este é o tipo de fago usado em terapia fágica (O'flaherty *et al.*, 2009; Maura e Debarbieux, 2011).

No caso da resposta lisogénica causada por fagos temperados, a reprodução fágica ocorre tardiamente, porque o material genético injetado pelo fago é integrado no genoma da bactéria hospedeira. Nesta situação, o fago replica-se sem lisar o hospedeiro e a bactéria torna-se imune a ataques de outros fagos da mesma estirpe, passando a denominar-se por bactéria lisogénica (Hanlon, 2007; O'flaherty *et al.*, 2009; Maura e Debarbieux, 2011). Esta bactéria caracteriza-se por possuir um profago, ou seja, um fago inativo que se encontra integrado no seu genoma e permanece num estado de dormência durante várias divisões celulares. Este é ativado após ocorrerem processos de *stress* ou danos celulares no hospedeiro, induzindo a sua replicação por via lítica, após a sua saída do genoma bacteriano. De seguida, ocorre a síntese e a libertação de novos viriões por extrusão, ou seja, sem ocorrer o rompimento da membrana celular (Hanlon, 2007; Maura e Debarbieux, 2011).

É indispensável salientar que durante o processo de infecção fágica, o fago assegura que apenas o seu DNA viral será replicado, impedindo que outro fago interfira no processo. Por fim, em ambos os ciclos, após a síntese das proteínas virais e enzimas responsáveis pela formação da cápside e empacotamento do material genético dá-se a montagem e formação de novos viriões. Estes hidrolisam a membrana citoplasmática, através da ação de holinas, e posteriormente o peptidoglicano através de endolisinas, levando à lise da bactéria (processo lítico) e consequente expulsão dos viriões para o meio extracelular (Ackermann, 2007; Maura e Debarbieux, 2011).

### **1.5. Terapia fágica e seus pré-requisitos**

A terapia fágica constitui uma das estratégias alternativas à antibioterapia, e consiste na utilização de bacteriófagos estritamente líticos, ou também denominados virulentos, como alternativa, ou complemento, no tratamento de infecções bacterianas (Escobar-Paramo *et al.*, 2012; Chan e Abedon, 2012). Apesar do seu estatuto como vírus, os bacteriófagos são estritamente específicos para determinadas células procarióticas, as quais incluem todas as bactérias patogénicas conhecidas até hoje. A terapia fágica tem-se revelado segura e isenta de efeitos adversos dignos de serem registados pois estas entidades biológicas não possuem qualquer afinidade para as células eucarióticas (Chan e Abedon, 2012).

Os fagos líticos são, de uma forma geral, os predadores naturais das bactérias e quando em contacto com elas, invadem estirpes bacterianas específicas e induzem um processo de infecção lítica, ao qual está associado uma disrupção metabólica e lise celular, reduzindo desta forma, o número de bactérias existentes no hospedeiro até uma percentagem que não represente perigo para o organismo infetado, como se encontra ilustrado na Figura 3, em anexo (Kutter *et al.*, 2010; Escobar-Paramo *et al.*, 2012).

A utilização exclusiva de monofagos como agentes terapêuticos, pode não ser a ideal, pois como aqueles apresentam um espectro de ação reduzido, podem limitar o potencial da terapia fágica no tratamento de infecções bacterianas, quando se desconhece concretamente a estirpe bacteriana que causa a infecção. Desta forma, o espectro de ação pode ser alargado através de um “cocktail” fágico, o qual consiste numa mistura de fagos que infeta uma gama de hospedeiros mais ampla ou seja, um conjunto de

bacteriófagos que infeta várias estirpes da mesma espécie bacteriana, ou diferentes espécies, em simultâneo (Chan e Abedon, 2012).

Existe um conjunto de pré-requisitos da terapia fágica que tem como objetivo evitar o insucesso desta abordagem terapêutica. Estas exigências estipulam que: i) só podem ser aplicados na terapia fágica fagos que possuem uma atividade exclusivamente lítica, pois os fagos, em geral, apresentam no seu genoma genes que codificam resistências bacterianas e, como os fagos lisogénicos integram o seu material genético no genoma bacteriano, seria mais uma forma de alastrar estirpes bacterianas resistências; ii) antes de ser aplicada a terapia com um determinado fago, é estritamente necessário conhecer a sua biologia e a gama de hospedeiros que afeta; iii) as preparações fágicas devem ser isentas de bactérias e de respetivos componentes, como proteínas, DNA, organelos, entre outras; iv) o recetor onde o fago pode atuar deve ser bem conhecido, pois numa cultura celular, pode ocorrer uma mutação que provoque a alteração do recetor, levando a uma ineficácia terapêutica; v) o fago deve ser testado em modelos animais, para garantir eficácia terapêutica, porque pode apresentar atividade diferente em modelos “in vivo” (Levin e Bull, 2004; Skurnik e Strauch, 2006; Hermoso *et al.*, 2007).

### **1.6. Vantagens e desvantagens da terapia fágica face à antibioterapia**

As vantagens dos fagos perante os antibióticos são numerosas, designadamente: (i) os bacteriófagos são específicos para uma determinada espécie ou estirpe bacteriana, dependendo do tipo de recetor que ele reconheça; (ii) são os “predadores naturais” das bactérias; (iii) a comunidade está exposta constantemente a estas entidades biológicas; (iv) são ubíquos no ambiente e são das entidades mais abundantes do planeta; (v) são facilmente isolados; (vi) apresentam elevada permeabilidade tecidual, logo possuem boa penetração cutânea, e conseguem atingir camadas mais profundas da pele onde possam existir feridas profundas e crónicas; (vii) podem ser aplicados no tratamento de bactérias patogénicas, sem afetar a flora comensal, evitando-se infeções secundárias; (viii) não afetam as células eucarióticas, pois não possuem afinidade para elas; (ix) apresentam um crescimento exponencial e replicam-se no interior da bactéria e, desta forma, acumulam-se em elevadas concentrações no local de infeção; (x) tornam-se desnecessárias administrações sucessivas de preparações fágicas, pois enquanto a bactéria alvo estiver presente, o fago encontra-se em constante replicação, até que a

percentagem bacteriana baixe para um valor que não apresente perigo para o organismo em questão, sendo eliminados posteriormente pelo organismo; (xi) revelam elevada capacidade de penetração em biofilmes bacterianos; (xii) podem sofrer mutações e superar a resistência bacteriana; (xiii) o processo de isolamento de novos fagos é económico e simples, ao contrário do processo de desenvolvimento de novos antibióticos; (xiv) podem ser uma alternativa terapêutica segura para doentes alérgicos aos antibióticos e (xv) o tratamento pode ser eficaz só com a utilização de pequenas concentrações de fagos (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Weber-Dabrowska *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2005; Skurnik e Strauch, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Abhilash *et al.*, 2009; O'flaherty *et al.*, 2009; Hagens e Loessner, 2010; Kutter *et al.*, 2010).

No entanto, a terapia fágica também apresenta desvantagens, nomeadamente: i) é necessário identificar, numa primeira fase, o agente infeccioso e, posteriormente, isolar o seu fago específico; ii) os bacteriófagos ao serem administrados por via sistémica desencadeiam uma resposta imunitária, levando à produção de anticorpos, o que pode reduzir a eficácia do tratamento; iii) na terapia fágica só podem ser utilizados fagos exclusivamente líticos, o que reduz o número de fagos disponíveis para integrar a terapia (Hermoso *et al.*, 2007; O'flaherty *et al.*, 2009; Parracho *et al.*, 2012; Chan e Abedon, 2012).

### **1.7. Resistência bacteriana aos bacteriófagos e cinética dos bacteriófagos**

Os mecanismos de resistência bacteriana aos bacteriófagos estão geralmente associados à anulação do processo de adsorção fágica, através de mutações que comumente conduzem à perda dos recetores específicos que permitem a ligação entre o fago e a bactéria, como também podem induzir a produção de camadas ricas em mucilagens que revestem toda a superfície bacteriana, impedindo o contacto do fago com o seu respetivo recetor.

Adicionalmente, a bactéria pode adquirir resistências através de fagos lisogénicos que contêm no seu material genético sequências que codificam resistências bacterianas ou toxinas que, após a integração do seu material genético no genoma da bactéria, esta passa a adquirir a referida resistência. Para além destes mecanismos, as bactérias podem hidrolisar o material genético do fago através de endonucleases de restrição presentes no

citoplasma e podem metilar o seu próprio DNA, funcionando como mecanismo de defesa aos fagos. A resistência pode ser também causada por mutações em genes, que codificam proteínas essenciais para a replicação fágica ou indispensáveis na montagem dos viriões.

Todavia, as resistências bacterianas nem sempre são favoráveis para a bactéria, pois muitas das vezes, a resistência pode reduzir a “performance” da bactéria, ou, se o recetor específico for um fator de virulência, a mutação pode provocar uma redução drástica da sua virulência (Levin e Bull, 2004; Skurnik e Strauch, 2006).

Relativamente à “farmacocinética” dos fagos, esta permite estabelecer a quantidade de fagos que se encontra disponível no local alvo de forma a exercer ação terapêutica e descreve o impacto que o organismo tem sobre os fagos. Este é um parâmetro bastante complexo devido à natureza autorreplicativa dos fagos e para o qual ainda foram elaborados poucos estudos. É importante ter em conta, que o processo de replicação “in vitro” de um fago pode ser bastante diferente daquele que realmente acontece “in vivo”, pois os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos “in vivo”, diferem de fago para fago. Desta forma, a farmacocinética da terapia fágica é muito diferente da que está associada aos antibióticos e apresenta um conjunto de parâmetros críticos que devem ser equacionados como: i) a taxa de adsorção; ii) período de latência; iii) dose fágica inicial; iv) tempo crítico; v) “clearance” renal; vi) capacidade de replicação do fago “in situ”; vii) anatomofisiologia atual do hospedeiro; viii) condições ambientais e ix) distribuição do fago, a qual vai depender do sistema imune do indivíduo (Skurnik e Strauch, 2006).

### **1.8. Aplicações da terapia fágica**

Ao longo dos últimos trinta anos, foram elaborados vários estudos que envolviam o uso de bacteriófagos, os quais demonstraram a capacidade de infetarem bactérias patogénicas em animais e humanos, como por exemplo, o recentemente descoberto fago lítico  $\phi$ NK5, que é altamente eficaz contra *Klebsiella pneumoniae* em ratos (Hung *et al.*, 2011).

Hoje em dia, existem alguns modelos experimentais que visam a administração de bacteriófagos por via intravenosa (VI), ou intraperitoneal, e que apresentam eficácia terapêutica. Contudo a VI não é a ideal pois ainda não é possível garantir que as

soluções de bacteriófagos se encontrem completamente isentas de pirogêneos (Maura e Debarbieux, 2011). Como a administração intravenosa de fagos deixou de ser a primeira opção, um grupo de investigadores tentou administrar um “cocktail” fágico, contendo o fago SP15, SP21 e SP22, *per os*, para o tratamento de infecções gastrointestinais provocadas por *Escherichia coli* O157:H7 em ratos, tendo o número de bactérias detetadas nas fezes reduzido substancialmente. No entanto, ainda se desconhecem as consequências provocadas por estas entidades na flora intestinal e na resposta imunitária (Tanji *et al.*, 2005).

Outra via de administração que tem sido estudada e desenvolvida com base num modelo experimental, é a tópica, em que as infecções bacterianas cutâneas podem ser tratadas com a simples aplicação externa de um creme contendo bacteriófagos. No entanto, tal como acontece na administração oral, ainda se desconhecem os efeitos adversos, tornando-se, portanto, necessário aprofundar o modelo (O’Flaherty *et al.*, 2005). Recentemente, foi selecionada a via de administração intranasal para o tratamento de infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ou por *Klebsiella pneumoniae*, através do fago PAK-P1 e do fago SS, respetivamente. Porém, esta via revelou uma eficácia terapêutica relativamente menor, comparativamente com a administração intraperitoneal, o que foi confirmado pelo estudo comparativo realizado por Carmody *et al.* (2009).

Ainda neste âmbito, um outro estudo veio comprovar que uma única instilação intranasal contendo o bacteriófago PAK-P1, ilustrado na Figura 4, em anexo, é suficientemente eficaz para prevenir a infeção por um período de 24 horas. Atualmente foi obtido o mesmo resultado, mas com o fago P3-CHA, que é capaz de curar e prevenir infecções pulmonares agudas provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes isolada de um paciente com fibrose cística num hospital em França (Chhibber *et al.*, 2008; Debarbieux *et al.*, 2010; Maura e Debarbieux, 2011; Morello *et al.*, 2011).

Em 2009, foi aceite pela FDA, um ensaio clínico de fase I que envolvia o uso de um “cocktail” de bacteriófagos, aplicado em úlceras venosas e que tinha como principais alvos: as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os resultados deste ensaio clínico comprovaram que o referido “cocktail” fágico era seguro e eficaz, comparativamente com grupo controlo (Rhoads *et al.*, 2009; Maura e Debarbieux, 2011). Também em 2009, um ensaio clínico de fase II foi efetuado na

Inglaterra pela “Biocontrol Ltd”, o qual demonstrou a eficácia da terapia fágica no tratamento de otites crônicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (Wright *et al.*, 2009; Maura e Debarbieux, 2011).

Estudos recentes indicam que um número de fagos de  $10^2$ - $10^3$  unidades formadoras de placas (UFP) é suficiente para iniciar a replicação fágica e desencadear ação terapêutica, em  $10^6$ - $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (Rhods *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2009; Parracho *et al.*, 2012).

Nos ensaios clínicos acima referidos são utilizadas preparações contendo bacteriófagos e para que estas sejam eficazes e usadas com fins clínicos, é necessário promover uma uniformização das metodologias usadas, como também controlar a qualidade final destes produtos. Desta forma, deve haver uma adequada identificação e monitorização das preparações para aplicação clínica, através de várias técnicas como: (i) sequenciação do DNA; (ii) microscopia eletrônica e (iii) “Polymerase Chain Reaction”. Todos os bacteriófagos utilizados em ensaios clínicos efetuados em humanos, devem ser estritamente líticos e identificados pelas técnicas acima referidas. Devem apresentar uma estabilidade adequada e devem ser otimizadas as condições relativas ao armazenamento do produto, ou seja, não expor o produto a variações extremas de temperatura, de pH e de humidade excessiva, de forma a não alterar a sua composição. Todas as preparações fágicas utilizadas nos ensaios clínicos devem ser esterilizadas por processos devidamente validados e estipulados pela Farmacopeia. Todos estes parâmetros são indispensáveis para garantir a eficácia, segurança e pureza da preparação fágica (Yang *et al.*, 2010; Jończyk *et al.*, 2011).

A longo prazo, espera-se que ocorra a remodelação do sistema que é utilizado por parte das indústrias farmacêuticas, pois o modelo que é aplicado hoje em dia não é o mais indicado, nem compatível com a terapia fágica. Neste contexto, estabeleceram-se dois arquétipos que podem vir a ser usados na terapia fágica: i) o “Conventional medicinal product development” ou ii) o “Traditional tailor-made approach” (Pirnay *et al.*, 2011; Pirnay *et al.*, 2012). Desta forma, na atualidade, a comunidade científica questiona-se se seria proveitoso produzir as preparações fágicas em larga escala e comercializá-las como os fármacos convencionais, que envolvem elevados custos de produção e vários meses ou até anos a serem desenvolvidos, como acontece com o modelo “Conventional medicinal product development”, ou se o mais indicado seria optar por um modelo

racional, personalizado e flexível, realizado em hospitais, como o “Traditional tailor-made approach”, envolvendo custos reduzidos e desenvolvidos em apenas dias ou semanas (Merabishvili *et al.*, 2009; Kutter *et al.*, 2010; Pirnay *et al.*, 2011; Pirnay *et al.*, 2012).

A terapia fágica não se encontra exclusivamente direcionada para os cuidados de saúde mas também, para a indústria alimentar. Apesar dos bacteriófagos serem um “quebra-cabeças” na produção de queijos e produtos fermentativos como os iogurtes, pois destroem as bactérias necessárias para a sua produção, são utilizados para destruir bactérias patogénicas dos alimentos. Estão disponíveis no mercado vários produtos fágicos aprovados pela FDA, com a finalidade de controlar as infeções bacterianas nos processos de produção alimentar. Com a disponibilização destes produtos, estabilizaram, a nível europeu, o número de infeções por *Listeria monocytogenes* (Hagens e Loessner, 2010).

Presentemente, existem preparações fágicas contra vários tipos de bactérias (como a *Escherichia coli* e *Salmonella sp*) para serem aplicadas na alimentação dos animais e administradas antes do abate de bovinos e de galinhas. Atualmente, a Intralytix, uma empresa norte americana direcionada para a indústria alimentar, para a saúde humana e veterinária, bem como para as questões ambientais, desenvolveu várias preparações fágicas utilizadas no controlo e prevenção de bactérias responsáveis por contaminar os alimentos, nomeadamente: i) ListShield™, para o controlo da listeriose, aceite pela FDA em Agosto de 2006); ii) EcoShield™, utilizada na prevenção de contaminações dos alimentos por *Escherichia coli* e a iii) SalmoFresh™, que reduz contaminações nos alimentos provocadas por *Salmonella* e no corrente ano foi considerada uma substância “generally recognized as safe” (GRAS) pela FDA (Atterbury, 2009; Balogh *et al.*, 2010; Hagens e Loessner, 2010; Intralytix, 2013).

Em Portugal, existem duas empresas, a TechnoPhage e a Innophage, que promovem a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos baseados nas propriedades únicas dos bacteriófagos, direcionadas para o tratamento, diagnóstico e prevenção de infeções bacterianas a nível da comunidade e das indústrias alimentar e hospitalar (Technophage SA, 2008; Innophage, 2010).

Os recentes avanços tecnológicos neste ramo abrem as portas para a possibilidade de personalizar os bacteriófagos, melhorando as suas características, particularmente: i)

expandir a capacidade dos bacteriófagos de infetarem biofilmes; ii) ampliar a sua potência e eficácia terapêuticas e iii) adaptar o espectro de ação do bacteriófago às infecções provocadas por inúmeras estirpes e espécies bacterianas (Lu e Collins, 2009; Pouillot *et al.*, 2010; Soto e Ratna, 2010; Maura e Debarbieux, 2011).

A título de curiosidade, atualmente, nos Estados Unidos, já existe a possibilidade dos fagos poderem vir a ser integrados nos sistemas de tratamento das águas residuais e potáveis já existentes. O processo que está a ser equacionado passa por filtrar os fagos presentes na água residual através de filtros de “nylon”, sendo posteriormente aplicados nas águas residuais e potáveis, contribuindo para o aumento da sua qualidade e da promoção da saúde pública em geral, impedindo a disseminação de bactérias multirresistentes (Tamaki *et al.*, 2012; Potera, 2013).

### **III. Capítulo 2: Terapia com lisinas**

#### **2.1. As lisinas**

As lisinas são enzimas produzidas por bacteriófagos que digerem a parede celular bacteriana e permitem a libertação do profago, garantindo assim a realização de novos ciclos infecciosos. As lisinas têm sido amplamente testadas e aplicadas em vários modelos animais, para o controlo e tratamento de bactérias resistentes aos antibióticos químicos convencionais (Fischetti, 2008; Schmelcher *et al.*, 2012).

Pequenas quantidades de lisinas recombinantes purificadas e administradas exogenamente em bactérias Gram-positivo demonstraram elevada eficácia terapêutica e promoveram a rápida lise da bactéria alvo. Contudo, esta capacidade antibacteriana é limitada, pois se as lisinas forem aplicadas externamente, apenas afetam bactérias Gram-positivo, uma vez que estas não possuem membrana externa (Fenton *et al.*, 2010). As lisinas demonstraram elevada segurança, especificidade e uma rápida capacidade de promover a lise celular na bactéria alvo em concentrações na ordem dos nanogramas, reduzindo exponencialmente o número de microrganismos, segundos após a adição da enzima lítica (Fischetti, 2008; McGowan *et al.*, 2012).

Ao contrário dos antibióticos, e tal como os fagos, as lisinas fágicas são seletivas e podem ser utilizadas para combater determinadas espécies bacterianas, ou géneros específicos, não afetando a flora comensal, sendo esta a sua principal vantagem (Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2011; McGowan *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012).

#### **2.2. Classificação das lisinas e mecanismo de ação**

As lisinas, que demonstram atividade terapêutica, são classificadas segundo a sua atividade catalítica (ver Figura 5, em anexo), como: i) *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidases (NAM-amidases); ii) *N*-acetilmuramidases (muramidases ou lisozimas); iii) endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidases (glucosaminidases); iv) endopeptidases (incluindo a *L*-alanoil-*D*-glutamato endopeptidase) e v) transglicosilases líticas. Dentro de todos estes tipos, as enzimas mais comuns sintetizadas pelos fagos são as amidases e as muramidases (Hermoso *et al.*, 2007).

Após ocorrer a replicação do fago no interior do seu hospedeiro, aquele necessita de lisar a célula, de forma a libertar o seu profago e garantir a realização de novos ciclos infecciosos. Ao longo dos anos, os fagos desenvolveram duas diferentes estratégias que permitem a libertação do fago progene da bactéria. Os fagos com dupla cadeia de DNA desenvolveram enzimas líticas (lisinas/endolisinas) que se acumulam no citoplasma da bactéria ao longo da última etapa do ciclo lítico e possuem capacidade de hidrolisar o peptidoglicano e de provocar lise celular (como está ilustrado na Figura 6, em anexo). As lisinas são altamente eficazes e têm evoluído ao longo de milhares de anos com a principal função de promover a lise bacteriana. Estas enzimas catalíticas por não possuírem sequências sinal (à exceção da lisina gp61 que possui uma sequência sinal que lhe permite passar diretamente para o espaço periplásmico e atuar na parede celular), não conseguem atravessar a membrana citoplasmática e atacar o seu substrato presente no peptidoglicano, por isso, necessitam de outros produtos fágicos, como a holina. Esta é uma proteína hidrofóbica, que promove a disrupção membranar da bactéria, ou seja, induz a formação de poros na membrana interna e permite a exportação das lisinas através da membrana citoplasmática até à parede celular para que estas possam atuar (Borysowski *et al.*, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Stojković e Rothman-Denes, 2007; Fenton *et al.*, 2010; McGowan *et al.*, 2012).

### 2.3. Estrutura das lisinas

Lisinas provenientes de fagos que possuam DNA e que infetam bactérias Gram-positivo, geralmente apresentam um tamanho que varia entre 25 a 40 kDa, com a exceção da PlyC, caracterizada por ser específica para *Streptococcus sp.* e possui um tamanho aproximado de 114 kDa. O peptidoglicano, é composto por várias cadeias de açúcares, *N*-acetilglucosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, ligados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e cadeias tetrapeptídicas ligadas ao grupo lactil do ácido murâmico, por ligações amida (Donovan *et al.*, 2006).

As lisinas são produzidas e acumuladas no citoplasma bacteriano numa fase terminal do ciclo celular. De uma forma generalizada, pois existem algumas exceções como acontece com a PlyC, as lisinas são constituídas por dois domínios: o catalítico presente na região N-terminal, caracterizado por proporcionar atividade catalítica à enzima, e o domínio de ligação à parede celular, presente na região C-terminal e que permite a

ligação entre a enzima e a parede celular da bactéria. Ambos os domínios acima referidos são ligados pelo “linker” (ver Figura 7, em anexo). O domínio catalítico, presente na região N-terminal, é menos variável relativamente ao domínio de ligação à parede celular, presente na região C-terminal, e este, pode apresentar diferentes atividades catalíticas, dependendo do tipo de ligações que hidrolisa (Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008).

A região N-terminal pode ser constituída pela: i) *N*-acetilmuramidases (muramidases ou lisozimas); ii) endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidases (glucosaminidases); iii) transglicosilases líticas, que atuam a nível das ligações glicosídicas presentes no peptidoglicano; iv) endopeptidase, que hidrolisa as ligações peptídicas do peptidoglicano ou v) *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidases (amidase) que hidrolisa as ligações amida (Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008).

Normalmente, cada lisina apresenta apenas um tipo de atividade catalítica, contudo, descobriram-se enzimas bifuncionais, que possuem dois domínios catalíticos independentes, capazes de catalizar a clivagem de mais do que uma ligação do peptidoglicano, como acontece com o fago B30 que é constituído por muramidase e endopeptidase, o fago  $\phi$ 11 específico para *Staphylococcus aureus*, que contém endopeptidase e *N*-acetilmuramil-*L*-alanina-amidase e o fago K1-5 que possui na sua cauda uma liase e uma endosialidase, facto que confere a este fago a capacidade de atuar na estirpe K1 e K5 da *Escherichia coli* (Hermoso *et al.*, 2007).

Já a região C-terminal é caracterizada por ser o domínio de ligação à parede celular (DLPC), ou seja, promove a ligação da lisina à parede celular do hospedeiro, mais concretamente, e a título exemplificativo, aos hidratos de carbono lá presentes. Este domínio apresenta um carácter variável, devido à seleção efetuada ao longo dos anos de evolução, com a finalidade de reconhecer diferentes hospedeiros. Para que ocorra a digestão da parede celular e consequente libertação do profago, é necessário que a bactéria seja sensível à lisina e apresente na sua parede celular o substrato específico para a região C-terminal, de forma a promover a ligação da lisina à parede celular. Contudo, este domínio, apesar de ser variável em relação ao domínio catalítico, é altamente específico para um determinado substrato presente em certas bactérias e liga-se a componentes que são essenciais à viabilidade bacteriana, o que reduz

substancialmente o número de resistências bacterianas e, ao mesmo tempo, garante a libertação do progene para o meio extracelular (Fischetti, 2008).

Adicionalmente, os investigadores começaram a relacionar que os diferentes domínios enzimáticos poderiam ser trocados, através da engenharia genética, conferindo-lhes diferentes especificidades para outras bactérias e, simultaneamente, diferentes atividades catalíticas, conduzindo ao desenvolvimento de lisinas quiméricas. Assim sendo, alguns estudos revelam que o domínio catalítico de uma lisina lítica específica para *Streptococcus pneumoniae* pode ser substituído por outro e, conseqüentemente, cria-se uma nova enzima com o mesmo domínio de ligação à parede celular, ou seja, também específica para o domínio pneumococos, mas ao mesmo tempo, capaz de lisar outras ligações presentes no peptidoglicano (Fischetti, 2008).

Outros estudos revelaram que existe sinergismo entre a oxacilina, um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, e a lisina ClyS, uma enzima quimérica sintetizada a partir da fusão do domínio N-terminal da lisina do fago Twort ativo contra *Staphylococcus aureus* e o domínio C-terminal da lisina phiNM3, protegendo os ratos de infecções provocadas por MRSA (“Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”) - Figura 8 e Figura 9, em anexo (Fischetti, 2008; Daniel *et al.*, 2010; McGowan *et al.*, 2012).

Segundo McGowan e colaboradores (2012), a lisina mais potente e complexa identificada até hoje é a PlyC. Esta enzima é produzida pela fago C1, sendo constituída por duas proteínas, a PlyCA e a PlyCB, que direcionam a sua atividade terapêutica exclusivamente para espécies estreptocócicas do grupo A, C e E, incluindo *Streptococcus uberis* e *Streptococcus equi* (ver Figura 10, em anexo). Ambas as subunidades são transcritas a partir de dois genes localizados no mesmo operão. A PlyCB é composta por 8 subunidades que permitem a ligação à parede celular da bactéria, sendo que usualmente as lisinas apenas apresentam apenas uma. Já a PlyCA é responsável pela atividade catalítica que apresenta dois domínios catalíticos distintos, amidase e glicosidase. Desta forma esta endolisina pode hidrolisar diferentes tipos de ligações do peptidoglicano presente na parede celular bacteriana, tornando-a na lisina mais potente até hoje descrita. No entanto, uma pequena mutação no domínio catalítico pode baixar a atividade entre 90-99% (Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2006; McGowan *et al.*, 2012).

A título exemplificativo, as bactérias também desenvolveram uma gama de lisinas denominadas de autolisinas, que hidrolisam as ligações  $\beta$ -(1,4) entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina da parede celular da própria bactéria que participam nos processos de divisão celular. Quando produzidas em elevadas concentrações, as autolisinas podem induzir a morte celular, devido à diferença de pressão osmótica entre a bactéria e o meio externo (Hermoso *et al.*, 2007).

#### **2.4. Vantagens, desvantagens e limitações da terapia com lisinas**

Existem várias vantagens relativamente a utilização da terapia com lisina, face aos antibióticos: i) as lisinas fágicas são seletivas e apresentam um espectro de ação reduzido, logo podem ser utilizadas para combater exclusivamente determinadas espécies/gêneros bacterianos, não afetando a flora comensal; ii) concentrações diluídas de preparações contendo lisinas serão suficientes para reduzir exponencialmente o número de bactérias, segundos após a adição da enzima lítica; iii) até aos dias de hoje, ainda não foram relatadas resistências a estas enzimas devido ao processo de coevolução de biliões de anos, estabelecido entre os fagos e as bactérias, levando ao desenvolvimento de uma região C-Terminal extremamente específica para moléculas presentes na parede do hospedeiro que são essenciais à sua viabilidade; iv) diversos estudos revelam que existe um sinergismo entre os antibióticos e as lisinas; v) os bacteriófagos são das entidades mais abundantes do planeta e, desta forma, existe um número considerável de lisinas disponíveis para aplicação terapêutica; vi) vários ensaios pré-clínicos realizados em animais demonstraram que a terapia com lisinas não apresenta efeitos secundários preocupantes; vii) quando as lisinas são aplicadas com o mesmo domínio de ligação e diferente atividade catalítica, ou seja que atuam na mesma estirpe bacteriana mas em locais distintos do peptidoglicano, ocorre um sinergismo entre ambas, otimizando a atividade terapêutica e, ao mesmo tempo, reduzindo a possibilidade de emergirem estirpes bacterianas resistentes; viii) já existem lisinas quiméricas ativas contra MRSA; ix) as lisinas apresentam elevada atividade antibacteriana, mesmo contra bactérias resistentes aos antibióticos; x) ao contrário da penicilina e das cefalosporinas, que inibem a síntese de peptidoglicano provocando a lise de bactérias que se encontrem em divisão celular, as lisinas destroem diretamente o peptidoglicano, provocando a lise osmótica de todas as bactérias específicas (Jado *et al.*,

2003; Loeffler *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2005; Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008; Daniel *et al.*, 2010; Fenton *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012).

Relativamente às desvantagens e limitações associadas à aplicação destas enzimas purificadas no tratamento de infeções causadas por bactérias patogénicas, estas estão correlacionadas com a produção de anticorpos pelo organismo hospedeiro contra as lisinas. Ao contrário dos antibióticos, que são de pequenas dimensões e não imunogénicos, as lisinas são proteínas que, independentemente da via pela qual são administradas no organismo, estimulam a resposta imunitária, levando à formação de anticorpos que podem reduzir a atividade da lisina “in vivo”. No entanto, diversos estudos realizados em ratos híper-imunizados contra a lisina Cpl-1, demonstraram que os anticorpos produzidos contra a enzima apenas abrandam a atividade lítica da mesma e não a bloqueiam, nem provocam efeitos secundários. Pensa-se que este efeito se deve a uma maior especificidade da lisina para a parede celular bacteriana do que a afinidade do anticorpo para com a lisina, o que impede o anticorpo de inibir o domínio catalítico da lisina (Loeffler *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008).

Outra desvantagem ou limitação, consiste no facto de, tal como foi anteriormente referido, quando administradas exogenamente, apenas serem ativas contra bactérias Gram-positivo, uma vez que as bactérias Gram-negativo apresentam a membrana externa impermeável a estas enzimas. Porém existe uma lisina produzida por um fago ativo contra *Bacillus amyloliquefaciens* que apresenta na região C-terminal uma sequência de aminoácidos de carácter lipofílico, que lhe permite atravessar a membrana externa e superar esta questão (Orito *et al.*, 2004).

Uma outra possível limitação das lisinas, está correlacionada com o seu estreito espetro de ação. Dependendo da situação clínica, pode ser necessário alargar o espetro por combinação de diferentes tipos de lisinas, com o intuito de impedir o desenvolvimento de resistências e infeções provocadas por mais do que uma espécie bacteriana (Wu *et al.*, 2012).

A título de curiosidade, foi desenvolvida presentemente a “Enzibase”, ver Figura 11 em anexo, uma base de dados de enzibióticos (são enzimas que degradam a parede celular bacteriana, nas quais estão incluídas as lisozimas, lisinas, bacteriocinas e autolisinas). Esta base constitui uma ferramenta útil para os investigadores e permite-lhes aceder rapidamente a uma variadíssima gama de informações acerca das enzimas que possuem

atividade terapêutica específica contra a estirpe bacteriana em questão e possibilita, de uma forma indireta, explorar, investigar e desenvolver novos enzibióticos, como também produzir “cocktails” de lisinas com espectros de ação alargados, com o intuito de combater as infecções bacterianas (Wu *et al.*, 2012).

## **2.5. Resistência bacteriana às lisinas**

Este tema permanece em discussão constante na comunidade científica. Diversos estudos revelam que não foram encontradas resistências bacterianas a esta inovadora estratégia terapêutica, mesmo após 40 ciclos de exposição a reduzidas concentrações destas enzimas líticas (Schuch *et al.*, 2002; Fischetti, 2008). Esta situação pode ser justificada, tal como foi supramencionado, pelo processo de coevolução de biliões de anos, estabelecido entre os fagos e as bactérias que, de forma a garantir que o fago progene não fique retido no interior das bactérias, aqueles desenvolveram uma região C-terminal, extremamente específica para moléculas essenciais à viabilidade bacteriana. Esta teoria explica o facto das lisinas específicas para pneumococos e estreptococos possuírem como recetores específicos na superfície da parede celular bacteriana o aminoalcoól colina e a ramnose, respetivamente, que são essenciais à viabilidade da bactéria e ao seu crescimento. Por fim, é de salientar que este mecanismo de coevolução converte as resistências bacterianas num evento de extrema raridade, tornando a terapia com lisinas extremamente vantajosa relativamente aos antibióticos químicos convencionais (Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008).

## **2.6. Aplicações da terapia com lisinas**

### **2.6.1. As lisinas na medicina e na biotecnologia**

Como as lisinas apresentam elevada atividade antibacteriana, pois hidrolisam ligações covalentes presentes na parede celular bacteriana, promovendo uma lise rápida da bactéria, poderão ser, num futuro próximo, uma potencial estratégia no tratamento de várias infecções bacterianas provocadas por: i) *Enterococcus faecalis*; ii) *Enterococcus faecium*; iii) *Clostridium perfringens*; iv) *Bacillus cereus* e v) até mesmo prevenir e controlar armas biológicas como o antraz, causado pelo *Bacillus anthracis*, por

administração intraperitoneal da lisina PlyG, produzida pelo fago  $\gamma$ , que é letal para esta bactéria (Borysowski *et al.*, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Fischetti, 2008; Proença *et al.*, 2012)

Três estudos realizados em animais demonstraram que uma única dose de lisinas administrada topicamente reduz drasticamente, mesmo para níveis inferiores ao limite de detecção, a quantidade de bactérias presentes nas mucosas oral, nasal e vaginal (Nelson *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005; Hermoso *et al.*, 2007). Apesar das lisinas apresentarem um tempo de semivida reduzido, cerca de 15 a 20 minutos, esse curto intervalo de tempo é suficiente para garantir a ação antibacteriana destas enzimas. Todavia é possível expandir este tempo de ação por modificação da região Fc (Fragmento cristalizável, situado na base do anticorpo, responsável por modelar a resposta celular imunitária após a ligação do anticorpo ao antígeno) dos anticorpos que as neutralizam (Loeffler *et al.*, 2003; Fischetti, 2008).

Atualmente, têm vindo a ser elaborados vários estudos intensivos, envolvendo a administração intraperitoneal de lisinas, como a Dp-1 e a Cp-1, específicas contra *Streptococcus pneumoniae*, pelo facto de esta bactéria apresentar um elevado grau de resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, como também por causar pneumonias, meningites, septicémias e otites médias em crianças e em imunodeprimidos (Hermoso *et al.*, 2007).

Num dos estudos efetuados, um conjunto de ratos foi contaminado por *Streptococcus pneumoniae* e, uma hora após a contaminação, foi-lhes administrado intraperitonealmente um *bolus* (administração de um fármaco com o intuito de aumentar rapidamente a sua concentração plasmática) de 2,0 mg de lisina Cpl-1. Ao fim de 48 horas, verificou-se que apenas 20 % dos animais sobreviveram e que se encontravam isentos da bactéria patogénica, o que demonstrou que seriam necessárias aplicações múltiplas e diluídas do mesmo *bolus*, ou de uma solução administrada parentericamente, de forma a eliminar todas as bactérias do organismo dos animais contaminados artificialmente (Jado *et al.*, 2003; Rashel *et al.*, 2007; Fischetti, 2008).

Nos dias atuais, as lisinas têm vindo a ser aplicadas no tratamento de infeções em aves domésticas provocadas por *Clostridium perfringens*, responsáveis por causar intoxicações alimentares e enterite necrótica. Numa primeira fase, um grupo de investigadores tentou aplicar um tratamento contendo fagos, mas como já foram

descobertas mais de 50 estirpes desta bactéria patogénica, seria necessário associar as preparações fágicas em forma de “cocktail”, contendo mais de 20 a 30 tipos de fagos. A equipa de investigadores combinou, conseqüentemente, um conjunto de lisinas e administrou-o sob a forma de um “cocktail” contendo peptidases, amidases e lisosimas, estabelecendo-se, desta forma, uma terapêutica mais eficaz (Volozhantsev *et al.*, 2011; Potera, 2013).

### **2.6.2. Sinergismo das lisinas com os antibióticos**

Presentemente, várias lisinas foram isoladas de bacteriófagos ativos contra *Streptococcus pneumoniae*, designadamente, a Cpl-1, uma muramidase, e a Pal, uma amidase, que apresentam o mesmo domínio de ligação (C-terminal) ao peptidoglicano do hospedeiro, mas diferentes atividades catalíticas. Estas enzimas foram administradas concomitante e intraperitonealmente, numa concentração de 2,5 µg, uma hora após a infeção dos ratos com *Streptococcus pneumoniae*, tendo impedido a proliferação da bactéria patogénica. Porém, o mesmo não se verificou com a administração das referidas enzimas líticas numa concentração de 5 µg. Este facto indica que quando estas enzimas são inoculadas em simultâneo “in vivo”, apresentam sinergismo e, desta forma, aumentam a eficácia terapêutica relativamente à utilização de apenas um tipo de lisina. Curiosamente, outros estudos indicam que a aplicação de duas enzimas com atividades catalíticas diferentes, com o intuito de combater o mesmo agente patogénico, pode também retardar e, até mesmo, reduzir significativamente a emergência de novas estirpes bacterianas resistentes às lisinas (Jado *et al.*, 2003; Fischetti, 2008; Daniel *et al.*, 2010).

É também importante salientar que a associação da lisina Cpl-1, isolada de bacteriófagos ativos contra *Pneumococcus sp*, com a gentamicina e a penicilina, demonstrou um sinergismo entre os diferentes agentes terapêuticos aplicados, provocando uma redução drástica do número daquela bactéria (Jado *et al.*, 2003; Fischetti, 2008; Daniel *et al.*, 2010).

### 2.6.3. Outras aplicações da terapia com lisinas

É também importante salientar que as lisinas podem beneficiar a saúde do animal, prevenir a disseminação de zoonoses e até mesmo evitar a transmissão de bactérias patogénicas presentes nos alimentos. Como exemplo, refere-se a Ply700, uma lisina com atividade lítica contra estreptococos, e a LysH5, que possui atividade lítica contra estafilococos, ambas com capacidade de inibir a proliferação de mastites bovinas e, desta forma, evitar contaminações do leite e queijos (Celia *et al.*, 2007; Obeso *et al.*, 2008; Fenton *et al.*, 2010).

Outra enzima fágica aplicada neste ramo é a lisina PlyC, que também pode funcionar como desinfetante específico, contra *Streptococcus equi*, uma bactéria responsável por provocar infeções em equinos, impedindo a transmissão e a disseminação desta bactéria. Adicionalmente, a PlyC demonstra ser vantajosa relativamente aos desinfetantes químicos, pois estes podem ser tóxicos para os animais, prejudiciais para o ambiente e perdem atividade muito rapidamente (Hoopes *et al.*, 2009; Fenton *et al.*, 2010).

Tal como já foi referido anteriormente, as lisinas também podem ser aplicadas na indústria alimentar, como acontece com a lisina Ply3626, que apresenta atividade lítica contra *Clostridium perfringens*, uma bactéria responsável por provocar intoxicações alimentares e elevados custos a nível mundial na produção de aves (Zimmer *et al.*, 2002; Fenton *et al.*, 2010).

Por fim, as lisinas podem ser aplicadas, com sucesso, como métodos de diagnósticos na pesquisa de determinadas bactérias, uma vez que os métodos atuais utilizados, por exemplo, na deteção de infeções provocadas por *Bacillus anthracis* em humanos, são lentos, o que dificulta o tratamento. Consequentemente, Schuch e colaboradores (2002) desenvolveram um método usando a lisina PlyG que, após a sua adição, degrada a parede bacteriana, libertando o ATP do bacilo, que é detetado por um sensor, fornecendo o diagnóstico ao fim de 15 minutos.

## **IV. Capítulo 3: Terapia com tubos peptídicos formadores de poros**

### **3.1. Tubos peptídicos formadores de poros (PAMs)**

Os tubos peptídicos formados de poros ou também conhecidos como péptidos antimicrobianos (PAMs) foram descobertos em 1922, quando Alexander Fleming e Frederick Ridley descobriram a lisozima, uma enzima com atividade antibacteriana que estava presente nas lágrimas e na urina dos seres humanos.

Atualmente, são conhecidos mais do que 1700 péptidos antimicrobianos (ver exemplos ilustrados na Tabela 2 em anexo) (Bruhn *et al.*, 2011; UNMC, 2013).

O aumento galopante das resistências bacterianas aos antibióticos e a possibilidade dos antibióticos perderem a sua eficácia no tratamento das infecções bacterianas nos próximos 5 anos, proporcionou um acréscimo exponencial do interesse, por parte dos investigadores e das indústrias farmacêuticas na aplicação dos PAMs como agentes terapêuticos (Seo *et al.*, 2012; Björn *et al.*, 2012; Carlet *et al.*, 2012b).

Os PAMs são polipéptidos endógenos formados por 12 a 50 aminoácidos, sintetizados por via ribossomal. Estes péptidos são ubíquos na natureza e apresentam geralmente uma estrutura catiónica (devido à presença de aminoácidos como a lisina e a cisteína que são indispensáveis para a ligação à membrana) e anfífilica, contendo um domínio hidrofóbico e um hidrofílico, indispensável para promover a disrupção da membrana celular da bactéria, como está ilustrado na Figura 12, em anexo. Os PAMs apresentam um espectro de ação alargado e constituem uma estratégia de defesa dos animais e plantas contra diversos tipos de bactérias, fungos e vírus (Zasloff, 2002; Baltzer e Brown, 2011; Fernebro, 2011; Laverty *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012).

Os PAMs apresentam diversas funções, tais como: i) estimular a acumulação de células imunitárias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) no local da infeção; ii) neutralizar endotoxinas lipopolissacarídicas produzidas por bactérias Gram-negativo; iii) acelerar a reparação de feridas; iv) estimular a angiogénese; v) controlar respostas geradas pelo sistema imune contra um determinado microrganismo, comportando-se como imunomoduladores e vi) possuir propriedades anti-inflamatórias. Adicionalmente, estes polipéptidos endógenos são ativos contra bactérias multirresistentes e o número de resistências das bactérias a este possível grupo terapêutico é tendencialmente reduzido,

devido ao processo de coevolução entre as bactérias e estes péptidos ao longo de milhões de anos, como também devido ao seu mecanismo de ação, o que os tornam numa possível estratégia alternativa aos antibióticos, promovendo o tratamento de infeções bacterianas a nível tópico e possivelmente a nível sistémico (Bruhn *et al.*, 2011; Laverty *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012).

Apesar da maioria dos péptidos antimicrobianos apresentar uma estrutura catiónica, existem alguns que apresentam uma estrutura aniónica, rica em ácidos aspártico e glutâmico, tais como, a maximina-H5 e a dermcidina que se encontram presentes no suor humano e funcionam como sistemas de defesa naturais do sistema imunitário das células eucarióticas. Este tipo de péptidos, tal como os catiónicos, também podem adotar conformações em  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$  - pregueada que lhes confere uma estrutura anfifílica, essencial para a interação com a membrana celular da bactéria. No entanto, os péptidos antimicrobianos aniónicos, como a daptomicina, ao contrário dos catiónicos, necessitam de catiões, como o zinco, que funcionam como cofatores, que são essenciais para que ocorra a ligação do péptido aniónico com a membrana celular também aniónica, e posteriormente a penetração na célula e consequente inibição da atividade da ribonuclease induzindo a morte celular (Laverty *et al.*, 2011).

### **3.2. Estruturas, propriedades e os vários mecanismos de ação dos PAMs**

Em termos estruturais os PAMs são péptidos compostos por menos de 100 aminoácidos codificados por genes individuais. São sintetizados pelo hospedeiro durante processos inflamatórios, ou pela presença de moléculas produzidas por agentes patogénicos presentes nos macrófagos, granulócitos, células glandulares e células epiteliais (Bruhn *et al.*, 2011).

Os PAMs subdividem-se em quatro grupos baseados na sua estrutura secundária e composição em aminoácidos: i) péptidos com uma estrutura em  $\alpha$ -hélice; ii) péptidos com uma estrutura em folha  $\beta$  - pregueada, estabilizada por duas ou três pontes dissulfeto; iii) péptidos lineares que apresentam uma estrutura desordenada em soluções hidrofílicas, mas em condições fisiológica e ambientes hidrofóbicos, após o contacto com a membrana, adquirem uma estrutura anfifílica, em  $\alpha$ -hélice e iv) péptidos em laço. Existem péptidos que não se enquadram dentro desta classificação, como os péptidos

com estrutura cíclica, ver Tabela 3, em anexo (Baltzer e Brown, 2011; Jaeyong *et al.*, 2012; Nakatsuji e Gallo, 2012; Seo *et al.*, 2012).

O tipo de estrutura dos PAMs encontra-se diretamente correlacionado com o seu tamanho, tipo de mecanismo de ação, hidrofobia e tipo de carga (Jaeyong *et al.*, 2012).

A estrutura anfifílica dos PAMs é uma característica chave essencial para o mecanismo de ação destes, sendo que a região hidrofóbica é responsável pela interação com os lípidos específicos presentes nas membranas celulares das bactérias, como os ácidos lipoteicóicos presentes nas bactérias Gram-positivo e os grupos fosfatos dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas Gram-negativo. A região hidrofílica do péptido é responsável pela interação com as cabeças dos fosfolípidos ou com o lúmen da membrana celular (Jenssen *et al.*, 2006).

É indispensável salientar que os PAMs não afetam as células eucarióticas porque a sua membrana celular é constituída por fostatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, colesterol e ergosterol, apresentando uma carga neutra, o que impede os PAMs de atuar, uma vez que são repelidos. Ao contrário das células eucarióticas, as células procarióticas, mais concretamente as bactérias, possuem uma membrana celular com carga negativa devido à presença de fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina, o que torna os PAMs específicos para a sua bicamada fosfolipídica. Este facto reduz exponencialmente possíveis efeitos tóxicos nas células do hospedeiro e ao mesmo tempo, contribui para a redução significativa de possíveis resistências a esta inovadora estratégia terapêutica (Jenssen *et al.*, 2006; Baltzer e Brown, 2011; Laverty *et al.*, 2011).

Relativamente ao mecanismo de ação dos PAMs estes promovem, de uma forma geral, a disrupção da membrana celular e consequente lise celular. Numa primeira fase, ocorre a interação electrostática entre o péptido com carga positiva e membrana celular com carga negativa. Posteriormente, a estrutura peptídica é inserida na bicamada fosfolipídica membranar e, de seguida, o péptido agrega-se levando à formação de uma estrutura complexa que promove a formação de poros na membrana e consequente lise celular. Existem 4 modelos distintos que explicam detalhadamente o mecanismo de ação de diferentes tipos de PAMs - ver Figura 13, em anexo (Jaeyong *et al.*, 2012).

No primeiro modelo, conhecido como modelo de agregação, o PAM liga-se ao fosfolípido por interações electrostáticas e, posteriormente é inserido na membrana promovendo a formação de complexos entre péptidos e lípidos, levando à formação de poros sem orientação específica, com diferentes tamanhos e formas, que induzem a depleção de íões, como está ilustrado na Figura 13A, em anexo.

No segundo modelo (ver Figura 13B, em anexo), conhecido como modelo do poro tiroidal, após a interação eletrostática inicial, o péptido reorienta-se perpendicularmente ao “plano” da membrana celular e a região hidrofílica interage com a estrutura fosfolípídica que possui carga negativa e a região hidrofóbica peptídica interage com o núcleo lipídico, levando à formação de um poro com uma orientação específica. Neste modelo, a membrana sofre uma invaginação com uma curvatura positiva, levando à formação de um pequeno orifício, mantido pelas repulsões eletrostáticas das cabeças dos fosfolípidos, no qual o péptido se encontra alinhado.

No terceiro modelo, ver Figura 13C, conhecido como “barrel-stave”, ocorre a formação de poros na membrana através de um empacotamento helicoidal, em que o péptido numa primeira fase liga-se à membrana por interações electrostáticas e, posteriormente, é inserido perpendicularmente na membrana. Seguidamente, a região hidrofóbica da estrutura peptídica liga-se ao lúmen da membrana da célula, formando a fração exterior do poro, e a porção hidrofílica do péptido forma a fração interna do poro. O tamanho do poro depende do número de péptidos agregados e das características lipídicas da membrana.

Por fim, o quarto modelo, conhecido como modelo “carpet”, que se encontra representado na Figura 13D, em anexo, refere que alguns PAMs agregam-se paralelamente à bicamada fosfolípídica, cobrindo o local, como um tapete. Quando o número de péptidos no local atinge uma dada concentração, ocorre um efeito emulsivo, que provoca a destabilização da membrana levando à formação de micelas e de poros na membrana (Jenssen *et al.*, 2006; Baltzer e Brown, 2011; Laverty *et al.*, 2011; Jaeyong *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2012).

É fundamental referir que nem todos os PAMs atuam apenas por disrupção da membrana celular e alguns promovem a morte da bactéria, sem atingir a concentração mínima eficaz, porque são acumulados a nível intracelular. Estes inibem a proliferação de processos essenciais à viabilidade celular, como: i) a replicação do DNA ou síntese

de RNA, quando é atingida a sua concentração mínima inibitória, como acontece com a buforina II, pleurocidina e a dermaseptina; ii) a síntese proteica pela indolicina e pelo PR-39; iii) o rearranjo proteico, a “pirrhocidin” liga-se à chaperona hsp70, e esta não se dispõe na sua conformação ativa, o que leva a uma acumulação de proteínas inativas e consequente morte celular; iv) a atividade de enzimas aniônicas citoplasmáticas por parte de alguns péptidos antimicrobianos com carga extremamente positiva e v) a transglicosilação do lípido II, um processo essencial à síntese do peptidoglicano pelos lantibióticos (nisina e mersacidina) (ver Figura 13 E;F;G;H em anexo) (Jenssen *et al.*, 2006; Baltzer e Brown, 2011; Laverty *et al.*, 2011; Jaeyong *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2012).

Recentemente, descobriu-se que a “papiliocin” induz a produção de radicais livres de oxigênio que são responsáveis pela danificação do DNA, da membrana celular e das mitocôndrias, induzindo a apoptose e consequente morte celular. Contudo, no contexto de uma infecção é provável que o PAM possua mais do que um mecanismo de ação em simultâneo (Jaeyong *et al.*, 2012).

### **3.3. Vantagens e desvantagens**

Em termos de vantagens da aplicação dos PAMs como agentes terapêuticos tem-se: i) o mecanismo de ação é desempenhado em componentes essenciais à viabilidade da bactéria que estão presentes na membrana celular; ii) diversos péptidos antimicrobianos apresentam simultaneamente atividade antibacteriana, antifúngica e antivírica e em casos de infecções por múltiplas entidades biológicas, apenas um agente terapêutico é eficaz; iii) demonstram atividade terapêutica em concentrações extremamente reduzidas, na ordem dos microgramas e nanogramas; iv) apresentam um espectro de ação alargado; v) estão disponíveis em elevadas concentrações no local de ação; vi) apresentam atividade anti-inflamatória; vii) a probabilidade do desenvolvimento de resistências a esta nova alternativa terapêutica é reduzida; viii) atuam muito rapidamente; ix) inibem a proliferação de biofilmes; x) interagem com células que se encontrem, ou não, em divisão celular; xi) demonstram sinergismo quando administrados em conjunto com antibióticos (Gordon e Romanowski, 2005; Bruhn *et al.*, 2011; Björn *et al.*, 2012; Devocelle, 2012; Seo *et al.*, 2012).

No entanto, os PAMs quando aplicados como agentes terapêuticos demonstram algumas desvantagens tais como: i) são suscetíveis à ação de proteases, perdendo facilmente atividade, o que pode constituir um fator de restrição quando se promove a administração deste grupo terapêutico a nível sistêmico; ii) podem ser citotóxicos para diversas células do hospedeiro quando administrados em elevadas concentrações, podendo destabilizar as membranas celulares e até mesmo fragmentá-las; iii) são influenciados por variações de pH, concentração de sais e de proteínas plasmáticas, perdendo a atividade em meios com baixas concentrações de sais ou ao interagir com proteínas plasmáticas; iv) apresentam elevados custos de produção e de purificação; v) podem produzir efeitos tóxicos a nível sistêmico e tópico; vi) podem induzir sensibilidade e alergias após várias aplicações; vii) ainda não estão bem estudados do ponto de vista farmacocinético, farmacodinâmico e a nível toxicológico; viii) apresentam reduzida estabilidade principalmente quando são constituídos por *L*-aminoácidos porque são mais suscetíveis à proteólise (Gordon e Romanowski, 2005; Bruhn *et al.*, 2011; Devocelle, 2012; Seo *et al.*, 2012; Slaninová *et al.*, 2012).

### 3.4. Resistências

Zasloff em 2002 referiu que as resistências bacterianas a esta inovadora estratégia terapêutica seriam improváveis, visto que os PAMs possuem como recetores, estruturas essenciais à viabilidade bacteriana. No entanto, um estudo efetuado por Kristian e co-autores (2003) revelou que o *Staphylococcus aureus*, devido a uma série de mutações provocadas no operão *dltABCD* induziu uma sobre expressão deste operão, o que tornou a bactéria capaz de neutralizar a carga negativa da sua própria membrana por incorporação de elevadas concentrações de *D*-alanina (processo de *D*-alanilação) e de *L*-lisina (quando a mutação ocorre no gene *mprF*). Esta mutação conduziu à redução da carga negativa da membrana, a qual é essencial para que decorra a interação eletrostática entre o PAM e a bactéria, o que resultou na repulsão do péptido antibacteriano e consequente resistência, como é possível observar-se na Figura 14A e Figura 14B, em anexo. É importante salientar que o mesmo acontece com as bactérias Gram-negativo, através da modificação dos LPS presentes na sua membrana externa, o que inclui incorporação de longas cadeias de ácidos gordos e consequentemente redução da permeabilidade da membrana aos PAMs e aumento da estabilidade da membrana.

As resistências aos péptidos antibacterianos, também se encontram diretamente correlacionadas com: i) a introdução de aminoarabinose nos grupos fosfato do lípido A (dímero aniónico de glucosamina ligado a uma cadeia de ácidos gordos rodeados por grupos fosfato) causado por mutação nos genes *pmrE* e *pmrHFIJKLM* das bactérias Gram-negativo, como é possível visualizar na Figura 14C, em anexo; ii) a acetilação no lípido A causada por mutação no gene *pagP* e no gene *htrB* que provoca uma diminuição da permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativo; iii) a mutação no gene *kasB*, que promove a síntese de ácidos micólicos de cadeia curta na sua membrana externa e reduz exponencialmente a sua permeabilidade aos PAMs; iv) a mutação no gene *emm1* que estimula a produção da proteína M1 que se encontra na parede celular bacteriana e liga-se ao PAM, impedindo que este promova o seu mecanismo de ação, ver Figura 15A, em anexo; v) a produção de proteases extracelulares que sintetizam sulfato de dermatano, um glicosaminoglicano que bloqueia o mecanismo de ação das  $\alpha$ -defensinas, como acontece com o *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, ver Figura 15B em anexo; vi) a síntese de proteínas que neutralizam ou apenas se ligam ao PAM impedindo que este atue e ao mesmo tempo impede que seja atingida a concentração mínima para exercer ação bactericida, como por exemplo a estafiloquinase do *Staphylococcus aureus* que se liga às  $\alpha$ -defensinas (PAM produzida pelos neutrófilos humanos) do organismo impedindo que estas atuem, ver Figura 15C, em anexo; vii) a presença de bombas de efluxo que expulsam os péptidos para a periferia das membranas, impedindo que estes possam atuar, tendo-se como exemplo a bomba de efluxo *mtrCDE* sintetizada pela *Neisseria gonorrhoeae*, ver Figura 16A, em anexo; viii) a síntese de proteases que clivam os PAMs a nível extracelular, promovendo a sua desnaturação, como acontece com a aureolisina, uma metaloprotease, sintetizada por *Staphylococcus aureus* que inativa a LL-37, ver figura 16B, em anexo e vii) a formação de biofilmes que reduzem o contacto entre os PAMs e a bactéria, impedindo que estes atuem (Nizet, 2006; Baltzer e Brown, 2011; Lavery *et al.*, 2011).

### 3.5. Aplicações

Existem inúmeros fatores que tornam os tubos peptídicos formadores de poros numa estratégia alternativa aos antibióticos, novel e inovadora, podendo ser aplicados como

agentes terapêuticos: i) de forma isolada, funcionando como agentes anti-infecciosos; ii) com diversos antibióticos convencionais, ou até mesmo antivirais, podendo verificar-se efeitos sinérgicos entre ambos; iii) como imunomoduladores, estimulando o sistema imunitário; iv) como endotoxinas que neutralizam as bactérias e previnem, por exemplo, choques sépticos a nível sistémico (Gordon e Romanowski, 2005; Baltzer e Brown, 2011; Kosciuczuk *et al.*, 2012).

Apesar das suas inúmeras vantagens e de se estabelecerem como uma nova estratégia terapêutica alternativa aos antibióticos, poucos são os PAMs que foram aceites até hoje pela FDA e pela EMEA.

A aplicação de PAMs, neste momento, restringe-se apenas a formulações de aplicação cutânea. Para se obter o efeito terapêutico pretendido em ensaios clínicos “in vivo” são necessárias elevadas concentrações de PAMs no local de infeção, sendo esta concentração muita próxima das doses tóxicas e, adicionalmente, como os PAMs apresentam um tamanho reduzido são logo filtrados a nível renal, reduzindo exponencialmente o seu tempo de semivida (Giuliani *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011; Yeung *et al.*, 2011).

O primeiro PAM a ser desenvolvido foi o “pexiganan”, um análogo sintético da magainina 2 (obtida do *Xenopus laevis*), constituída por 22 aminoácidos que foi veiculado sob a forma de um creme de aplicação tópica, denominado Locilex™, com a finalidade de tratar úlceras dos pés em diabéticos, contudo, não foi aprovado pela FDA pela falta de eficácia nos ensaios clínicos de fase II (Giuliani *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011).

Atualmente, são vários os péptidos antimicrobianos que se encontram em ensaios pré-clínicos e clínicos e que demonstram diversas atividades terapêuticas, tais como: i) o MBI-226 (omiganana) um péptido catiónico, análogo sintético da indolicina, que apresenta um espectro de ação alargado, utilizada no tratamento de infeções sanguíneas provocadas pelo cateter; ii) o XOMA 629 e o Migenix MX-226 utilizadas no tratamento do acne, sendo ativas contra *Propionibacterium acnes*; iii) o Migenix MX-226, a qual apresenta atividade anti-inflamatória, porque suprime a libertação de citocinas pelo organismo, estimuladas pela presença desta bactéria a nível cutâneo; iv) o iseganana (IB-367), um péptido antimicrobiano catiónico sintético que possui um espectro de ação alargado contra bactérias e fungos, utilizada no tratamento de infeções respiratórias,

fibrose cística e úlceras bucais; v) o P113, um péptido catiónico formado por 12 aminoácidos presente na saliva, demonstrou elevada atividade terapêutica “in vitro” contra *Candida albicans*, podendo ser utilizada no tratamento de candidíases orais em indivíduos infetados com HIV; vi) o péptido DPK-600, que se encontra em ensaios clínicos de fase IIa para o tratamento de dermatite atópica; vii) a plectasina, o primeiro PAM obtido de um fungo, o *Pseudoplectania nigrella*, sendo ativa contra *Streptococcus pneumoniae* (McInturff *et al.*, 2005; Mygind *et al.*, 2005; Fernebro, 2011; Brandenburg *et al.*, 2012).

Presentemente, os tubos péptidos formadores de poros aceites pela FDA e comercializados são as polimixinas B e E (colistina) e a daptomicina. A daptomicina é um lipopéptido aniónico (péptido associado uma estrutura lipídica que lhe confere atividade terapêutica contra bactérias e fungos), produzido naturalmente por *Streptomyces roseosporus*. É utilizada no tratamento de infeções da pele e mucosas provocadas exclusivamente por bactérias Gram-positivo. Atualmente, foi demonstrado que a daptomicina pode ser aplicada no tratamento de infeções provocadas por estafilococos e em endocardites provocadas por enterecocos e estafilococos e, no Reino Unido, já é comercializada como uma formulação injetável denominada Cubicin® (Livermore, 2008; Yeung *et al.*, 2011; Lavery *et al.*, 2011; Brandenburg *et al.*, 2012).

Já as polimixinas B e E são lipopéptidos catiónicos, descobertos entre 1940 e 1950, isoladas de *Bacillus polymyxa* e apresentam uma estrutura cíclica associada a um componente lipídico na porção N-terminal, responsável por lhe atribuir atividade terapêutica. Estes péptidos catiónicos encontram-se no interior de fagócitos e à superfície de diversos epitélios do organismo, atuando como mecanismo de defesa natural. Já se encontram disponíveis no mercado diversas formulações contendo estes lipopéptidos. Estas formulações estão indicadas no tratamento de infeções a nível cutâneo e ocular provocadas por bactérias Gram-negativo. A polimixina E, ou também denominada colistina, também pode ser administrada parenteralmente sob a forma de metanossulfonato de colistina, um pro-fármaco, estando indicada no tratamento de septicémias, de fibrose cística, de infeções cutâneas, urinárias e respiratórias provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 2005; Cirioni *et al.*, 2007; Yeung *et al.*, 2011; Lavery *et al.*, 2011; Brandenburg *et al.*, 2012).

A título de curiosidade, em 2011, foi descoberto por Yan e co-autores, também no veneno de escorpião, o Hp1090, um péptido com uma estrutura anfifílica em  $\alpha$ -hélice, que apresenta atividade contra o vírus da hepatite C (HCV). Este vírus é o principal responsável por causar hepatites de carácter crónico, ao qual está associada cirrose e carcinoma hepatocelular, não existindo cura, nem vacina. Desta forma, o Hp1090 surge como uma potencial estratégia terapêutica pois inibe a replicação do RNA do HCV e previne a infeção por este vírus, interagindo diretamente com a sua membrana, danificando-a, numa concentração inibitória em 50 % (CI<sub>50</sub>) de 7,62  $\mu$ g/ml (5,0  $\mu$ M).

Atualmente, foi isolado do veneno do escorpião *Mesobuthus martensii* o BmKn2, um péptido que apresenta atividade antibacteriana, sendo posteriormente obtido a partir deste, um péptido mutante denominado Kn2-7, que demonstra maior atividade terapêutica e reduzido efeito hemolítico, comparativamente com o péptido isolado diretamente do escorpião, uma vez que, devido à substituição de aminoácidos a nível da sua porção hidrofílica, possui uma carga positiva superior, o que facilita as interações electrostáticas entre o péptido e a parede da bactéria (Cao *et al.*, 2012).

A aplicação tópica de uma formulação contendo Kn2-7 num rato infetado com *Staphylococcus aureus* promoveu à cura da infeção cutânea ao fim de 4 dias, como está ilustrado na Figura 17, em anexo, indicando que este é um potencial agente terapêutico a nível externo. Adicionalmente, verificou-se que o Kn2-7 é ativo contra diversas bactérias Gram-positivo e Gram-negativo e até mesmo contra bactérias multirresistentes - ver Tabela 4, em anexo (Cao *et al.*, 2012). Segundo os dados referidos nesta tabela, o Kn2-7 demonstra maior atividade terapêutica relativamente ao BmKn2 e a concentração mínima inibitória de Kn2-7 a ser utilizada no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativo é muito superior relativamente às provocadas por bactérias Gram-positivo.

Adicionalmente, segundo Chen e co-autores (2012), o péptido Kn2-7, também demonstrou ser o péptido com maior atividade anti-HIV-1 com uma concentração máxima eficaz em 50% (CE<sub>50</sub>) de 2,76  $\mu$ g/ml, apresentando um elevado tropismo viral e inibindo eficazmente a sua replicação, não estando, no entanto, o seu mecanismo de ação ainda clarificado, o que demonstra que os PAMs também possuem atividade anti-viral.

Os PAMs catiónicos podem ainda ser aplicados no tratamento de células tumorais, visto que este tipo de células apresenta na porção externa da membrana celular elevadas concentrações de fosfatidilserina e mucinas glicosiladas (3 a 7 vezes mais do que as células normais), o que lhes confere uma carga de superfície negativa, tornando-as num potencial alvo para os PAMs catiónicos.

Estes ligam-se às células tumorais por interações eletrostáticas e induzem a formação de poros na membrana, promovendo a libertação de eletrólitos e consequente morte celular. Alguns péptidos catiónicos podem induzir a apoptose por estimulação da síntese de espécies reativas de oxigénio, tais como, peróxido de hidrogénio, radicais hidroxilo e aniões superóxido, que se acumulam a nível intracelular. Seguidamente, os péptidos promovem alterações a nível mitocondrial, despolarização da membrana, libertação de citocromo *c*, que induz a ativação de cascatas de caspases que induzem alterações no DNA e núcleo e consequente alteração da morfologia da célula e morte celular. Tem-se como exemplos: i) a cecropina B isolada de *Hyalophora cecropia*, que demonstra atividade antitumoral e antiproliferativa em células tumorais presentes na bexiga, não afetando os fibroblastos (controlo) após administração de 65 µM do péptido, como está ilustrado na Figura 18, em anexo; ii) o LL-37, que se encontra presente nos grânulos dos neutrófilos, envolvida nos mecanismos de imunidade inata e com atividade imunomoduladora e anti-infecciosa; iii) a lactoferrina bovina, uma glicoproteína transportadora de ferro que inibe a proliferação das células tumorais mamárias MDA-MB-435 e das células tumorais THP-1, envolvidas na leucemia monocítica (Suttman *et al.*, 2008; Jaeyong *et al.*, 2012).

É indispensável salientar que os PAMs, também podem ser aplicados na prevenção de biofilmes. Estes são comunidades biológicas, onde as bactérias se encontram envolvidas por matrizes poliméricas, ligadas por forças de van der Waals, que favorecem as relações simbióticas, reduzem a suscetibilidade das bactérias a ambientes com condições adversas e à exposição aos antibióticos.

O péptido catiónico LL-37, para além de ser aplicado no tratamento de células tumorais, é capaz de inibir a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* numa concentração de 0,5 µg/mL, como está ilustrado na Figura 19, em anexo (Overhage *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2010).

### 3.5.1. Sinergismo dos PAMs com os antibióticos

Os PAMs podem ser associados aos antibióticos, atuando como uma terapia combinada entre ambas as estratégias terapêuticas. Este sinergismo deve-se ao facto deste inovador grupo terapêutico provocar uma disrupção na membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade da mesma aos antibióticos e consequentemente facilitando a penetração e a acumulação destes a nível intracelular. A título exemplificativo, refere-se o sinergismo estabelecido entra a magainina II e a cecropina A quando administradas associadas à rifampicina, reduzindo substancialmente o número de diversas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, tanto em ensaios “in vitro”, como também “in vivo” (Baltzer e Brown, 2011; Park *et al.*, 2011).

Outro estudo revelou que o péptido catiónico P5, administrado conjuntamente com a isepamicina promoveu a disrupção da membrana da bactéria, o que facilitou a penetração do antibiótico para o meio intracelular e consequente inibição da síntese proteica, tornando certas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, que outrora eram resistentes à isepamicina, novamente sensíveis a este antibiótico aminoglicosídeo (Cirioni *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2010; Baltzer e Brown, 2011; Park *et al.*, 2011).

Para ultrapassar os problemas e as desvantagens associados aos PAMs, hoje em dia têm sido propostos diversos métodos, nomeadamente: i) introdução nas extremidades dos PAMs novas cadeias de aminoácidos ou na sua região terminal grupos amina ou acetil, com o intuito de aumentar a estabilidade do péptido à ação das proteases; ii) veiculação de PAMs em lipossomas, que se encontram revestidos com anticorpos, garantindo que estes apenas se acumulam exclusivamente no local de ação pretendido, reduzindo, consequentemente, os efeitos adversos e a toxicidade a nível sistémico; iii) síntese, através da engenharia genética, de PAMs com elevada atividade antimicrobiana, a custo reduzido e de síntese simples, como acontece com o P-113, ativo contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, e *Candida tropicalis* e o hLF1-11 (lactoferrina humana 1-11) ativo contra MRSA, *Acinetobacter baumannii* multirresistentes e *Candida albicans* (Gordon e Romanowski, 2005; McPhee *et al.*, 2005; Samad *et al.*, 2007; Lavery *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012; Yount e Yeaman, 2012).

## V. Capítulo 4: Terapia com bacteriocinas

### 4.1. Bacteriocinas

Em 1925 foi descoberta a primeira bacteriocina por André Gratia, ficando conhecida como colicina V. Este investigador reparou que este composto antimicrobiano, produzido por uma estirpe de *Escherichia coli* V (“verotoxin-producing strain”, ou seja virulenta), impedia o crescimento de outras estirpes de *Escherichia coli* (Gillor *et al.*, 2005; Nishie *et al.*, 2012).

As bacteriocinas são considerados um subgrupo dos PAMs, que se encontram codificados no DNA ribossomal, ou em plasmídeos. São produzidas pelos ribossomas bacterianos e inibem o crescimento de bactérias da mesma espécie, ou do mesmo género.

Como as bacteriocinas se estabelecem como uma estratégia de defesa altamente específica e comum contra bactérias, eliminando potenciais oponentes e aumentando o número de nutrientes disponíveis no meio ambiente para o seu próprio crescimento, e dado existirem diversos tipos estruturais e, conseqüentemente, diferentes mecanismos de ação e diversas aplicações terapêuticas, decidiu-se, neste trabalho de conclusão de ciclo, desenvolver-se um capítulo dedicado exclusivamente a este subgrupo dos PAMs (Lee e Kim, 2011).

As bacteriocinas também podem ser sintetizadas por bactérias Gram-negativo e as mais conhecidas e estudadas são as colicinas e as microcinas, que são produzidas por *Escherichia coli* e inibem o crescimento de bactérias Gram-negativo como, *Aeromonas sp*, *Escherichia sp*, *Salmonella sp*, *Yersinia sp* e *Pseudomonas sp*. Já a nível das bactérias Gram-positivo, estas caracterizam-se por produzir, por exemplo, a nisina A e a subtilina, não sendo ativas contra bactérias Gram-negativo devido à presença da membrana externa nestas bactérias. Na Tabela 5, em anexo, é possível visualizar diversos exemplos e aplicações de vários tipos de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativo e Gram-positivo (Duquesne *et al.*, 2007; Papagianni e Anastasiadou, 2009; Lee e Kim, 2011).

Na atualidade já se encontra disponível a Bactibase uma base de dados de acesso livre, contendo mais de 200 bacteriocinas, que permite organizar toda a informação relativa aos vários tipos de bacteriocinas produzidas por diferentes bactérias. Esta base de dados

possui como finalidade, otimizar a aplicação das bacteriocinas na indústria alimentar como bioconservantes, aumentando a segurança dos alimentos, como também auxilia os investigadores no desenvolvimento de novas bacteriocinas ou novos fármacos com aplicação na medicina (Hammami *et al.*, 2010).

#### **4.2. Classificação das bacteriocinas**

A classificação das bacteriocinas encontra-se atualmente em processo de revisão, no entanto, estas são classificadas em quatro classes, como é possível visualizar nas Tabela 6, em anexo, tendo em conta: i) a estrutura química; ii) a massa molecular; iii) o mecanismo de ação; iv) a sensibilidade para um dado recetor e v) o conteúdo em aminoácidos modificados (Cotter *et al.* 2005; Oppegard *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas (BAL) denominam-se lantibióticos sendo que se encontram divididas pelas classes I e II e ambas apresentam um peso molecular reduzido de 3 a 10 kDa. Adicionalmente, apresentam estruturas catiónicas e anfifílicas. Na classe I encontram-se os lantibióticos formados por pequenos péptidos, contendo 19 a 38 aminoácidos e resíduos de aminoácidos modificados, nomeadamente a 3-metil-lantionina, a lantionina e os aminoácidos desidratados, os quais foram introduzidos por modificação enzimática após o processo de tradução, conferindo aos lantibióticos estabilidade ao calor, às variações de pH, à proteólise e à oxidação (Rajaram *et al.*, 2010; Lee e Kim, 2011; Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Os lantibióticos também podem ser classificados segundo a via de maturação dos péptidos, surgindo os lantibióticos tipo A (I) que sofrem maturação enzimática pelas enzimas LanB e LanC e os da classe II, os quais são constituídos pelos tipos A (II) e B, que são modificados pela enzima LanM (Rajaram *et al.*, 2010; Lee e Kim, 2011; Nishie *et al.*, 2012).

As bacteriocinas da classe II, ao contrário dos lantibióticos, não sofrem modificações após a sua tradução, logo não possuem sequências de aminoácidos modificadas e, devido à sua natureza heterogénea, o processo de divisão torna-se ainda mais complexo,

o que conduziu à elaboração de diversos tipos de classificações (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Rajaram *et al.*, 2010; Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

A classe II encontra-se dividida em quatro grupos: i) a classe IIa, constituída por pediocinas (péptidos ativos contra *Listeria monocytogenes* que possuem a região N-terminal YGNGVXC e são produzidas por *Pediococcus sp* e *Lactobacillus plantarum*); ii) a classe IIb, formada por bacteriocinas dipeptídicas, ou seja, possuem dois péptidos que não foram modificados por atividade enzimática e que são responsáveis pela atividade da bacteriocina, tais como a ABP-118 e as lactococinas G e Q; iii) a classe IIc, constituída por bacteriocinas formadas por péptidos cíclicos contendo um domínio N e C-terminal ligados covalentemente por uma ligação peptídica e com reduzido teor em resíduos de cisteína essencial para garantir a atividade antibacteriana do péptido (a título de exemplo, apresentam-se a gassericina A, a uberolisina, e a lactociclina Q) e iv) por fim, existe a classe IId que engloba todas as bacteriocinas que não se enquadram nos domínios anteriores, sendo por isso bastante diversificada, como por exemplo a divergina A e as “Leaderless bacteriocins”, como a enterocina L50 e aureocina A70, que não possuem uma sequência N-terminal (Cotter *et al.*, 2005; Jeevaratnam *et al.*, 2005; Zendo *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Papagianni e Anastasiadou, 2009; Rajaram *et al.*, 2010; Lee e Kim, 2011; Nishie *et al.*, 2012). Ver em anexo, a Figura 20 com diversos exemplos das estruturas de bacteriocinas das classes I e II.

A classe III inclui bacteriocinas formadas por proteínas termosensíveis de elevada massa molecular (superior a 30 kDa), que apresentam um mecanismo de ação diferente das outras bacteriocinas. Devido ao carácter lítico, este tipo passou a denominar-se de bacteriolisinas. Finalmente, a classe IV das bacteriocinas constitui um grupo complexo de proteínas que se encontram, em muitas das situações, associadas a lípidos e hidratos de carbono, que são essenciais à sua atividade (Cotter *et al.*, 2005; Jeevaratnam *et al.*, 2005; Papagianni e Anastasiadou, 2009; Rajaram *et al.*, 2010; Lee e Kim, 2011; Lohans e Vederas, 2012).

#### **4.3. Estrutura e mecanismo de ação das bacteriocinas**

As bacteriocinas são geralmente constituídas por um domínio C-terminal, responsável pela formação de poros, um domínio N-terminal, necessário para a ligação ao recetor

presente na bactéria que inicialmente possui um péptido líder que mantém a bacteriocina inativa e impede que esta atue contra a própria bactéria. O péptido líder é posteriormente clivado por enzimas como a protease LanP nos lantibióticos de classe I e pela LanT nos de classe II, ativando a bacteriocina no meio intracelular. Posteriormente, a bacteriocina é transportada para o meio extracelular por proteínas específicas (Cotter *et al.* 2005; Oppegard *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012).

Devido à sua diversidade estrutural, as bacteriocinas, apresentam diferentes mecanismos de ação e, em muitas situações, apenas um tipo de bacteriocina dispõe de mais do que um tipo de mecanismo de ação, podendo atuar em diferentes funções celulares como por exemplo, a nível da transcrição, da tradução, da replicação e na membrana celular (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Lee e Kim, 2011).

A maioria das bacteriocinas atua através da formação de poros nas membranas celulares, o que afeta a sua integridade, levando ao colapso da bicamada fosfolipídica e consequente morte celular (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Nishie *et al.*, 2012).

No caso dos lantibióticos catiónicos de classe I, como a nisina, estes ligam-se electrostaticamente à membrana fosfolipídica da bactéria, o que favorece as interações entre a membrana e a região N-terminal. Esta região estabelece uma ligação com o pirofosfato do lípido II existente na membrana celular, o que inibe a síntese do peptidoglicano e provoca um aumento da permeabilidade celular e, consequentemente, a formação de poros na membrana, desencadeando um efluxo dos iões cálcio e magnésio. Estes catiões neutralizam a carga negativa dos fosfolípidos, e de moléculas intercelulares de baixo peso molecular, desencadeando o colapso da bicamada fosfolipídica, seguida de morte celular. Devido à elevada especificidade da nisina para o lípido II, esta exerce ação terapêutica em concentrações na ordem dos nanogramas. É importante referir que mutações a nível da região N-terminal podem inativar o processo, pois esta é uma região indispensável para o mesmo - ver mecanismo de ação da nisina na Figura 21A, em anexo (Fernández *et al.*, 2008; Lee e Kim, 2011; Nishie *et al.*, 2012).

Já no caso da, lacticina 3147, como apresenta uma estrutura dipeptídica, apresenta um mecanismo de ação distinto do anterior. Esta bacteriocina é constituída pelo péptido LtnA1 e o LtnA2 que atuam sinergicamente, sendo que o LtnA1 reconhece e interage com o lípido II presente na membrana celular, formando um complexo dimérico, ao qual se liga posteriormente o LtnA2 produzindo um complexo trimérico, com

capacidade de inibir a síntese do peptidoglicano e promover a formação de poros na membrana celular. Posteriormente, ocorre a perda de íons e ATP, provocando a morte da bactéria, como se pode visualizar na Figura 21B, em anexo (Nishie *et al.*, 2012).

As bacteriocinas da classe IIa, como a pediocina PA-1/AcH, promovem a morte celular também pela formação de poros na membrana mas através de um mecanismo distinto dos que foram referidos anteriormente. Estas bacteriocinas, como são catiónicas, numa primeira fase promovem a atração eletrostática com a membrana celular reconhecendo a manose fosfotransferase ou Man-PTS (complexo proteico que transporta hidratos de carbono e que se encontra presente nas membranas dos organismos susceptíveis a esta gama de bacteriocinas), como recetor. De seguida, o seu domínio C-terminal anfifílico em forma de  $\alpha$ -hélice é inserido na membrana celular, induzindo a formação de poros hidrofílicos, afetando a força motriz protónica da membrana, provocando uma depleção de ATP e consequente morte celular (Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2010; Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Já na classe IIb encontram-se, por exemplo, a lactococina G (péptido G $\alpha$  e péptido G $\beta$ ) e Q (péptido Q $\alpha$  e péptido Q $\beta$  produzidos por *Lactococcus lactis*). Ambas as bacteriocinas são formadas por dois péptidos diferentes que atuam sinergicamente e em proporções equimoleculares de forma a garantir atividade antibacteriana. Esta classe de bacteriocinas aumenta a permeabilidade da membrana celular, promovendo a depleção de catiões, como o cálcio e magnésio, de ATP e de fosfatos que são essenciais à viabilidade celular (Zendo *et al.*, 2006; Nishie *et al.*, 2012).

Já as bacteriocinas de classe IIc, são compostos cíclicos e os seus terminais C e N encontram-se ligados covalentemente. No entanto, apesar das várias diferenças estruturais relativamente às bacteriocinas de classe IIb, apresentam o mesmo mecanismo de ação. Algumas bacteriocinas desta classe, como a enterocina AS-48, a gassericina A, a subtilosina A e a carnociclina A, podem exercer o seu mecanismo de ação sem a presença de recetores na membrana celular da bactéria (Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Nishie *et al.*, 2012).

Por fim, as bacteriocinas do tipo IId apresentam diversos tipos de estruturas e, consequentemente, diversos mecanismos de ação. Contudo, a lactococina A e B apresentam o mesmo mecanismo de ação que as bacteriocinas de classe IIa (pediocina PA-1, ou a pediocina AcH), mas nesta situação, ao contrário das pediocinas que apenas

necessitam da porção IIC da Man-PTS para ter atividade, esta requer a porção IIC e IID para a reconhecer como recetor e iniciar o mecanismo, como está demonstrado na Figura 21C, em anexo (Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Nishie *et al.*, 2012).

#### **4.4. Resistência bacteriana às bacteriocinas e toxicidade**

Já existem inúmeros relatos de resistências às bacteriocinas, sendo que alguns estudos revelam que o mecanismo de resistência das bactérias à nisina e às bacteriocinas de classe IIa está correlacionado com o aumento da rigidez da membrana, o que impede a inserção da bacteriocina, e pela neutralização da sua carga de superfície, o que aumenta a capacidade da bactéria repelir os péptidos antimicrobianos catiónicos. Este mecanismo pode estar relacionado com mutações a nível do DNA bacteriano.

A título exemplificativo, uma mutação no fator sigma B, ou SigB, um mediador envolvido na resposta da bactéria a condições ambientais adversas é responsável por tornar a *Listeria monocytogenes* (agente etiológico responsável por causar listeriose, uma infeção oportunista de origem alimentar, que afeta principalmente indivíduos imunodeprimidos e grávidas) tolerante à nisina A e lacticina 3147 (Begley *et al.*, 2006).

O sistema VirRS que regula a expressão do operão *dltA* (os produtos deste neutralizam, por esterificação com *D*-alanina, os polímeros polianiónicos do ácido teicóico das bactérias Gram-positivo, o que aumenta a capacidade destes agentes repelirem os péptidos antimicrobianos catiónicos) e da *MprF* (é uma proteína membranar de grandes dimensões, presente em bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, que protege a bactéria contra os péptidos antimicrobianos, reduzindo a carga negativa da membrana celular por adição do aminoácido *L*-lisina ao fosfatidilglicerol, causando resistência aos péptidos antibacterianos catiónicos) na *Listeria monocytogenes* e é responsável pela redução da suscetibilidade desta bactéria aos péptidos antibacterianos catiónicos. Todavia, este sistema pode ser inibido através da *D*-alanilacil-sulfamoil-adenosina que bloqueia a *D*-alanil ligase, impedindo a neutralização da membrana e conseqüentemente ao aumento da suscetibilidade da *Listeria monocytogenes* aos péptidos antibacterianos catiónicos incluindo a nisina (Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Porém, a nível das bacteriocinas de classe IIa, os mecanismos de resistência, estão também correlacionados com outros dois, envolvendo a Man-PTS da *Listeria*

*monocytogenes* e do *Lactococcus lactis*. No primeiro mecanismo, devido a uma mutação, ocorre uma diminuição da expressão do gene da Man-PTS, conduzindo a uma diminuição do número de recetores na membrana celular bacteriana e a consequente resistência da bactéria a esta classe de bacteriocinas. O segundo mecanismo de resistência envolve níveis de expressão deste gene relativamente normais, tanto a nível de bactérias com resistentes e bactérias sensíveis, o que sugere que a resistência a esta classe de bacteriocinas também está correlacionado com alterações na composição da superfície da membrana (Gravesen *et al.*, 2002; Vadyvaloo *et al.*, 2002; Vadyvaloo *et al.*, 2004; Tessema *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2011; Lohans e Vederas, 2012).

## **4.5. Aplicação das bacteriocinas**

### **4.5.1. Aplicação das bacteriocinas como bioconservantes**

É indispensável salientar que as bacteriocinas, como a nisina e a pediocina PA-1, são amplamente utilizadas na indústria alimentar porque inibem o crescimento de determinadas bactérias que infetam os alimentos, tais como o *Clostridium botulinum*, o *Enterococcus faecalis*, a *Listeria monocytogenes*, o *Staphylococcus aureus*, entre outras (Settanni e Corsetti, 2008).

As bacteriocinas mais aplicadas na indústria alimentar são as bactérias ácido-lácticas, conhecidas como as BAL, tal como já foi referido anteriormente. Estas bactérias podem ser encontradas em produtos como o queijo, iogurtes e outros alimentos de origem fermentativa. Presentemente, os lantibióticos são considerados pela FDA substâncias GRAS pois, como são péptidos, são facilmente metabolizados a aminoácidos pelas proteases presentes no trato gastrointestinal. É de realçar que as bacteriocinas produzidas pelas BAL, não possuem qualquer sabor, ou odores, apresentam elevada estabilidade e possuem um espectro de ação altamente reduzido e extremamente específico para uma dada bactéria, o que é altamente vantajoso para a sua aplicação nos alimentos (Jeevaratnam *et al.*, 2005; De Vuyst e Leroy, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Papagianni e Anastasiadou, 2009; Rajaram *et al.*, 2010; Lee e Kim, 2011; Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Algumas espécies específicas das BAL possuem propriedades que lhes permite tratar infeções a nível gastrointestinal provocadas por *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* e

*Salmonella* (Jeevaratnam *et al.*, 2005; De Vuyst e Leroy, 2007; Duquesne *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012).

#### **4.5.2. Aplicação das bacteriocinas como agentes terapêuticos**

Para além de serem extensivamente aplicados como bioconservantes na indústria alimentar, alguns lantibióticos como a nisina A e F, a mersacidina, a mutacina 1140, a lactacina 3147 e a pediocina AcH/PA-1 demonstraram ser ativos contra alguns MRSA e enterococos resistentes à vancomicina (ERV) estabelecendo-se como uma possível estratégia terapêutica no combate às bactérias multirresistentes e infeções bacterianas. As bacteriocinas, como possuem um espectro de ação extremamente restrito, podem ser aplicadas no tratamento específico de determinadas infeções bacterianas (Sang e Blecha, 2008; Papagianni e Anastasiadou, 2009; Collins *et al.*, 2010; Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012; Lohans e Vederas, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

Um estudo científico, revelou que a nisina F ao ser injetada em ratos infetados com *Staphylococcus aureus* inibe o crescimento da bactéria em, pelos menos, 15 minutos (Brand *et al.*, 2010).

Um outro estudo mostrou que a nisina A é uma alternativa eficiente aos antibióticos no tratamento de mastites causadas por estafilococos. Neste trabalho, as oito mulheres com mastites provocadas por *Staphylococcus aureus* foram divididas aleatoriamente em dois grupos. A um deles foi administrada uma solução contendo 6 µg/ml de nisina A, no mamilo e na aréola mamária, por um período de duas semanas. No segundo grupo, o controlo, foi administrada uma solução idêntica à anterior mas isenta de nisina. Segundo este estudo, no dia 0 o número de bactérias, em UFC/ml, presentes no leite das mulheres de ambos os grupos era similar, mas ao fim de 14 dias de tratamento, o grupo que recebeu a solução contendo nisina A evidenciou uma redução significativa do número de bactérias presentes no leite e as respetivas mulheres em análise encontravam-se isentas de sinais de infeção (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2008; Nishie *et al.*, 2012).

Adicionalmente, segundo Kruszewska e colaboradores (2004), a mersacidina produzida por *Bacillus sp* é ativa contra várias estirpes de MRSA, eliminando estas bactérias que se encontravam colonizadas na mucosa nasal do rato.

Outro estudo realizado “in vivo” com a pediocina PA-1, administrada por via oral não afetou a microflora gastrointestinal dos ratos estudados, o que não acontece com os antibióticos químicos convencionais, como a penicilina e a tetraciclina (Le Blay *et al.*, 2007; Lohans e Vederas, 2012).

As bacteriocinas são estruturas peptídicas e a sua via de administração pode encontrar-se condicionada visto que são agentes imunogénicos, ou seja podem desencadear uma resposta imunitária. Porém, foi elaborado um estudo onde se administrou pediocina AcH intraperitonealmente em ratos e não foi observada qualquer produção de anticorpos contra esta bacteriocina, o que demonstra ser aparentemente não imunogénica e isenta de efeitos adversos (Lohans e Vederas, 2012).

Segundo outros dois trabalhos desenvolvidos também em ratos, a administração intravenosa de piscicolina 126 e diversina RV41 (ambas bacteriocinas de classe IIa) demonstrou ser eficiente 15 minutos antes e 30 minutos após a infeção dos ratos por *Listeria monocytogenes*, o que leva a concluir que esta classe de bacteriocinas também demonstra atividade terapêutica (Ramaswamy *et al.*, 2007; Bernbom *et al.*, 2009; Lohans e Vederas, 2012).

Presentemente, foi descoberta uma bacteriocina produzida por *Brevibacillus sp* GI-9, denominada de laterosporulina. Esta foi purificada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa e apresenta uma massa molecular de 5,6 kDa e uma sequência N-terminal estável a elevadas temperaturas (até 120 °C), tolerante a variações de pH (entre 2 e 10) e exposição a diversas proteases, não afetando a sua atividade antibacteriana. Adicionalmente, a laterosporulina apresenta um espectro de ação alargado, sendo ativa contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo inibindo o crescimento de bactérias como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*. Esta bacteriocina apresenta uma concentração mínima inibitória de 500 µg/ml e os resultados são visíveis ao fim 4 horas de exposição, levando a *Escherichia coli* a apresentar modificações na sua forma e morfologia, acumulação de restos celulares e células lisadas na preparação, como é possível observar na Figura 22, em anexo. Desta forma a laterosporulina estabelece-se como uma bacteriocina de espectro alargado, com possíveis aplicações no tratamento de diversas infeções bacterianas (Singh *et al.*, 2012).

Apesar das bacteriocinas serem uma excelente alternativa terapêutica aos antibióticos, a indústria farmacêutica continua relutante em financiar a investigação e a produção de preparações contendo bacteriocinas devido: i) à baixa taxa de produção obtida através de processos fermentativos; ii) à obtenção de produtos instáveis; iii) aos processos de purificação “downstream”, os quais são excessivamente dispendiosos e morosos e iv) aos problemas associados à legislação dos produtos.

Na atualidade as bacteriocinas são manipuladas geneticamente com a finalidade de aumentar a sua potência, estabilidade e espectro de ação, permitindo adequar a sua aplicação a diferentes situações patológicas e a melhorar a sua aplicação “in vivo”. Por exemplo, por manipulação genética, foi introduzida uma lisina extra na porção N-terminal da sakacina P 44K, e na sakacina P T20K foi substituído um resíduo neutro por um resíduo catiónico, o que conduziu a um aumento da carga positiva da bacteriocina, o que promove uma interação mais consistente entre a carga positiva da bacteriocina e a carga negativa da membrana celular, conduzindo a um aumento da potência e da atividade da bacteriocina (Kazacic *et al.*, 2002). Adicionalmente, a reposição do resíduo de metionina combinada com um resíduo hidrofóbico, demonstrou reduzir a suscetibilidade das pediocinas e das bacteriocinas dipeptídicas a fenómenos de oxidação responsáveis por uma redução drástica da atividade (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Presentemente, os investigadores tentam desenvolver bacteriocinas quimeras, através da troca do domínio N-terminal de uma certa classe com o domínio C-terminal de outra, o que pode levar a formação de bacteriocinas mais potentes e ativas, como aconteceu com um estudo realizado com a pediocina PA-1, o qual conduziu à formação de vários quimeras que apresentaram atividade igual ou superior à bacteriocina original (Tominaga e Hatakeyama, 2007; Lohans e Vederas, 2012).

Por curiosidade, ao longo dos últimos anos, têm sido descobertos e isoladas um inúmero conjunto bactérias produtoras de bacteriocinas do género: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, entre outros, do ambiente marinho, ver Tabela 7, em anexo. Desta forma, é provável que num futuro próximo, devido à elevada biodiversidade deste ecossistema, e à ainda pouca exploração, é provável que sejam descobertas muitas outras bacteriocinas mais potentes e ativas com um espectro de ação adequado, proporcionando um arsenal peptídico altamente diversificado contra bactérias

multirresistentes, estabelecendo, desta forma, as bacteriocinas como uma nova e aliciente estratégia alternativa aos antibióticos (Desriac *et al.*, 2010).

#### **4.5.3. Aplicação das bacteriocinas produzidas por probióticos**

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações apropriadas, exercem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro a nível profilático, ajudando a restabelecer, ou a manter a flora microbiana natural do hospedeiro (Gillor *et al.*, 2008; Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012; Lohans e Vederas, 2012). No entanto, segundo Dabour *et al.* (2009), quando existe uma infecção bacteriana, as bacteriocinas purificadas apresentam atividade terapêutica superior, o que é comprovado pelo estudo realizado através da administração da pediocina PA-1 e do *Pediococcus acidilactici* UL5, uma bactéria produtora de pediocina PA-1, em ratos infetados com *Listeria monocytogenes*.

Ao longo dos anos, as bactérias probióticas foram demonstrando atividade antimicrobiana pois inibem o crescimento de outras bactérias patogênicas, sendo por isso, utilizadas no tratamento de infecções das mucosas gastrointestinal e vaginal.

As bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas podem ser aplicadas no trato gastrointestinal, produzindo “in situ” diversos tipos de bacteriocinas, que contribuem para a manutenção de um balanço adequado entre a microflora intestinal e o hospedeiro, evitando a proliferação de microrganismos patogênicos. Existem inúmeras bactérias que são aplicadas no trato gastrointestinal como probióticos, devido à produção de bacteriocinas, como por exemplo: i) o *Lactobacillus salivarius* UCC118, responsável por produzir a bacteriocina Abp118 que inibe o crescimento da *Listeria monocytogenes*; ii) o *Lactobacillus casei* L26 que inibe o crescimento de estirpes de *Escherichia coli* 0111 (enterohemorrágicas) e de *Listeria monocytogenes*; iii) o *Lactobacillus johnsonii* LA1 e o *Lactobacillus acidophilus* LB que inibem o crescimento de *Helicobacter pylori*; e iv) o *Enterococcus mundtii* ST4SA produtor da bacteriocina ST4SA, o qual é ativo contra bactérias Gram-positivo (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativo (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). Outros exemplos são fornecidos na Tabela 8, em anexo (Corr *et al.*, 2007; De Vuyst e Leroy, 2007; Gillor *et al.*, 2008; Gotteland *et al.* 2008; Granger *et al.*, 2008).

Adicionalmente, as bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas, podem ser aplicados na cavidade bucal, reduzindo o número de agentes etiológicos responsáveis pela proliferação de cáries dentárias (*Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mutans*) através de uma estirpe de *Streptococcus mutans* A2JM (geneticamente modificada) que produz mutacina 1140 responsável pela prevenção de cáries dentárias (Hillman *et al.*, 2007).

É importante referir que o *Streptococcus salivarius* K12 produz dois lantibióticos denominados salivaricina A e B que inibem a proliferação de *Streptococcus pyogenes* (bactéria saprófita), responsável por infeções do trato respiratório (faringite em imunodeprimidos) e no caso da salivaricina B permite combater o mau hálito provocado por *Prevotella spp.*, *Eubacterium saburreum*, e *Micromonas micros* (Burton *et al.*, 2006a; Burton *et al.*, 2006b; Gillor *et al.*, 2008). Já estão disponíveis no mercado a BLIS K12® e a BLIS M18™ na forma de pastilhas, contendo *Streptococcus salivarius* K12 e *Streptococcus salivarius* M18 respetivamente, que produzem bacteriocinas que restituem a microflora normal da cavidade bucal, contribuindo para a redução do mau hálito e prevenção de cáries dentárias (BLIS Technologies, 2012).

É de realçar que as bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas, também podem ser aplicadas a nível vaginal, promovendo a reposição e a manutenção da flora natural evitando a proliferação de bactérias patogénicas que desencadeiam infeções vaginais. Tem-se como principais exemplos: i) *Lactobacillus jensenii* 5L08 produz uma bacteriocina activa contra *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*; ii) *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 inibe *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus* que se liga às células epiteliais e impede a fixação de bactérias patogénicas (Kaewsrichan *et al.* 2006; Gillor *et al.*, 2008).

## VI. Capítulo 5: Outras alternativas

### 5.1. Estratégias antivirulentas

A maioria dos antibióticos interfere a nível dos processos celulares, no entanto, presentemente já se encontram em estudo alternativas inovadoras que interagem a nível dos fatores de virulência, os quais são os principais responsáveis por desencadear as infeções, tais como: i) inibição da secreção de toxinas - grande parte de bactérias Gram-negativo liberta as suas toxinas pelo sistema de secreção tipo III (T3SS), que envolve a formação de um organelo bacteriano com a estrutura em agulha que permite a secreção das toxinas diretamente para o meio intracelular (ver Figura 23, em anexo), como acontece com o INP0403, uma hidrazida (salicilideno acilhidrazida, utilizada no tratamento de infeções provocadas por micobactérias e no tratamento da tuberculose), que reduz a transcrição dos genes envolvidos neste mecanismo; ii) utilização de anticorpos específicos que inibem a ação de toxinas produzidas, por exemplo pelo *Clostridium botulinum*, através dos anticorpos H3H, F4H e F3A que inibem o domínio catalítico das neurotoxinas serotipo A; iii) interferência com o “quorum-sensing” através do “5’-methylthio-DADMe-Immucilina”, “5’-ethylthio-DADMe-Immucilina” e o “5’-butylthio-DADMe-Immucilina” que inibem a 5’-metiltioadenosina nucleosidase (MTAN) (uma enzima envolvida no “quorum-sensing” da *Escherichia coli* e do *Vibrio cholerae*), reduzindo a síntese de autoindutores AI-1 e AI-2 (moléculas de sinalização) e a capacidade de infeção da bactéria; iii) utilização de inibidores da biossíntese de pilus, reduzindo a adesão da bactéria ao epitélio (Galan e Wolf-Watz, 2006; Hudson *et al.*, 2007; Kaufmann *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2009; Layton *et al.*, 2010; Marlovits e Stebbins, 2010; Pang *et al.*, 2010; Fernebro, 2011).

Estas estratégias antivirulentas apresentam como principal vantagem o facto dos fatores de virulência serem específicos de bactérias patogénicas, não afetando a flora comensal. Adicionalmente, estas abordagens podem ser aplicadas tanto a nível sistémico, como também a nível tópico, podem também ser utilizadas como profilaxia em casos de epidemias e de bioterrorismo (Moayeri *et al.* 2006; Fernebro, 2011).

## 5.2. Anticorpos antibacterianos

A terapia com anticorpos antibacterianos, ainda não se encontra disponível no mercado, visto que grande parte dos anticorpos já descobertos ainda se encontram em ensaios clínicos, como está ilustrado na Tabela 9, em anexo. A título de curiosidade, esta terapêutica encontra-se amplamente aplicada no tratamento de células tumorais (Saylor *et al.*, 2009).

Relativamente às vantagens, esta alternativa terapêutica pode ser utilizada na prevenção e tratamento de infeções bacterianas em animais, não afetando a flora comensal. Como os anticorpos são extremamente seletivos, tornam-se extremamente seguros e eficazes. No entanto, esta terapêutica apresenta como desvantagens: i) o facto da síntese e purificação destas proteínas ser altamente dispendiosa e, como terá um mercado muito reduzido, pensa-se que o produto final possuirá um preço elevado; ii) aplicação exclusivamente sistémica e iii) podem perder eficácia a longo termo devido à variação antigénica da bactéria (Bebbington e Yarranton, 2008; Fernebro, 2011).

A título exemplificativo, presentemente determinou-se num ensaio clínico de fase I em recém-nascidos, que o “pagibaximab” (BSYX-A110), um anticorpo quimérico humano anti-LTA, desenvolvido por tecnologia de DNA recombinante. Neste estudo, foram administradas em recém-nascidos três infusões semanais contendo 60 a 90 mg/kg de “pagibaximab”. Este anticorpo é específico para os ácidos lipoteicóicos da parede celular, que são indispensáveis à viabilidade do *Staphylococcus aureus*. Este anticorpo liga-se aos ácidos lipoteicóicos da bactéria estimulando a sua fagocitose e inibindo a libertação de citocinas reponsáveis por induzir falha dos órgãos. O “pagibaximab” foi considerado bem tolerado, seguro e eficaz no tratamento e prevenção de infeções provocadas por esta bactéria (Bebbington e Yarranton, 2008; Weisman *et al.*, 2011).

Presentemente, foi desenvolvido o 2E9IgA1, um anticorpo específico para *Mycobacterium tuberculosis* que foi administrado por via intranasal associado ao IFN- $\gamma$  (interferão-gama), reduzindo significativamente a infeção respiratória em ratos transgénicos com o recetor CD89 humano. Isto indica que o 2E9IgA1 apresenta elevada afinidade para o recetor  $\alpha$ -cristalino (antigénio) do *Mycobacterium tuberculosis* e para o recetor CD89 (Fc $\alpha$ RI) que está presente em macrófagos e neutrófilos. Segundo este estudo, pensa-se que o 2E9IgA1 pode atuar de duas formas, quer ligando-se ao recetor CD89 dos macrófagos alveolares, estimulando a fagocitose da bactéria, quer ligando-se

ao recetor CD89 dos neutrófilos que posteriormente exercem um efeito bactericida. Este anticorpo poderá contribuir, num futuro próximo, para a redução do tempo da quimioterapia do doente com tuberculose, da transmissão da tuberculose e do desenvolvimento de novas estirpes multirresistentes (Balu *et al.*, 2011).

### 5.2.1. Radioimunoterapia

A radioimunoterapia (RIT) é uma técnica que foi utilizada no tratamento de infeções provocadas por *Streptococcus pneumoniae*, recorrendo ao anticorpo monoclonal D11, que se liga especificamente ao antigénio PPS8, um polissacarídeo presente na cápsula da bactéria. Ao anticorpo D11 foi associado um isótopo radioativo  $^{213}\text{Bi}$ , o qual foi administrado numa concentração de 80  $\mu\text{Ci}$  e permitiu que 87 % a 100 % da população teste sobrevivesse. Adicionalmente, este trabalho revelou que 3 a 14 dias após o tratamento, os animais não demonstraram quaisquer sinais de patologia (Dadachova *et al.*, 2004).

Presentemente, outro estudo revelou que a radioimunoterapia também pode ser utilizada no tratamento de infeções causadas por bactérias produtoras de toxinas, como o *Bacillus anthracis*, recorrendo-se aos complexos  $^{213}\text{Bi}$ ]10F4  $\gamma$ 1 e  $^{213}\text{Bi}$ ]14FA  $\gamma$  2b, os quais exibiram ação bactericida pelo facto das toxinas se acumularem na periferia desta bactéria (Rivera *et al.*, 2009; Saylor *et al.*, 2009; Nosanchuk e Dadachova, 2012).

### 5.3. Vacinas

Atualmente, foram desenvolvidos novos métodos de identificação de antigénios, tendo a engenharia genética permitido identificar e sintetizar o epítipo responsável pela resposta imunitária, levando ao desenvolvimento de vacinas recombinantes. Estas vacinas são constituídas por um ou mais antigénios que quando administradas com adjuvantes ou plasmídeos, induzem a resposta imunitária contra o agente patogénico. Adicionalmente, as vacinas podem conter microrganismos recombinantes vivos, tais como: i) *Mycobacterium bovis*; ii) *Listeria monocytogenes*; iii) *Salmonellae spp* e iv) *Shigellae spp*, nos quais foram inseridos no seu genoma o gene que codifica o antigénio pretendido, funcionando como um vetor.

Já existem vacinas de DNA, em que esta molécula se encontra inserida num plasmídeo (no qual pode ser introduzidos inúmeros antígenos), administradas intramuscularmente, podendo induzir a produção de anticorpos específicos contra diversos agentes patogénicos (Fernebro, 2011; Nascimento e Leite, 2012; Nabel, 2013).

A título exemplificativo, atualmente já se encontram em ensaios clínicos: i) a vacina IC43, que será aplicada profilaticamente contra *Pseudomonas aeruginosa*, sendo constituída por duas proteínas recombinantes que estão presentes na superfície da bactéria; ii) a GSK2392105A e a SA3Ag que possuem 3 e 4 antígenos respetivamente, promovendo imunização contra *Staphylococcus aureus*; iii) vacinas contendo vesículas da membrana externa bacteriana, que protegem contra *Neisseria meningitidis*, *Burkholderia pseudomallei* e *Escherichia coli*; iv) uma vacina contendo a  $\alpha$ -toxina geneticamente inativada (HlaH35L), que contribui para a imunização a nível cutâneo e sistémico, dos ratos quando infetados por *Staphylococcus aureus* (Doring e Pier, 2008; Nieves *et al.*, 2011; Brady *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

Em Portugal, já se encontram disponíveis no mercado cerca de 37 tipos de vacinas, sendo esta considerada a melhor estratégia terapêutica profilática contra as infeções bacterianas.

## **VII. Conclusão e perspectivas futuras**

Com o aumento galopante das resistências bacterianas aos antibióticos convencionais e com a possibilidade destes perderem a sua eficácia num período de 5 anos, é indispensável que sejam colocadas em prática novas estratégias alternativas com o intuito de combater este grave problema que a sociedade atual enfrenta.

Presentemente, já existem diversas estratégias alternativas (como a terapia fágica e a terapia com lisinas) com elevada especificidade e espectro de ação extremamente reduzido, não afetando a flora comensal, encontrando-se inúmeros compostos a ser testados em ensaios clínicos, estando outros ainda em fase de desenvolvimento. No entanto, e apesar de demonstrarem inúmeras vantagens relativamente aos antibióticos, é indispensável aprofundar o conhecimento relativamente ao comportamento de algumas destas estratégias terapêuticas “in vivo”.

Poucos são os PAMs que foram aceites até hoje pela FDA e a pela EMEA e a sua aplicação restringe-se apenas à aplicação em formulações de aplicação tópica, devido ao seu reduzido tempo de semi-vida e elevadas concentrações em que são administradas.

Apesar das bacteriocinas serem uma excelente alternativa terapêutica aos antibióticos, a indústria farmacêutica continua relutante em financiar a sua investigação e a produção das suas preparações, devido aos elevados custos de produção. As bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas, apesar de já estarem disponíveis no mercado, são consideradas um complemento terapêutico e não como uma estratégia terapêutica alternativa.

A vacinação estabelece-se como uma das estratégias mais promissoras a nível preventivo, como também em termos de custo-eficácia, mas não permitem combater as infeções e está limitada a um conjunto ainda muito restrito de bactérias.

Atualmente, através da engenharia genética e da tecnologia de DNA recombinante, é possível desenvolverem-se bacteriófagos, lisinas e bacteriocinas “transgênicas” com a finalidade de infetar eficientemente biofilmes, alterar o seu espectro de ação, tornando-os ainda mais específicos e aumentando a sua potência e eficácia.

Desta forma, conclui-se que é necessário aprofundar os conhecimentos relativos a estas inovadoras estratégias terapêuticas. Enquanto estas não se encontrarem bem definidas,

estruturadas e disponíveis no mercado atual, é indispensável que sejam estabelecidas normas com o intuito de controlar o uso dos antibióticos, ainda eficazes no combate às bactérias multirresistentes. Adicionalmente, é indispensável que os técnicos superiores de saúde recorram, apenas em última instância, aos antibióticos que surjam no mercado num futuro próximo, com a finalidade de evitar a disseminação das resistências bacterianas a este grupo terapêutico.

## VIII. Bibliografia

- Aarestrup, F.M.; Agerso, Y.; Madsen, M. *et al.* (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 37(2), pp.127-137.
- Abedon, S. T.; Kuhl, S. J.; Blasdel, B. G. *et al.* (2011). Phage treatments of human infections. *Bacteriophage*, 1, pp.66-85.
- Abhilash, M.; Vidya, A. G.; Jagadevi, T. (2009). Bacteriophage therapy: A war against antibiotic resistant bacteria. *The International Journal of Alternative Medicine*, 7(1), p. 1.
- Ackermann, H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), pp.227-243.
- Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A. *et al.* (2004). *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. New York & London, Garland Publishing.
- Almeida, A.; Cunha, A.; Gomes, N. C. *et al.* (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*, 7(3), pp. 268-313.
- Amer, L. S.; Bishop, B. M.; van Hoek, M. L. (2010). Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), pp. 246-251.
- Atterbury, R.J. (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microbial Biotechnology*, 2(6), pp. 601-612.
- Balogh, B.; Jones, J. B.; Iriarte, F. B. *et al.* (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp. 48-57.
- Baltzer, S. A. e Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides – promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(4), pp. 228-235.
- Balu, S.; Reljic, R.; Lewis, M. J. *et al.* (2011). A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. *Journal of Immunology*, 186(5), pp. 3113-3119.
- Bebbington, C. e Yarranton, G. (2008). Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), pp. 613-619.
- Begley, M.; Hill, C.; Ross, R. P. (2006). Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp. 2231-2234.
- Bernbom, N.; Jelle, B.; Brogren, C. H. *et al.* (2009). Pediocin PA-1 and a pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain do not change the HMA rat microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), pp. 251-257.

- Björn, C.; Håkansson, J.; Myhrman, E. *et al.* (2012). Anti-infectious and anti-inflammatory effects of peptide fragments sequentially derived from the antimicrobial peptide centrocin 1 isolated from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *AMB Express*, 2(1), p. 67.
- BLIS Technologies. (2012). *World's First Probiotic for the Mouth and Throat*. [Em linha]. Disponível em: < <http://blis.co.nz/> >. [Consultado em 05/02/2013].
- Bodaszewska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M.; Gosiewski, T. *et al.* (2012). Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins-pilot study. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 66, pp. 787-794.
- Borysowski, J.; Weber-Dabrowska, B.; Górski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine*, 231(4), pp. 366-377.
- Brady, R. A.; Mocca, C. P.; Prabhakara, R. *et al.* (2013). Evaluation of genetically inactivated alpha toxin for protection in multiple mouse models of *Staphylococcus aureus* infection. *Public Library of Science One*, 8(4), pp. e63040.
- Brand, A. M.; Kwaadsteniet, M.; Dicks, L. M. (2010). The ability of nisin F to control *Staphylococcus aureus* infection in the peritoneal cavity, as studied in mice. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), pp. 645-649.
- Brandenburg, L. O.; Merres, J.; Albrecht, L. J. (2012). Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. *Polymers*, 4(1), pp. 539-560.
- Bruhn, O.; Grötzinger, J.; Cascorbi, I. *et al.* (2011). Antimicrobial peptides and proteins of the horse - insights into a well-armed organism. *Veterinary Research*, 42(1), p.98.
- Buchholz, U.; Bernard, H.; Werber, D. *et al.* (2011). German outbreak of *Escherichia coli* 0104:H4 associated with sprouts. *The New England Journal of Medicine*, 365(19), pp. 1763-1770.
- Burton, J. P.; Chilcott, C. N.; Moore, C. J. *et al.* (2006a). A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), pp. 754-764.
- Burton, J. P.; Wescombe, P. A.; Moore, C. J. *et al.* (2006b). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 3050-3053.
- Butler, M. S. e Buss, A. D. (2006). Natural products - the future scaffolds for novel antibiotics?. *Biochemical Pharmacology*, 71(7), pp. 919-929.
- Campos, J.; Ferech, M.; Lázaro, E. *et al.* (2007). Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), pp.698-701.
- Cao, L.; Dai, C.; Zhongjie, L. *et al.* (2012). Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative *in vitro* and *in vivo*. *Public Library of Science One*, 7(7), pp. e40135.

- Carlet, J.; Collignon, P.; Goldmann, D. *et al.* (2011). Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*, 378 (9788), pp. 369-371.
- Carlet, J. e Mainardi, J.L. (2012). Antibacterial agents: back to the future. Can we live with only colistin, co-trimoxazole, and fosfomycin. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), pp. 1-3.
- Carlet, J.; Jarlier, V.; Harbarth, S. *et al.* (2012a). Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1(1), p. 11.
- Carlet, J.; Rambaud, C.; Pulcini, C. (2012b). WAAR (World Alliance against Antibiotic Resistance): Safeguarding antibiotics. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1(1), p. 25.
- Carmody, L. A.; Gill, J. J.; Summer, E. J. *et al.* (2009). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), pp.264-271.
- Celia, L. K.; Nelson, D.; Kerr, D. E. (2007). Characterisation of a bacteriophage lysine (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*, 130(1-2), pp.107-117.
- Chan, B. K. e Abedon, S. T. (2012). Phage therapy pharmacology phage *cocktails*. *Advances in Applied Microbiology*, 78, pp. 1-23.
- Charan, J.; Mulla, S.; Ryavanki, S. *et al.* (2012). New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. *Pan African Medical Journal*, 11, p. 22.
- Chen, Y.; Cao, L.; Zhong, M. *et al.* (2012). Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *Public Library of Science One*, 7(4), pp. e34947.
- Cheng, Q.; Nelson, D.; Zhu, S. *et al.* (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp.111-117.
- Chhibber, S.; Kaur, S.; Kumari, S. (2008). Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 57(12), pp.1508-1513.
- Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Silvestri, C. *et al.* (2007). Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), pp. 2005-2010.
- Collins, B.; Curtis, N.; Cotter, P. D. *et al.* (2010). The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin and various beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 54(10), pp. 4416-4423.
- Corr, S. C.; Li, Y.; Riedel, C. U. *et al.* (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp. 7617-7621.

- Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews Microbiology*, 3(10), pp. 777-788.
- d'Herelle, F. (1916). Contribution à l'étude de la dysentérie. Nouveaux bacilles dysentériques, pathogènes pour les animaux d'expérience. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 76, pp. 425-428.
- Dabour, N.; Zihler, A.; Kheadr, E. *et al.* (2009). In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), pp. 225-233.
- Dadachova, E.; Burns, T.; Bryan, R. A. *et al.* (2004). Feasibility of radioimmunotherapy of experimental pneumococcal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), pp. 1624-1629.
- Daniel, A.; Euler, C.; Collin, M. *et al.* (2010). Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), pp. 1603-1612.
- De Vuyst, L. e Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), pp. 194-199.
- Debarbieux, L.; Leduc, D.; Maura, D. *et al.* (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Infectious Diseases*, 201(7), pp.1096-1104.
- Desriac, F.; Defer, D.; Bourgoignon, N. *et al.* (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*, 8(4), pp. 1153-1177.
- Devocelle, M. (2012). Targeted antimicrobial peptides. *Frontiers in Immunology*, 3, p. 309.
- Donabedian, S. M.; Thal, L. A.; Hershberger, E. *et al.* (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *Journal Clinical Microbiology*, 41(3), pp. 1109-1113.
- Donovan, D. M.; Dong, S.; Garrett, W. *et al.* (2006). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 2988-2996.
- Doring, G. e Pier, G. B. (2008). Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 26(8), pp. 1011-1024.
- Duquesne, S.; Destoumieux-Garzon, D.; Peduzzi, J. *et al.* (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *National Products Reports*, 24(4), pp. 708-734.
- Escobar-Paramo, P.; Gougat-Barbera, C.; Hochberg, M. E. (2012). Evolutionary dynamics of separate and combined exposure of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 to antibiotics and bacteriophage. *Evolutionary Applications*, 5(6), pp.583-592.

- Fenton, M.; Ross, P.; McAuliffe, O. *et al.* (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*, 1(1), pp. 9-16.
- Fernández, L.; Delgado, S.; Herrero, H. *et al.* (2008). The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of Human Lactation*, 24(3), pp. 311-316.
- Fernebro, J. (2011). Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resistance Updates*, 14(2), pp. 125-139.
- Fischetti, V. A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), pp. 393-400.
- Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), pp. 357-362.
- Fischetti, V. A. (2011). Exploiting what phage have evolved to control gram-positive pathogens. *Bacteriophage*, 1(4), pp. 188-194.
- Fleming, A. (1929). Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, pp. 226-236.
- Freire-Moran, L.; Aronsson, B.; Manz, C. *et al.* (2011). Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - time to react is now. *Drug Resistance Updates*, 14(2), pp. 118-124.
- Galan, J. E. e Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444(7119), pp. 567-573.
- Gillor, O.; Nigro, L. M.; Riley, M.A. (2005). Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), pp. 1067-1075.
- Gillor, O.; Etzion, A.; Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), pp. 591-606.
- Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2(1), pp. 1-33.
- Goossens, H.; Ferech, R.; Elseviers, M. *et al.* (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross national database study. *Lancet*, 365(9459), pp. 579-587.
- Gordon, Y. J. e Romanowski, E. G. (2005). A Review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research*, 30(7), pp. 505-515.
- Gotteland, M.; Andrews, M; Toledo, M. *et al.* (2008). Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. *Nutrition*, 24(5), pp. 421-426.

- Granger, M.; van Reenen, C. A.; Dicks, L. M. (2008). Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), pp. 277-280.
- Gravesen, A.; Ramnath, M.; Rechinger, K. B. *et al.* (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 148(8), pp. 2361-2369.
- Gutierrez, J. A.; Crowder, T.; Rinaldo-Matthis, A. *et al.* (2009). Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nature Chemical Biology*, 5(4), pp. 251-257.
- Hagens, S. e Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp. 58-68.
- Hammami, R.; Zouhir, A.; Le Lay, C. *et al.* (2010). Bactibase second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BioMed Central Microbiology*, 10, p. 22.
- Hanlon, G.B. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), pp.118-128.
- Hermoso, J. A.; García, J. L.; García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: From phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), pp. 461-472.
- Hillman, J. D.; Mo, J.; McDonell, E. *et al.* (2007). Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), pp. 1209-1219.
- Hoopes, J.T.; Stark, C.J.; Kim, H.A. *et al.* (2009). Use of a bacteriophage lysin, PlyC as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. *Applied Environmental Microbiology*, 75(5), pp. 1388-1394.
- Housby, J. N. e Mann, N. H. (2009). Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14(11-12), pp.536-540.
- Hudson, D. L.; Layton, A. N.; Field, T. R. *et al.* (2007). Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, pp. 2631-2635.
- Hung, C. H.; Kuo, C. F.; Wang, C.H. *et al.* (2011). Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), pp.1358-1365.
- Hyman, P. e Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217-248.
- INFARMED. (2007). *Relatório do Departamento de Medicamentos Veterinários - O Medicamento Veterinário Farmacológico. Abordagem Analítica*. Lisboa, INFARMED.
- INFARMED. (2011). *Prontuário Terapêutico 10*. Lisboa, INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério de Saúde.

- Innophage. (2010). *Innovative bacteriophage solutions*. [Em linha]. Disponível em: < <http://www.innophage.com/bact.html> >. [Consultado em 13/12/2012].
- Intralytix. (2013). *Safety by Nature*. [Em linha]. Disponível em: < [http://www.intralytix.com/Intral\\_Food.htm](http://www.intralytix.com/Intral_Food.htm) >. [Consultado em 28/04/2013].
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(2), pp. 120-126.
- Jado, I.; Lopez, R.; Garcia, E. *et al.* (2003). Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), pp. 967-973.
- Jaeyong, C.; Hwang, I.; Hyemin, C. *et al.* (2012). The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), pp. 1457-1466.
- Jeevaratnam, K.; Jamuna, M.; Bawa, A. S. (2005). Biological preservation of foods-Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, pp. 446-454.
- Jenssen, H.; Hamill, P.; Robert, E. *et al.* (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), pp. 491-511.
- Jeong, N.; Kim, J. Y.; Park, S. C. *et al.* (2010). Antibiotic and synergistic effect of Leu-Lys rich peptide against antibiotic resistant microorganisms isolated from patients with cholelithiasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), pp. 581-586.
- Johnsen, P. J.; Osterhus, J. I.; Sletvold, H. *et al.* (2005). Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *Applied Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 159-168.
- Johnson, R. P.; Gyles, C. L.; Huff, W.E. *et al.* (2008). Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Reviews*, 9(2), pp. 201-215.
- Jończyk, E.; Klak, M.; Miedzybrodzki, R. *et al.* (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiologica*, 56(3), pp.191-200.
- Kaewsrichan, J.; Peeyananjarassri, K.; Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, 48(1), pp. 75-83.
- Katsunuma, Y.; Hanazumi, M.; Fujisaki, H. *et al.* (2008). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *Journal General Applied Microbiology*, 54(1), pp. 39-50.
- Kaufmann, G. F.; Park, J.; Janda, K. D. (2008). Bacterial quorum sensing: a new target for anti-infective immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(6), pp. 719-724.

- Kazazic, M.; Nissen-Meyer, J.; Fimland, G. (2002). Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology*, 148(7), pp. 2019-2027.
- Kim, O. Y.; Hong, B. S.; Park, K. S. *et al.* (2013). Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *Journal of Immunology*, 190(8), pp. 4092-4102.
- Kjos, M.; Salehian, Z.; Nes, I. F. *et al.* (2010). An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, 192(22), pp. 5906-5913.
- Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B. (2011). Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), pp. 3335-3342.
- Kosciuczuk, E. M.; Lisowski, P.; Jarczak, J. *et al.* (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular Biology Reports*, 39(12), pp. 10957-10970.
- Kristian, S. A.; Lauth, X.; Nizet, V. *et al.* (2003). Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(3), pp. 414-423.
- Kruszewska, D.; Sahl, H.G.; Bierbaum, G. *et al.* (2004). Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3), pp. 648-653.
- Kutter, E.; De Vos, D.; Gvasalia, G. *et al.* (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp.69-86.
- Layton, A. N.; Hudson, D. L.; Thompson, A. *et al.* (2010). Salicylidene acylhydrazide-mediated inhibition of type III secretion system-1 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is associated with iron restriction and can be reversed by free iron. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 302(2), pp. 114-122.
- Laverty, G.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. (2011). The potencial of antimicrobial peptides as biocides. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), pp. 6566-6596.
- Le Blay, G.; Lacroix, C.; Zihler, A. *et al.* (2007). *In vitro* inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), pp. 252-257.
- Lee, H. e Kim, H. Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), pp. 229-235.
- Łęski, T. A. e Tomasz, A. (2005). Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: Evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1815-1824.

- Li, J.; Nation, R.L.; Milne, R.W. *et al.* (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(1), pp. 11-25.
- Livermore, D. M. (2008). Future directions with daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), pp. 41-49.
- Levin, B. R. e Bull, J. J. (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp.166–173.
- Ligon, B. L. (2004). Sir Alexander Fleming: Scottish researcher who discovered penicillin. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), pp. 58-64.
- Loeffler, J. M.; Djurkovic, S.; Fischetti, V.A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infection and Immunity*, 71(11), pp.6199-6204.
- Lohans, C. T. e Vederas, J.C. (2012). Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. *International Journal of Microbiology*, 2012, pp.1-13.
- Lu, T. K. e Collins, J. J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), pp. 4629-4634.
- Mainous, A. G.; Everett, C. J.; Post, R. E. *et al.* (2009). Availability of antibiotics for purchase without a prescription on the internet. *Annals of Family Medicine*, 7(5), pp. 431-435.
- Marlovits, T. C. e Stebbins, C. E. (2010). Type III secretion systems shape up as they ship out. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), pp. 47-52.
- Martínez-Júlvez, M.; Rojas, A. L.; Olekhovich, I. *et al.* (2012). Structure of RdxA: an oxygen insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279(23), pp. 4306-4317.
- Matsuzaki, S.; Rashel, M.; Uchiyama, J. *et al.* (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), pp.211-219.
- Maura, D. e Debarbieux, L. (2011). Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(3), pp.851-859.
- McGowan, S.; Buckle, A. M.; Mitchell, M. S. *et al.* (2012). X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), pp. 12752-12757.
- McInturff, J. E.; Wang, S. J.; Machleidt, T. *et al.* (2005). Granulysin-derived peptides demonstrate antimicrobial and anti-inflammatory effects against *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 125(2), pp. 256-263.
- Mckenna, J. (2001). *Alternativas aos antibióticos*. Lisboa, Livros Horizonte.

- McPhee, J. B.; Scott, M. G.; Hancock, R.E. (2005). Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(3), pp. 257-272.
- Meir, S.; Weber, R.; Zbinden, R. *et al.* (2011). Extended- spectrum betalactamases- producing Gram negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection*, 39(4), pp. 333-340.
- Merabishvili, M.; Pirnay, J. P.; Verbeken, G. *et al.* (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage *cocktail* for use in human clinical trials. *Public Library of Science Medicine ONE*, 4(3), p. e4944.
- Morello, E.; Saussereau, E.; Maura, D. *et al.* (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *Public Library of Science ONE*, 6(2), p. e16963.
- Moayeri, M.; Wiggins, J. F.; Lindeman, R. E. *et al.* (2006). Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), pp. 2658-2665.
- Mygind, P. H.; Fischer, R. L.; Schnorr, K. M. *et al.* (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), pp.975-980.
- Nabel, G. J. (2013). Designing tomorrow's vaccines. *The New England Journal of Medicine*, 368(6), pp. 551-560.
- Nakatsuji, T. e Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), pp. 887-895.
- Nascimento, I. P. e Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), pp. 1102-1111.
- Nelson, D.; Loomis, L.; Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp. 4107-4112.
- Nelson, D.; Schuch, R.; Chahales, P. *et al.* (2006). PlyC: A multimeric bacteriophage lysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28), pp. 10765-10770.
- Nieves, W.; Asakrah, S.; Qazi, O. *et al.* (2011). A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine*, 29(46), pp. 8381-8389.
- Nishie, M.; Nagao, J.; Sonomoto, K. *et al.* (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*, 17(1), pp. 1-16.
- Nissen-Meyer, J.; Rogne, P.; Oppegard, C. *et al.* (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), pp.19-37.

- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current issues in Molecular Biology*, 8(1), pp. 11-26.
- Nogueira, A.; Dias, A.; Silva, R. *et al.* (2008). Contribuição das suiniculturas na selecção e disseminação de *Enterococcus* spp resistentes às tetraciclina. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 5, pp. 164-173.
- Nosanchuk, J. D. e Dadachova, E. (2012). Radioimmunotherapy of fungal diseases: the therapeutic potential of cytotoxic radiation delivered by antibody targeting fungal cell surface antigens. *Frontiers in Microbiology*, 2, p. 283.
- O'Flaherty, S.; Ross, R.P.; Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*, 33(4), pp. 801-819.
- O'Flaherty, S.; Ross, R.P.; Meaney, W. *et al.* (2005). Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), pp.1836-1842.
- Obeso, J. M.; Martinez, B.; Rodriguez, A. *et al.* (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), pp.211-218.
- Oppegard, C.; Rogne, P.; Emanuelsen, L. *et al.* (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), pp.210-219.
- Orito, Y.; Morita, M.; Hori, K. *et al.* (2004). *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), pp. 105-109.
- Overhage, J.; Campisano, A.; Bains, M. *et al.* (2008). Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity*, 76(9), pp. 417-4182.
- Pang, Y. P.; Davis, J.; Wang, S. *et al.* (2010). Small molecules showing significant protection of mice against botulinum neurotoxin serotype A. *Public Library of Science One*, 5(4), e10129.
- Papagianni, M. e Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8, p.3.
- Park, S. C.; Park, Y.; Hahm, K. S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), pp. 5971-5992.
- Parracho, H. M.; Burrowes, B. H.; Enright, M. C. *et al.* (2012). The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 6, pp.279-286.
- Peters, B. M.; Shirtliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A. *et al.* (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?. *Public Library of Science Pathogens*, 6(10), pp. e1001067.

- Piddock, L. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology*, 19(2), pp. 382-402.
- Pina, E.; Silva, M. G.; Silva, E. G. *et al.* (2010a). Infecção relacionada com a prestação de cuidados de saúde: infecções da corrente sanguínea (septicemia). *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 28, pp. 19-30.
- Pina, E.; Ferreira, E. ; Marques, A. *et al.* (2010b). Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 10, pp. 27-39.
- Pirnay, J.; De Vos, D.; Verbeken, G. *et al.* (2011). The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure?. *Pharmaceutical Research*, 28(4), pp. 934-937.
- Pirnay, J.; Verbeken, G.; Rose, T. *et al.* (2012). Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virology*, 7(4), pp. 379-390.
- Potera, C. (2013). Phage Renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(2), pp. a48-a53.
- Pouillot, F.; Blois, H.; Iris, F. (2010). Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria. *Biosecurity and Bioterrorism*, 8(2), pp. 155-169.
- Proença, D.; Fernandes, S.; Silva, F. A. *et al.* (2012). Phage endolysins with broad antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* clinical strains. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), pp. 322-332.
- Rajaram, G.; Manivasagan, P.; Thilagavathi, A. *et al.* (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(2), pp. 138-144.
- Ramaswamy, V.; Cresence, V. M.; Rejitha J. S. *et al.* (2007). *Listeria* - Review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 40(1), pp. 4-13.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *et al.* (2008). *Rang & Dale Farmacologia*. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda.
- Rashel, M.; Uchiyama, J.; Ujihara, T. *et al.* (2007). Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *Journal of Infectious Diseases*, 196(8), pp. 1237-1247.
- Rhoads, D. D.; Wolcott, R. D.; Kuskowski, M. A. *et al.* (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 18(6), pp.237-238.
- Rivera, J.; Nakouzi, A. S.; Morgenstern, A. *et al.* (2009). Radiolabeled antibodies to *Bacillus anthracis* toxins are bactericidal and partially therapeutic in experimental murine anthrax. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 53(11), pp. 4860-4868.

- Rodriguez-Brito, B.; Li, L.; Wegley, L. *et al.* (2010). Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 4(6), pp.739-751.
- Rohwer, F.; Prangishvili, D.; Lindell, D. (2009). Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, 11(11), pp.2771 - 2774.
- Romanelli, R. M. C.; Clemente, W. T.; Lima, S. S. S. *et al.* (2010). MRSA outbreak at a transplantation unit. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), pp. 54-59.
- Rouveix, B. (2007). Clinical Implications of Multiple Drug Resistance Efflux Pumps of Pathogenic Bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), pp.1208-1209.
- Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: An update review. *Current Drug Delivery*, 4(4), pp. 297-305.
- Sang, Y. e Blecha, F. (2008). Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, 9(2),pp. 227-235.
- Saylor, C.; Dadachova, E.; Casadevall, A. (2009). Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*, 27(6), pp. 38-46.
- Schmelcher, M.; Powell, A. M.; Becker, S. C. *et al.* (2012). Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), pp. 2297-2305.
- Schuch, R.; Nelson, D.; Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 418(6900), pp.884-889.
- Seo, M.; Won, H.; Kim, J. *et al.* (2012). Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*, 17(10), pp.12276-12286.
- Settanni, L. e Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), pp. 123-138.
- Singh, P. K.; Chittipurna, A.; Sharma, V. *et al.* (2012). Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus sp.* Strain GI-9. *Public Library of Science ONE*, 7(3), pp. e31498.
- Skurnik, M. e E. Strauch (2006). Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), pp. 5-14.
- Slaninová, J.; Mlsová, V.; Kroupová, H. *et al.* (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides*, 33(1), pp. 18-26.
- Sosa, A. de J.; Byarugaba, D. K.; Kariuki, S. *et al.* (2010). *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. New York, Springer.
- Soto, C.M. e Ratna, B.R. (2010). Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), pp. 426–438.

- Stavri, M.; Piddock, L. J. W.; Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pumps from natural sources. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), pp. 1247-1260.
- Stojković, E. A. e Rothman-Denes, L. B. (2007). Coliphage N4 N-acetylmuramidase defines a new family of murein hydrolases. *Journal of Molecular Biology*, 366(2), pp. 406-419.
- Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z.; Morraiz, J. *et al.* (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp. 649-59.
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), pp. 130-133.
- Suttman, H.; Retz, M.; Paulsen, F. *et al.* (2008). Antimicrobial peptides of the Cecropin family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BioMed Central Urology*, 8, p. 5.
- Tamaki, H.; Zhang, R.; Angly, F. E. *et al.* (2012). Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environmental Microbiology*, 14(2), pp. 441-452.
- Tanji, Y.; Shimada, T.; Fukudomi, H. *et al.* (2005). Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), pp.280-287.
- Technophage SA. (2008). *Technophage SA Business Units*. [Em linha]. Disponível em: < <http://www.technophage.pt/> >. [Consultado em 12/12/2012].
- Tessema, G. T.; Moretro, T.; Kohler, A. *et al.* (2009). Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), pp. 6973-6980.
- Theuretzbacher, U. (2009). Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1), pp.15-20.
- Tominaga, T. e Hatakeyama, Y. (2007). Development of innovative pediocin PA-1 by DNA shuffling among class IIa bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), pp. 5292-5299.
- Tsang, K.Y.; Luk, S.; Janice, Y.C. *et al.* (2012). Hong Kong experiences the “Ultimate superbug”: NDM-1 *Enterobacteriaceae*. *Hong Kong Medical Journal*, 18(5), pp. 439-441.
- UNMC. (2013). *The antimicrobial peptide database*. [Em linha]. Disponível em: < <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> >. [Consultado em 08/02/2013].
- Vacinas. (2012). *Vacinas.com.pt*. [Em linha]. Disponível em: < <http://www.vacinas.com.pt/> >. [Consultado em 18/05/2013].
- Vadyvaloo, V.; Arous, S.; Gravesen, A. *et al.* (2004). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150(9), pp. 3025-3033.
- Vadyvaloo, V.; Hastings, J. W.; van der Merwe, M. J. *et al.* (2002). Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and

- short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp. 5223-5230.
- Volozhantsev, N. V.; Verevkin, V. V.; Bannov, V. A. *et al.* (2011). The genome sequence and proteome of bacteriophage  $\Phi$ CPV1 virulent for *Clostridium perfringens*. *Virus Research*, 155(2), pp. 433-439.
- Walsh, T. R. (2011). New Delhi metallo-beta-lactamase-1: detection and prevention. *Canadian Medical Association Journal*, 183(11), pp. 1240-1241.
- Wardal, E.; Sadowy, E., Hryniewicz, W. *et al.* (2010). Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Polish Journal of Microbiology*, 59(2), pp.79-87.
- Weber-Dabrowska, B.; Mulczyk, M.; Gorski, A. (2003). Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplantation proceedings*, 35(4), pp.1385-1386.
- Weber-Dabrowska, K.; Switala-Jelen, K.; Opolski, A. *et al.* (2005). Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), pp.7-13.
- Wegener, H.C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), pp. 439-445.
- Weisman, L. E.; Thackray, H. M.; Steinhorn, R. H. *et al.* (2011). A randomized study of a monoclonal antibody (pagibaximab) to prevent staphylococcal sepsis. *Pediatrics*, 128(2), pp. 271-279.
- Wijagkanalan, W.; Kawakami, S.; Hashida, M. (2011). Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. *Pharmaceutical Research*, 28(7), pp. 1500-1519.
- Wommack, K.E. e Colwell, R.R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology*, 64(1), pp.69-114.
- Wright, A.; Hawkins, C. H.; Anggård, E. E. *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. *Clinical Otolaryngology*, 34(4), pp.349-357.
- Wu, H.; Lu, H.; Huang, J. *et al.* (2012). EnzyBase: a novel database for enzybiotic studies. *BioMed Central Microbiology*, 12, p. 54.
- Xu, T.; Ying, J.; Yao, X. *et al.* (2012). Identification and Characterization of Two Novel bla(KLUC) Resistance Genes through Large-Scale Resistance Plasmids Sequencing. *Public Library of Science One*, 7(10), pp. e47197.
- Yan, R.; Zhao, Z.; He, Y. *et al.* (2011). A new natural alpha-helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. *Peptides*, 32(1), pp. 11-19.
- Yang, H.; Liang, L.; Lin, S. *et al.* (2010). Isolation and characterisation of a virulent AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BioMed Central Microbiology*, 10, p.131.
- Yeung, A. T.; Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. (2011). Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), pp. 2161-2176.

Yong, D.; Toleman, M.A.; Giske, C.G. *et al.* (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5046-5054.

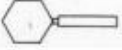
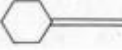








Yount, N.Y. e Yeaman, M. R. (2012). Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, pp.337-360.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), pp. 389-395.

Zendo, T.; Koga, S.; Shigeri, Y. *et al.* (2006). Lactococcin Q, a Novel Two-Peptide Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3383-3389.

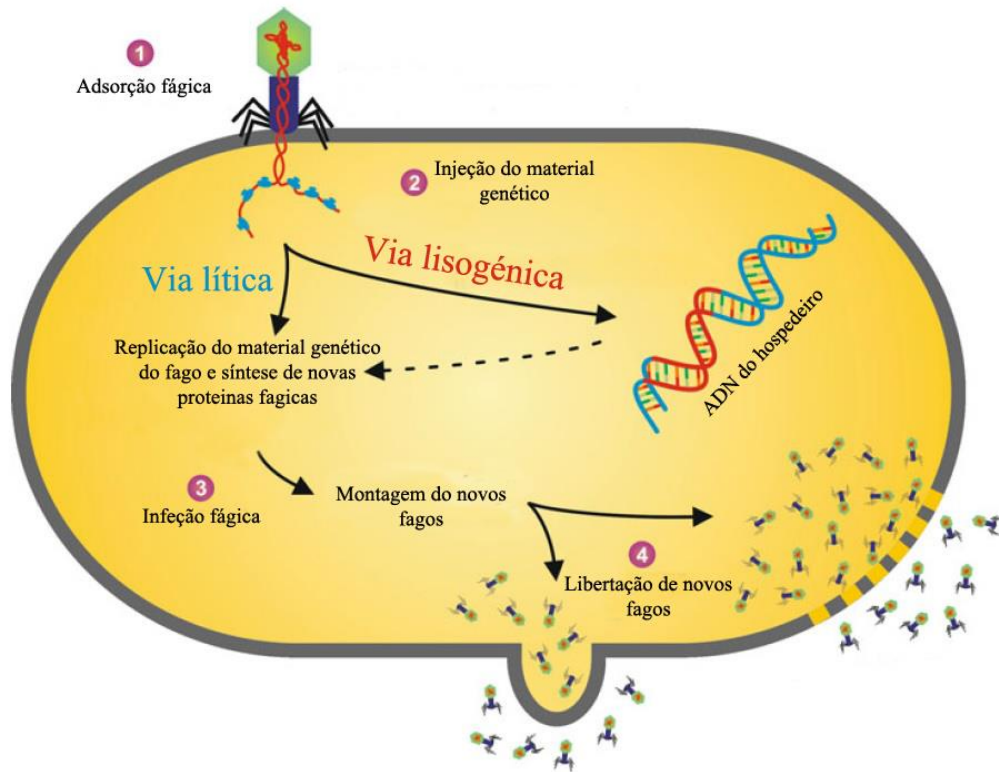
Zimmer, M.; Vukov, N.; Scherer, S.; *et al.* (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage Ply 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp. 5311-5317.

## Anexos

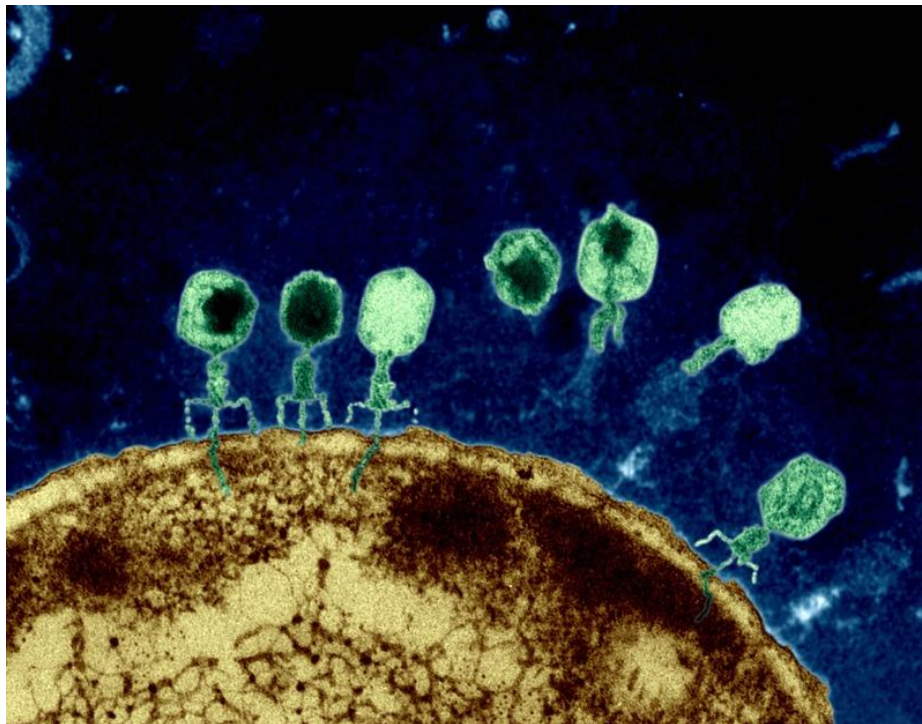
Forma	Família	Tipo de ácido nucleico e particularidades	Exemplo
	Caudovirales	dsDNA (L), sem envelope	
	<i>Myoviridae</i>	Cauda contrátil	T4
	<i>Siphoviridae</i>	Cauda longa não contrátil	$\lambda$
	<i>Podoviridae</i>	Cauda curta	T7
	<i>Microviridae</i>	ssDNA (C), 27 nm, capsómeros	$\phi$ X174
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (C), cápside complexa com lípidos, 63nm	PM2
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (L), vesícula lipídica interior, pseudocauda, 60nm	PRD1
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA (L), 23 nm, tipo poliovirus	MS2
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA (L), segmentado, envelope lipídico, 70-80nm	$\phi$ 6
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA (C), filamentos longos ou hastes curtas	fd
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (C), envelope lipídico, sem cápside, 80 nm	MVL2

C, circular; L, linear.

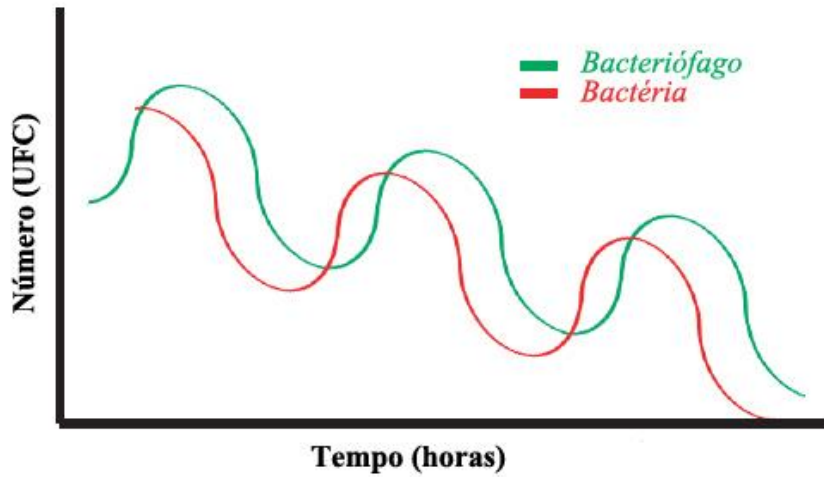
**Tabela 1** - Classificação dos bacteriófagos segundo a sua morfologia e material genético e as suas principais características (Adaptado de Ackermann, 2007).



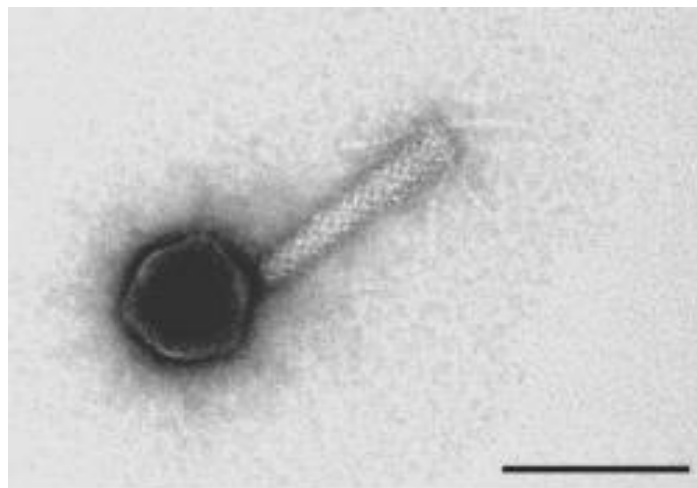
**Figura 1** - Diagrama esquemático do ciclo de infecção de um bacteriófago lítico/lisogénico (Adaptado de Maura e Debarbieux, 2011).



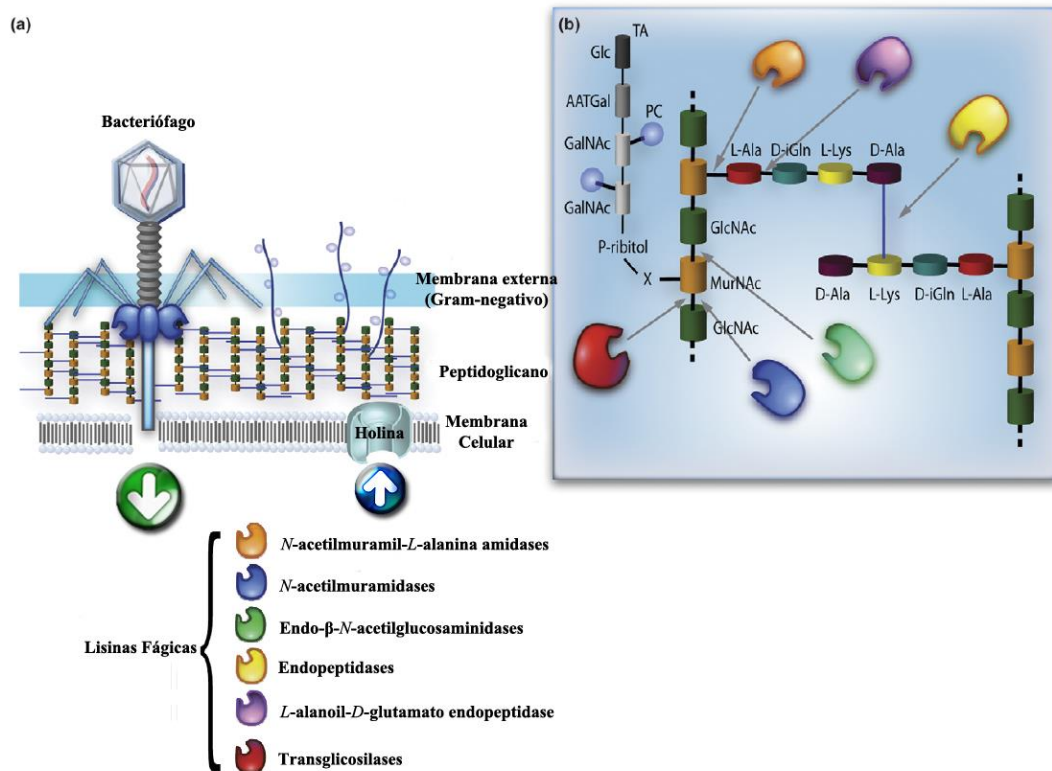
**Figura 2** - Bacteriófago T4 na superfície da *Escherichia coli* injetando o seu material genético (Retirado de Potera, 2013).



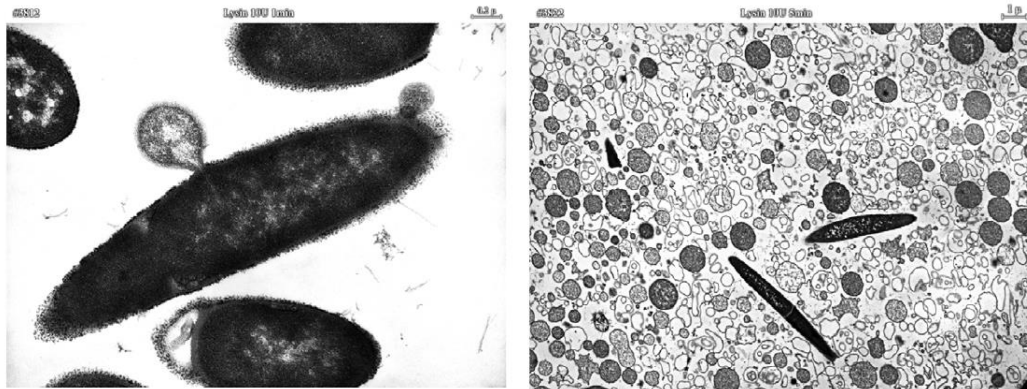
**Figura 3** - Decréscimo da população bacteriana em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) ao longo do processo de infecção por múltiplos bacteriófagos (Adaptado de Parracho *et al.*, 2012).



**Figura 4** - Bacteriófago PAK-P1 utilizado no tratamento e prevenção de infecções pulmonares provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Retirado de Debarbieux *et al.*, 2009).



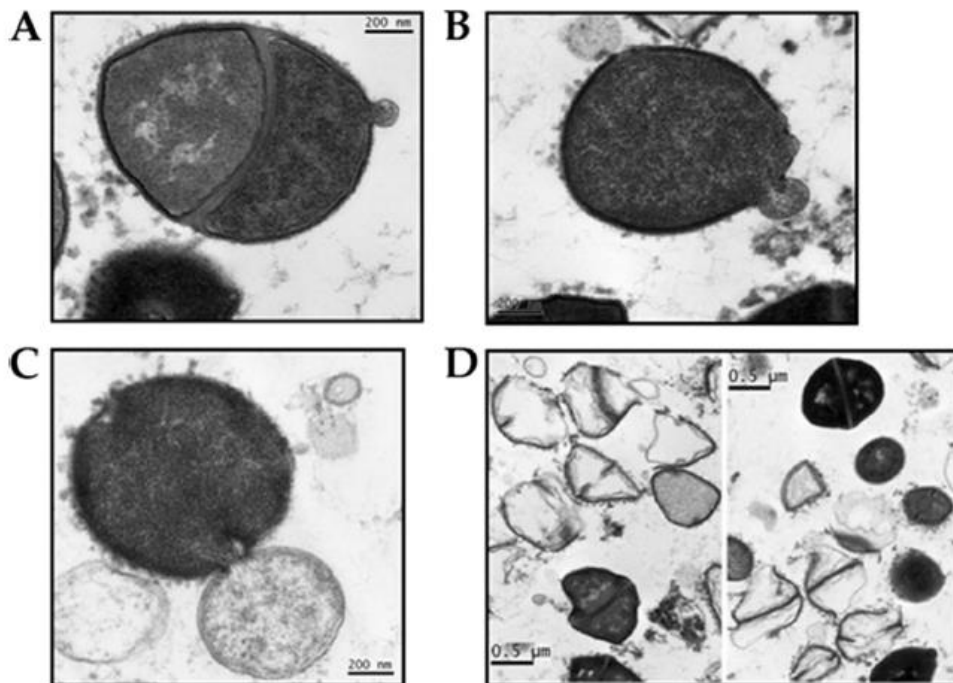
**Figura 5** - Diferentes tipos de lisinas fágicas, mecanismo de ação (a) e local onde atuam no peptidoglicano da célula hospedeira (b) (Adaptado de Hermoso *et al.*, 2007).



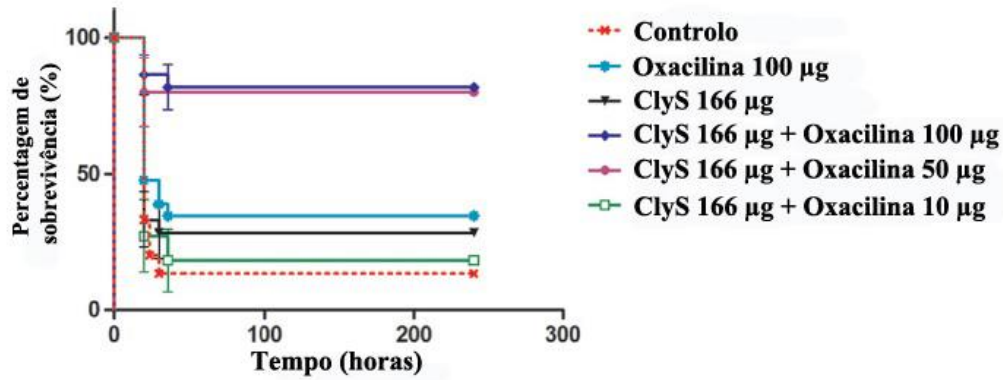
**Figura 6** - Disrupção da membrana do *Bacillus cereus* por administração da lisina PlyPH (Retirado de Fischetti, 2008).



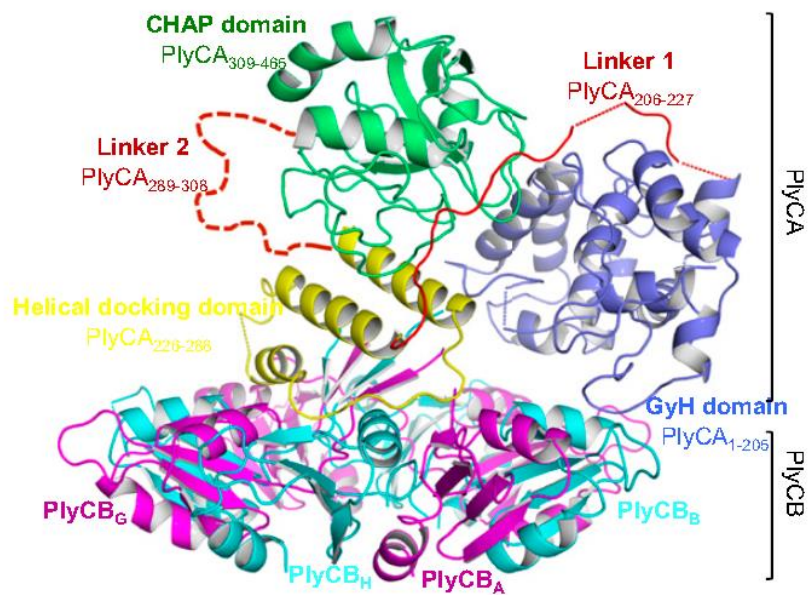
**Figura 7** - Estrutura básica das lisinas, caracterizada por possuir dois domínios, o domínio N-terminal, a amarelo, e o C-terminal, a roxo, ligados pelo “linker”, a cinzento (Adaptado de Fischetti, 2008).



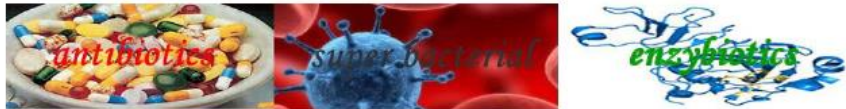
**Figura 8** - Processo de ruptura da parede celular de *Staphylococcus aureus* estabelecido após a administração de 250 µg de ClyS. Ao fim de um a três minutos, verifica-se que a parede celular encontra-se degradada em diversos pontos ao longo da superfície bacteriana (**Figura 8A** e **8B**). Os locais da parede celular que se encontram debilitados pela ação da ClyS começam a romper-se. Posteriormente ocorre a destruição da membrana celular e libertação do citoplasma para o meio extracelular (**Figura 8C**) e consequente morte celular (**Figura 8D**) (Retirado de Daniel *et al.*, 2010).



**Figura 9** - Gráfico que evidencia um efeito sinérgico entre a lisina ClyS e a oxacilina protegendo o rato contra infecções provocadas por MRSA a nível sistémico. Os resultados obtidos demonstram que a administração isolada da oxacilina e da ClyS conduziu a uma percentagem de sobrevivência da população teste muito inferior relativamente à administração de ambos os compostos em simultâneo (Adaptado de Daniel *et al.*, 2010).



**Figura 10** - Estrutura da lisina PlyC, com duas subunidades, a PlyCA e a PlyCB (Retirado de McGowan *et al.*, 2012).



Home Browse **Database Search** Tools Statistical Info Guide Forum  Search

**Search EnzyBase**

Enzy Id:  (Enzybase Id, such as **EM10753092**)

Uniprot Id:  (Uniprot Id, such as **P10547**)

Protein name:  (The name of Enzybiotic protein, such as **lysostaphin**)

Producer Organism:  (The source of enzybiotics, such as **Streptococcus pneumoniae** )

Domains:  (Pls. specify the name of domain, for example: **Peptidase\_M23**)

Target Organism:  (Only enter one target organism, for example: **S. aureus** )

MIC: <  (ug/ml)(Please specify the target organism first!)

Home Browse **Database Search** Tools Statistical Info Guide Forum

Current page (1/1)

1 Enzy Id: **EM10753092**  
 Name: **LSTP\_STASI**  
 Fullname: **Lysostaphin**  
 Activity: **Against S. aureus, CNS**  
 Lyses staphylococcal cells by hydrolyzing the polyglycine interpeptide bridges of the peptidoglycan.

2 Enzy Id: **EM57691756**  
 Name: **LSTP\_STAST**  
 Fullname: **Lysostaphin**  
 Activity: **Against S. aureus, S. carnosus**  
 Lyses staphylococcal cells by hydrolyzing the polyglycine interpeptide bridges of the peptidoglycan.

**Barra de Fermentas**  
**Pesquisa rápida**

**Resultado da pesquisa**

**Record in detail**

**Enzy\_id:**  
 Name: **LSTP\_STASI**  
 FullName: **Lysostaphin**  
 Producer Organism: **Staphylococcus simulans**  
 Sequence Length: **493**  
 Mass: **53091**  
 Isoelectric Point: **5.27**  
 Target: **S. aureus, CNS**  
 Link: **P10547**  
 Function: **Lyses staphylococcal cells by hydrolyzing the polyglycine interpeptide bridges of the peptidoglycan.**

**Antibacterial Activities**

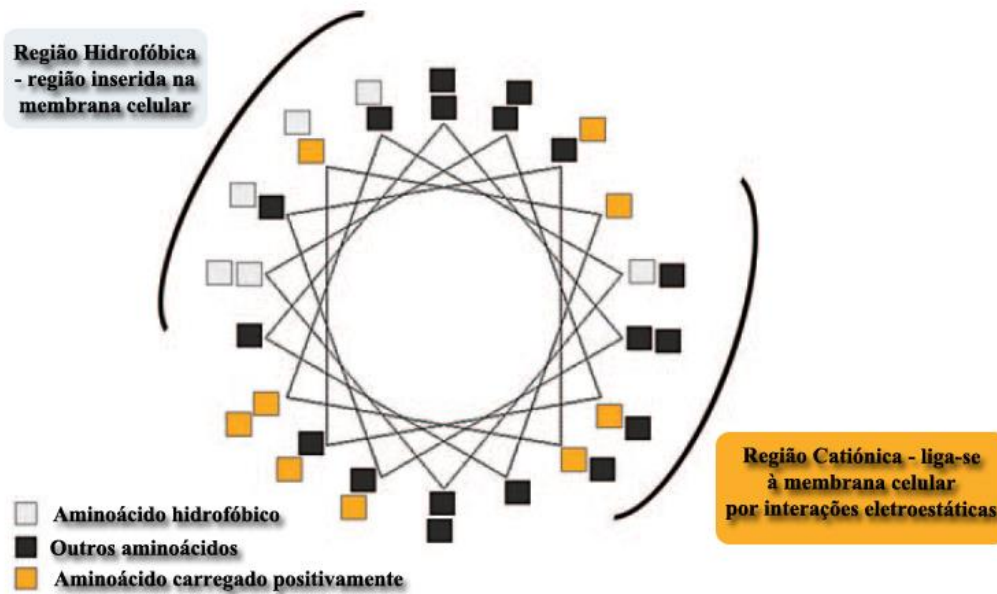
- 1 Flora: **S. aureus** MIC: **2.5ug/ml** Method: **agar dilu** [Pubmed: **181936**]
- 2 Flora: **S. capitis** MIC: **60ug/ml** Method: **agar dilu** [Pubmed: **181936**]
- 3 Flora: **S. cohnii** MIC: **8ug/ml** Method: **agar dilu** [Pubmed: **181936**]
- 4 Flora: **S. epidermidis** MIC: **16ug/ml** Method: **agar dilu** [Pubmed: **181936**]

**Informação detalhada**






Figura 11 - Motor de pesquisa de lisinas da “Enzybase” (Adaptado de Wu *et al.*, 2012).

**Tabela 2** - Exemplos de vários PAMs, tendo em conta a sua estrutura, origem e mecanismo de ação (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006).

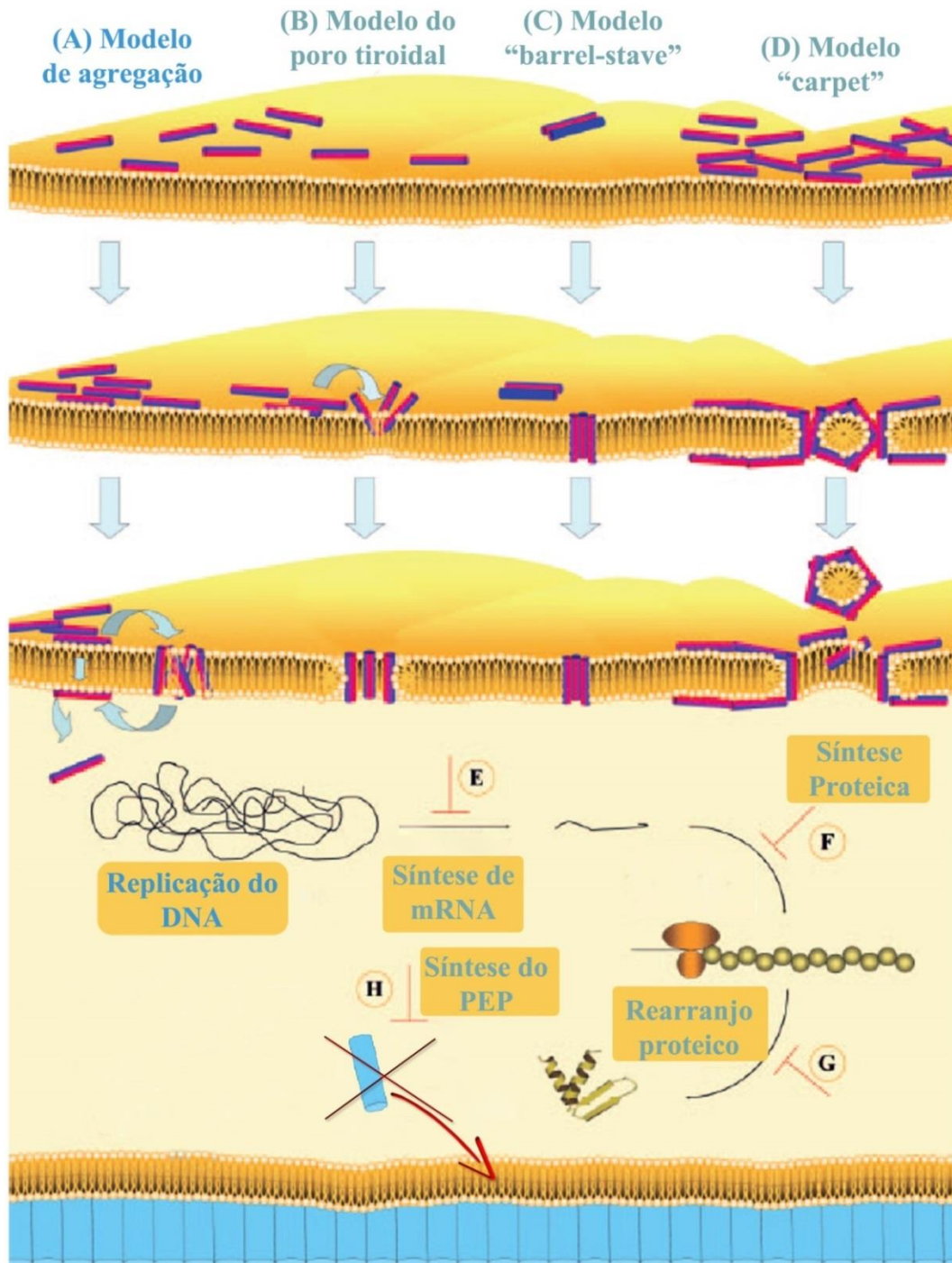
Péptido	Estrutura	Origem	Mecanismo de ação
Magainina	$\alpha$ -hélice	Sapo	Aumenta a permeabilidade da membrana celular
Cecropina A	$\alpha$ -hélice	Traça da seda	Disrupção membranar
Melitina	$\alpha$ -hélice	Abelha	Disrupção membranar
LL-37	$\alpha$ -hélice	Homem	Aumenta a permeabilidade da membrana celular
Buforina II	$\alpha$ -hélice	Sapo	Liga-se ao DNA
$\alpha$ -Defensina e $\beta$ -Defensina	$\beta$ -pregueada	Diversos mamíferos	Atuam na membrana celular, destabilizando-a e inibem a síntese proteica
Protegrina	$\beta$ -pregueada	Homem e Porco	Aumenta a permeabilidade da membrana celular (potente)
Indolicidina	Linear	Bovino	Inibe a síntese proteica
PR-39	Linear	Porco	Inibe a síntese de DNA, RNA e a síntese proteica



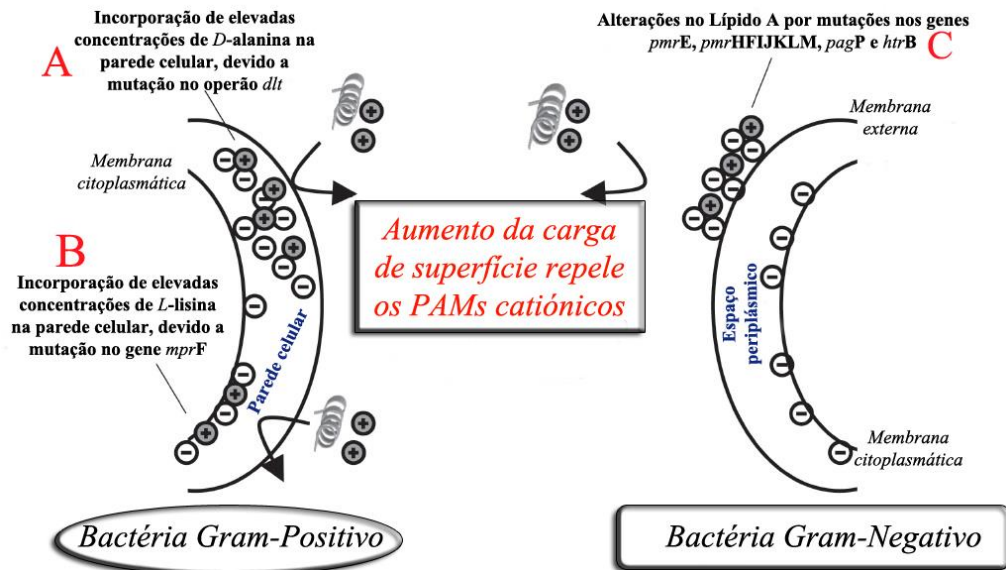
**Figura 12** - Estrutura geral dos péptidos antimicrobianos com o domínio hidrofóbico que é inserido na membrana celular da bactéria e o domínio catiónico essencial para a ligação à membrana (Adaptado de Baltzer e Brown, 2011).

Estrutura do péptido	$\alpha$ -hélice	Folha $\beta$ -pregueada	Linear	Laço	Cíclico
Exemplo	Magainina 2	Defensina	Indolicidina	Tanatina	Defensina RTD-1
Modelo Estrutural					
Origem	<b>Sapo</b> <i>Xenopus laevis</i>	<b>Coelho</b> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	<b>Gado Bovino</b> <i>Bos taurus</i>	<b>Percevejo</b> <i>Podisus maculiventris</i>	<b>Macaco</b> <i>Rhesus macaques</i>
Nº de Ligações dissulfeto	-	3	-	1	3

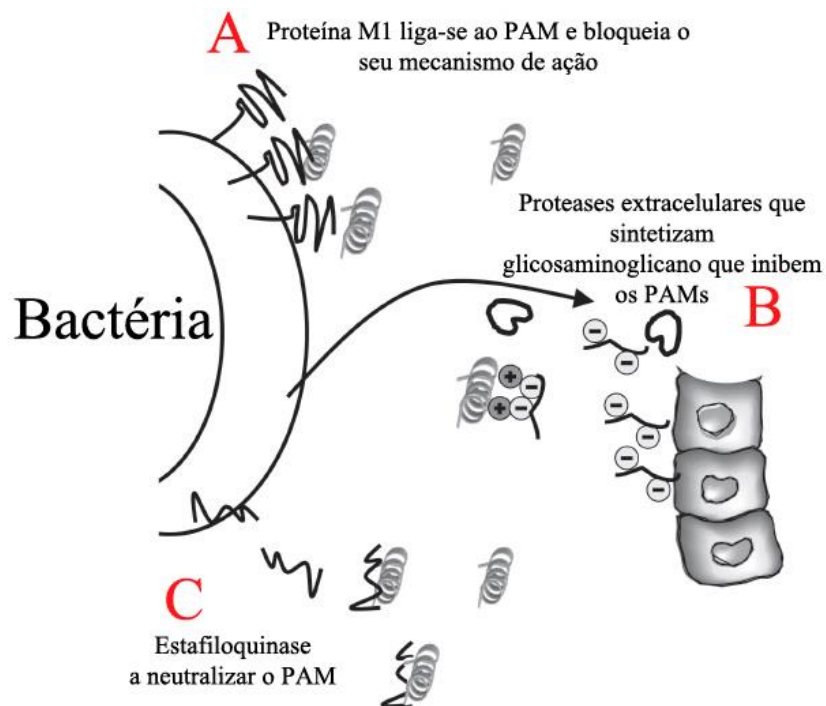
**Tabela 3** - Classificação dos PAMs segundo a sua estrutura terciária e o número de ligações dissulfeto (Adaptado de Bruhn *et al.*, 2011).



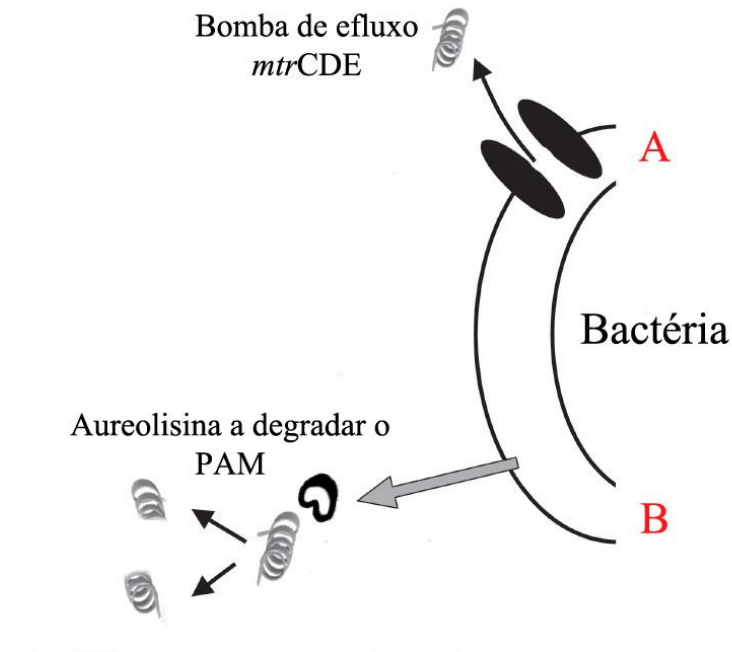
**Figura 13** - Os diversos mecanismos de ação dos PAMs (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006).



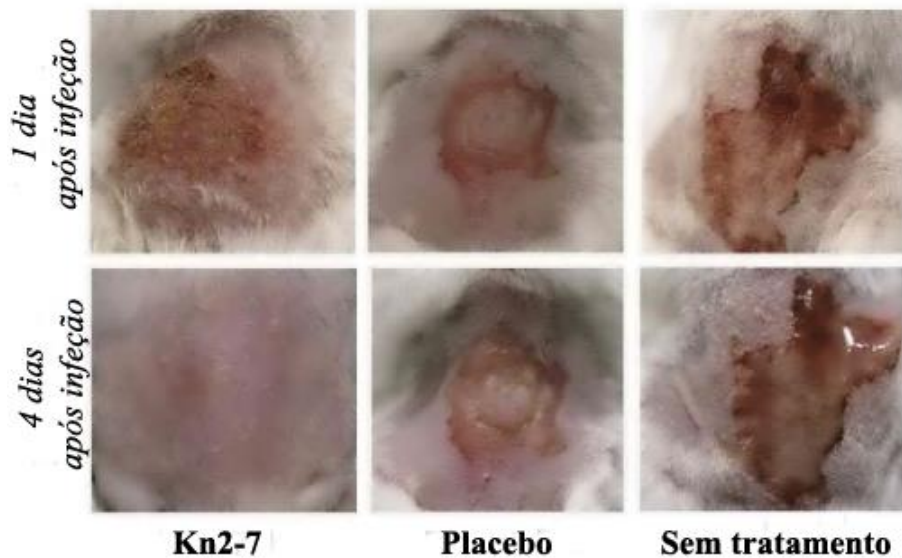
**Figura 14** - Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por alterações na carga de superfície (Adaptado de Nizet, 2006).



**Figura 15** - Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por neutralização ou ligação ao PAM (Adaptado de Nizet, 2006).



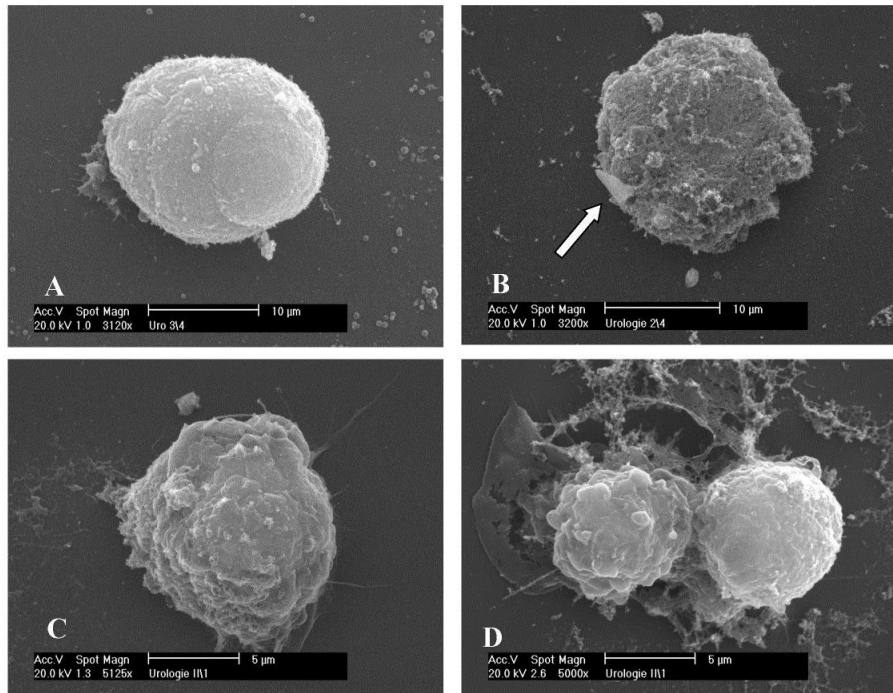
**Figura 16** - Mecanismo de resistência das bactérias aos PAMs mediada por bombas de efluxo ou desnaturação proteica provocada por proteases (Adaptado de Nizet, 2006).



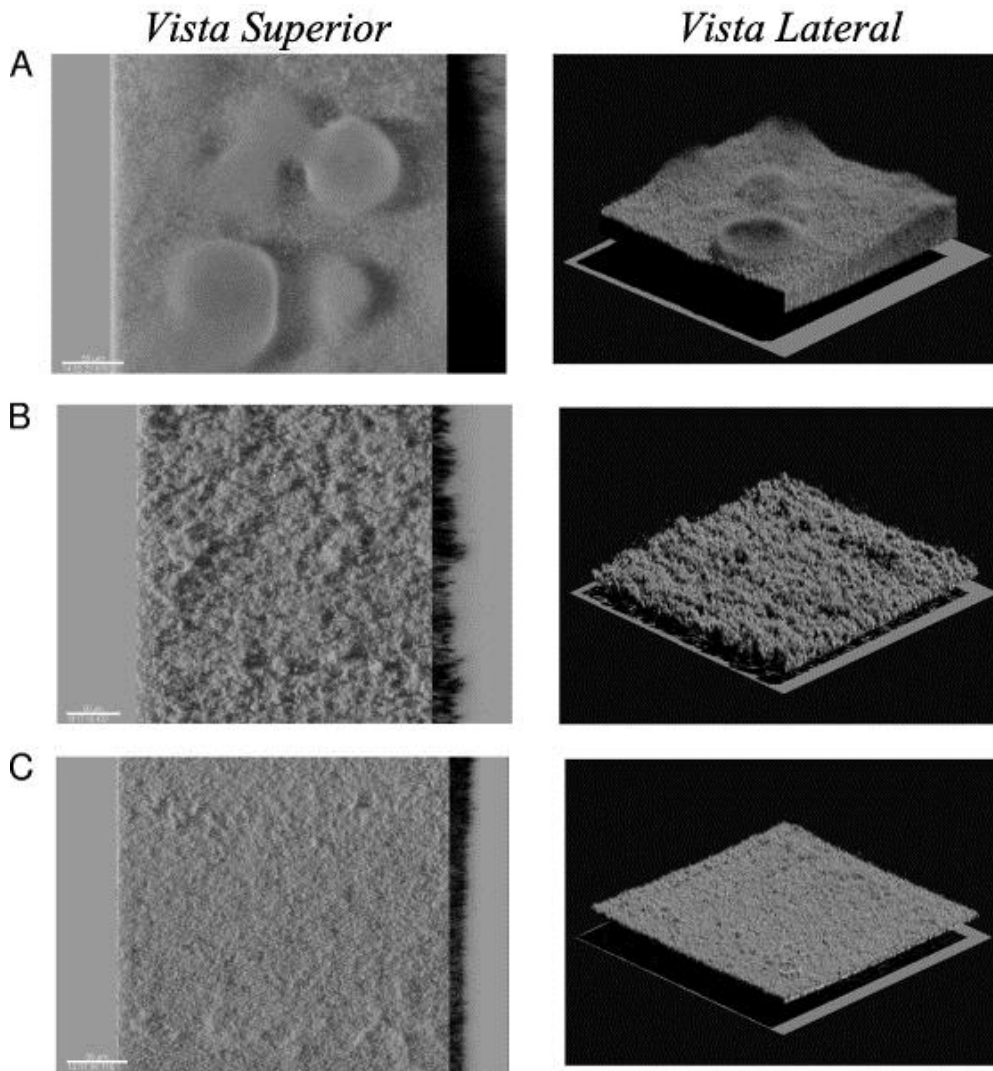
**Figura 17** - Evolução da infecção cutânea provocada por *Staphylococcus aureus* de ratos que receberam placebo e sem e com tratamento com Kn2-7 (Retirado de Cao *et al.*, 2012).

**Tabela 4** - Exemplos de concentrações mínimas inibitórias de Kn2-7 e BmKn2, em  $\mu\text{g/mL}$ , contra diversos tipos de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (Adaptado de Cao *et al.*, 2012).

	Espécies	Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		Kn2-7	BmKn2
Bactérias Gram-Positivo	<i>Staphylococcus aureus</i> AB94004	3,13	6,25
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,13	6,25
	<i>Bacillus subtilis</i> AB91021	6,25	12,5
	<i>Bacillus thuringiensis</i> AB92037	6,25	12,5
	<i>Micrococcus luteus</i> AB93113	6,25	6,25
Bactérias Gram-Negativo	<i>Escherichia coli</i> AB94012	6,25	> 100
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	> 100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AB93066	25	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO92994	50	> 100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO93052	100	> 100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO93056	50	> 100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO93085	50	> 100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AO93115	100	> 100



**Figura 18** - Efeito da cecropina B nas membranas celulares de células tumorais da bexiga e em fibroblastos utilizados como controlo. **A)** célula tumoral da bexiga sem tratamento. **B)** célula tumoral da bexiga após administração de 65 μM de cecropina B. **C)** fibroblasto da gengiva utilizado como controlo. **D)** fibroblastos sem alterações na sua morfologia após período de incubação com 65 μM de cecropina B (Retirado de Suttman *et al.* 2008).



**Figura 19** - Análise do Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e a exposição ao LL-37. **A)** *Pseudomonas aeruginosa* inoculada no meio estéril sem LL-37: pode visualizar-se a formação de várias microcolónias e uma espessura de  $50 \pm 5 \mu\text{m}$ , após 4 dias de incubação a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . **B)** *Pseudomonas aeruginosa* inoculada no meio estéril com  $4 \mu\text{g/ml}$  de LL-37 (1/6 da concentração mínima inibitória): ocorreu a redução da espessura para  $25 \pm 5 \mu\text{m}$ , ou seja para metade do valor indicado pelo controlo, o que sugere que a LL-37 inibiu a proliferação do biofilme. **C)** Adição de  $4 \mu\text{g/ml}$  de LL-37 a um biofilme em desenvolvimento inibe completamente a proliferação do mesmo (Retirado de Overhage *et al.*, 2008).

**Tabela 5** - Exemplos e aplicações de vários tipos de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativo e Gram-positivo (Adaptado de Gillor, *et al.*, 2005)

Bacteriocina	Espécie produtora	Aplicação	Tipo
Lantiopeptina	<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	Tratamento de herpes	Lantibiótico
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tratamento de infeções cutâneas	Lantibiótico
Lacticina 3147	<i>Lactococcus lactis</i>	Tratamento de mastites	Lantibiótico
Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	Ativa contra MRSA	Lantibiótico
Mutacina	<i>Streptococcus mutans</i>	Tratamento de cáries dentárias	Lantibiótico
E1, E4, E7	<i>Escherichia coli</i>	Tratamento de colites hemorrágicas	Colicina
24, J25, L	<i>Escherichia coli</i>	Tratamento de infeções provocadas por <i>Salmonella sp</i>	Microcina
B17	<i>Escherichia coli</i>	Agente antibacteriano aplicado em bovinos	Microcina
S-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tratamento de infeções pulmonárias	Piocina

**Tabela 6** - Classificação e características das LAB bacteriocinas (Adaptado de Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

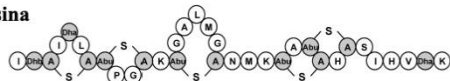
Classificação		Características	Exemplos
Classe I (Lantibióticos)	Lantibióticos I	Aminoácidos introduzidos após o processo de tradução pela LanB e LanC	Nisina A, Subtilina, Epidermina, Pep5
	Lantibióticos II	Aminoácidos introduzidos após o processo de tradução pela LanM	Lacticina 481, Nukacina ISK-1, Mersacidina, Lacticina 3147
Classe II	Classe IIa	Bacteriocinas idênticas à pediocina, ativas contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Pediciocina PA-1 (AcH), Leucocina A
	Classe IIb	Bacteriocinas dipeptídicas	Lactococcina G e Q
	Classe IIc	Bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS-48, Gassericina A, Lactociclicina Q
	Classe IId	Bacteriocinas mono-peptídicas lineares	Lactococcina A, Lacticina Q
Classe III	-	Bacteriocinas sensíveis à temperatura	Lactococcina B
Classe IV	-	Bacteriocinas associadas a estruturas lipídicas e hidratos de carbono	Leucocina S, Mesenterocina 52

**Bacteriocinas sintetizadas por Bactérias Gram-positivo**

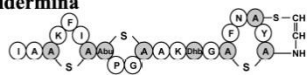
**Classe I**

Classe I dos Lantibióticos

**Nisina**



**Epidermina**

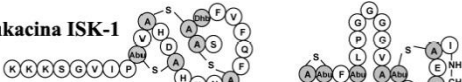


**Pep5**

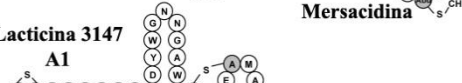


Classe II dos Lantibióticos

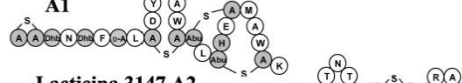
**Nukacina ISK-1**



**Lacticina 3147**



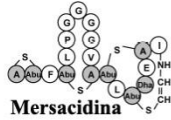
**A1**



**Lacticina 3147 A2**



**Mersacidina**



**Classe II**

Classe IIa

**Pediocina PA-1 /AcH**



Classe IIb

**Lactococina Q**



Classe IIc

**Lactociclina Q**



Classe IId

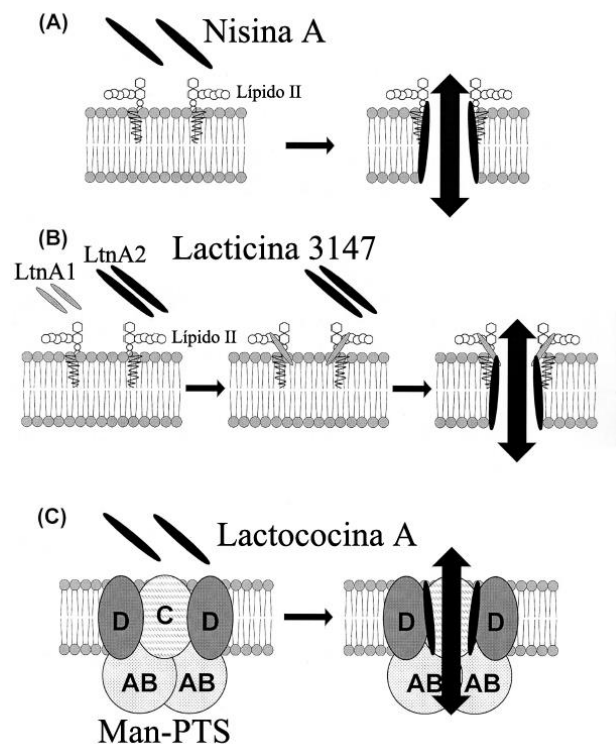
**Lactococina A**



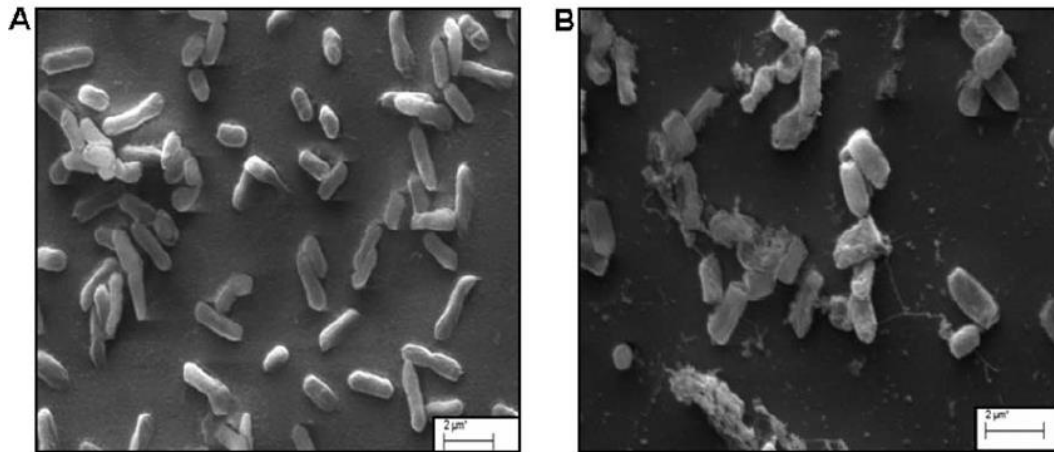
**Lactococina A**



**Figura 20** - Exemplos de estruturas de diversas bacteriocinas das classes I e II (Adaptado de Nishie *et al.*, 2012).



**Figura 21** - Exemplos de mecanismos de ação da nisina A (A), lacticina 3147 (B) e lactococina A (C), pertencentes às classes I e II das bacteriocinas (Adaptado de Nishie *et al.*, 2012).



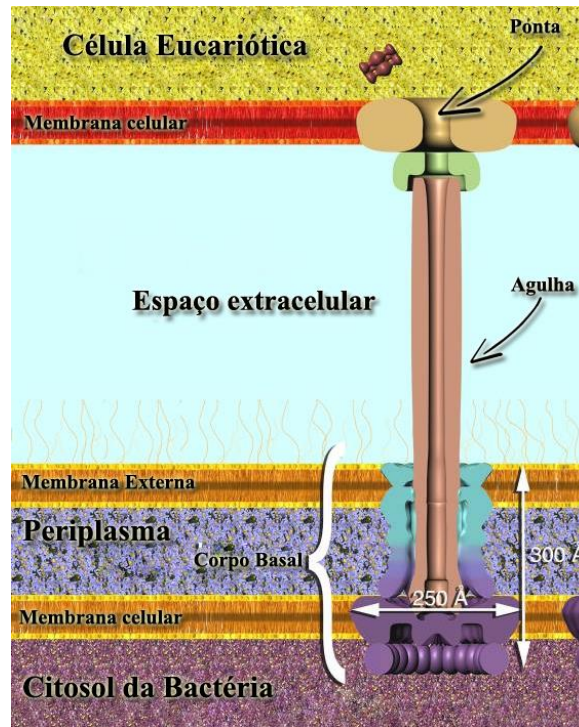
**Figura 22** - Efeito bactericida da laterosporulina na *Escherichia coli*, antes do tratamento (A) e 4 horas após a administração de 500 µg/ml de laterosporulina (Retirado de Nishie *et al.*, 2012).

**Tabela 7** - Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias isoladas do ambiente marinho (Adaptado de Desriac *et al.*, 2010).

Espécie produtora	Bacteriocina	Espécie inibida	Origem
<i>Listonella anguillarum</i> AVP10	Vibriocina AVP10	<i>Escherichia coli</i> e <i>Listonella anguillarum</i> AVS9	Peixe-gato ( <i>Arius thalassimus</i> )
<i>Vibrio vulnificus</i>	IW1, BC1, BC2	<i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Escherichia coli</i>	Amostras de água obtidas em Wilmigton (Estados Unidos da América)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BLIS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Amostra de água obtida em tanque contendo crocodilos
<i>Pseudoalteromonas</i> sp X153	P-153	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Propionibacterium granulosum</i>	Amostras obtidas na zona litoral de Brittany (Norte da França)

**Tabela 8** - Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias probióticas e sua aplicação (Adaptado de Gillor *et al.*, 2008).

Bacteriocina	Espécie produtora	Espécie inibida	Aplicação como probiótico
<b>Gram-Positivo</b>			
ABP-118	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prevenção de infecções gástricas
Bovimine™	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Prevenção de infecções no cólon em bovinos
Bacilocina22	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Tratamento de faringites em humanos
Salivaricina	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Tratamento de faringites em humanos
Salivaricina A e B	-	<i>Streptococcus sobrinus</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	Prevenção de cáries em humanos
Salivaricina B	-	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Eubacterium saburreum</i>	Tratamento da halitose em humanos
Salivaricina	<i>Streptococcus salivarius</i> CRL1328	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tratamento e prevenção de infecções vaginais
Pediocina	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	Prevenção de infecções gástricas
Enterocina	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Salmonella dusseldorf</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella pullorum</i>	Prevenção de infecções gastrointestinais
<b>Gram-Negativo</b>			
Colicina E2, E7, E8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Prevenção de infecções gastrointestinais em bovinos
Microcina 24	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Inibe infecções GI em aves



**Figura 23** - Organelo bacteriano com a estrutura em agulha que permite a libertação das toxinas diretamente para o interior das células eucarióticas (Adaptado de Marlovits e Stebbins, 2010).

**Tabela 9** - Exemplos de anticorpos que se encontram em ensaios clínicos (Adaptado de Fernebro, 2011).

Anticorpo	Bactéria alvo	Empresa produtora
Anthim (ETI-204)	<i>Bacillus anthracis</i>	Elusys Therapeutics
Raxibacumab	<i>Bacillus anthracis</i>	Human Genome Sciences
Valortim (MDX-1303)	<i>Bacillus anthracis</i>	PharmAthene, Medarex
CDA1 e CDB1	<i>Clostridium difficile</i>	Medarex, Merck, MassBiologics
ShigamAbs	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga	Thallion Pharmaceuticals
Urtoxazumab	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga	Teijin
Anti- <i>Pseudomonas</i> Igγ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Immunsystem
KB001	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KaloBios Pharmaceuticals, Sanofi Pasteur
Panobacumab (KBPA101)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kenta Biotech
Pagibaximab	<i>Staphylococcus aureus</i>	Biosynexus