



Emanuela Oliveira Ribeiro

**Terapia Fágica: Passado, Presente e Futuro**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012





Emanuela Oliveira Ribeiro

**Terapia Fágica: Passado, Presente e Futuro**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Emanuela Oliveira Ribeiro

**Terapia Fágica: Passado, Presente e Futuro**

Trabalho elaborado por:

---

Orientadora: Professora Doutora Cristina Abreu

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Declaração de Integridade**

Eu, Emanuela Oliveira Ribeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração desta dissertação de mestrado.

Nesse sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual ou partes dele). Declaro ainda que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Universidade Fernando Pessoa, 26 de Setembro de 2012

Assinatura:

---

Este trabalho não se encontra escrito conforme o novo acordo ortográfico.

## Sumário

O termo bacteriófago resulta da associação de duas distintas designações, “bactéria” e “phagein”. Deste modo, um bacteriófago é um ser capaz de devorar bactérias. Como tal, este bacteriófago, ou apenas fago, como também é denominado, é o centro de aplicabilidade da Terapia Fágica.

As infecções bacterianas são actualmente uma constante preocupação, não só para o Homem, como também para as plantas e animais, isto porque, a sensibilidade por elas demonstrada perante o tratamento com antibióticos se mostra presentemente comprometida.

Revela-se nesta fase, a administração de bacteriófagos uma prática bastante promissora. Os fagos mostram-se capazes de lisar a bactéria infectante sem que se mostrem prejudiciais para o Homem.

Contraposta à terapêutica antibiótica, a terapia fágica apresenta maior selectividade, maior eficácia, menor custo e maior capacidade de contornar a resistência bacteriana.

Torna-se imprescindível a aposta científica nesta área ainda em descobrimento, especialmente no que se refere ao aprofundamento de estudos específicos que simulem as mais variadas condições do organismo humano.

**Palavras chave:** Terapia Fágica; bacteriófagos; infecções bacterianas; antibióticos

## **Abstract**

The term bacteriophage results from the association of two distinct designations, "bacteria" and "phagein". Thus, a bacteriophage is a being able to eat bacteria. This way, this bacteriophage, or just phage, as it is also called, is the center of applicability of phage therapy.

Bacterial infections are a constant concern today, not only when in humans, but also when in plants or animals, because, their sensibility to the treatment with antibiotics is presently compromised.

At this phase, the administration of bacteriophages is quite promising. Phage is capable of lysing the infecting bacteria without being harmful to humans.

Unlike the antibiotic therapy, the phage therapy has higher selectivity, higher efficacy, lower cost and greater ability to bypass the bacterial resistance.

It becomes essential the scientific bet in this area, which is still growing, especially in what regards to further specific studies, simulating the most various conditions of the human body.

**Key words:** Phage Therapy; bacteriophages; Bacterial infection; Antibiotic.

## **Agradecimentos**

Com o término desta grande etapa académica, não poderia deixar de prestar uma palavra de apreço a todos aqueles que de uma forma ou de outra estiveram presentes nos bons e maus momentos.

À minha irmã, Liliana, por todas as horas passadas em consulta a ouvir os meus desabafos, pela amizade e pelos sábios conselhos prestados.

À minha mãe pela paciência cedida de manhã, à tarde e à noite, pelo respirar fundo e o sorriso fácil. Ao meu pai, pelos sacrifícios e pelas repreensões que tanta responsabilidade me inculciam. À minha avó pelas lágrimas orgulhosas que largou.

Um agradecimento especial ao meu avô, a quem recorri nos momentos difíceis e a quem agradei nos momentos gloriosos, estou certa que esteve sempre a olhar por mim.

À Professora Doutora Cristina Abreu pelo apoio e orientação neste projecto.

Ao Ricardo, pela paciência cedida nos momentos de fraqueza, pelo amor e companheirismo.

Também para a Leonor, o meu muito obrigada, pela amizade, a solidariedade, e as horas a fio de conversas nesta etapa em comum. Um grande pilar.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>12</b> |
| 1.1. DEFINIÇÃO.....  | 13        |
| 1.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÓMICA.....   | 15        |
| 1.3. CICLO DE VIDA.....  | 16        |
| <b>I. ORIGEM DA TERAPIA FÁGICA .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>II. APLICAÇÕES DA TERAPIA FÁGICA .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>III. SEGURANÇA.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>IV. FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAM A SUA VIABILIDADE .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>V. A ERA DO ANTIBIÓTICO E O DECRÉSCIMO DA TERAPIA FÁGICA..</b>  | <b>30</b> |
| <b>VI. REAPARECIMENTO DA TERAPIA FÁGICA. BENEFÍCIOS E<br/>OBSTÁCULOS À SUA IMPLEMENTAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA.....</b> | <b>32</b> |
| <b>VII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>VIII. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>IX. BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>41</b> |

## **Índice de Figuras**

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Estrutura de um Bacteriógado do Tipo T4.....                   | 14 |
| Tabela 2 Principais famílias e características de Bacteriófagos.....    | 16 |
| Figura 3 Esquema ilustrativo de ciclo de vida lítico e lisogênico ..... | 18 |

## **Abreviaturas**

GI: Gastrointestinais

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

µm: micrómetro

E. coli: Escherichia coli

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drugs Administration

GRAS: Generally Recognizes as Safe

## I. Introdução

A presente dissertação é parte integrante do mestrado, em Ciências Farmacêuticas, a concluir na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

O tema da dissertação de mestrado apresentada é *Terapia Fágica: Passado, Presente e Futuro*. A escolha do mesmo foi motivada pelo interesse na área da microbiologia e, em particular, do combate às infecções bacterianas.

Esta revisão bibliográfica, baseia-se na pesquisa, em artigos científicos e similar material de apoio à sua execução teórica, previamente publicado, recorrendo para tal a fontes de investigação credíveis, como Pubmed e b-on.

A Terapia Fágica foi essencialmente desenvolvida na Europa de Leste, onde continua a ser praticada. Este facto justifica a existência de um reduzido número de artigos científicos publicados, especialmente no que se refere a edições na língua inglesa.

O aparecimento do antibiótico, revelando-se uma alternativa altamente capaz de combater infecções bacterianas, causou um declínio na investigação da Terapia Fágica.

Porém, o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos provocou o renascimento do interesse na Terapia Fágica, levando a um reavivar da investigação clínica nesta área.

O presente trabalho pretende expor as dificuldades atravessadas por esta opção terapêutica, no que concerne ao tratamento de infecções bacterianas, contrapondo a mesma com as alternativas terapêuticas existentes, revelando as vantagens e desvantagens deste tipo de terapêutica.

Diversas são as áreas de aplicação analisadas, nomeadamente a clínica, a veterinária, a alimentar e a agrícola, sendo expostas, individualmente, as suas necessidades, bem como, as mais valias obtidas com a implementação desta terapia.

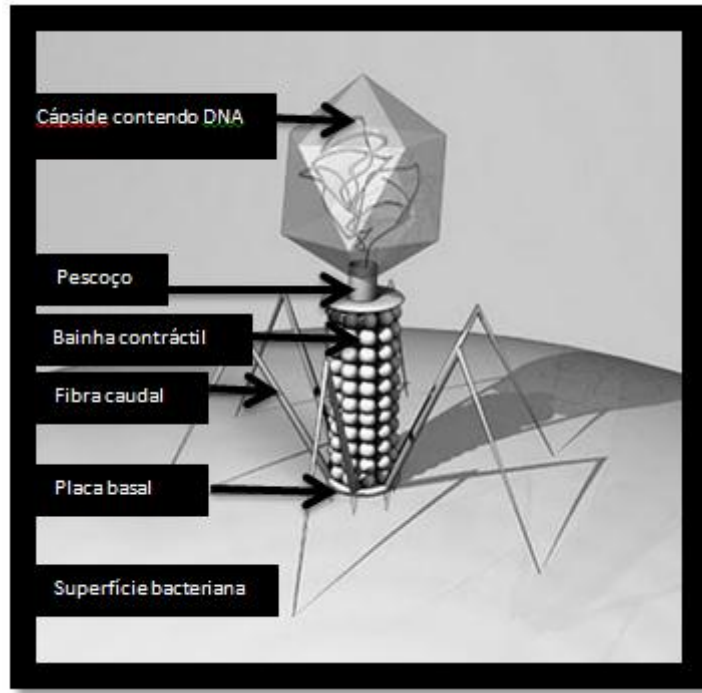
O presente é mencionado como uma realidade, sendo feita uma alusão a inúmeras práticas clínicas já implementadas, bem como a produtos diversos actualmente existentes no mercado. O futuro é revelado como risonho, sugerindo no mesmo, a aplicabilidade desta terapia nas mais diversas áreas, algumas das quais a carecer de uma alternativa sólida e viável.

### **1.1. Definição**

Os fagos são considerados uma “arma” para combater bactérias (Hanlon, 2007). Estes, também conhecidos como bacteriófagos, definem-se como vírus de bactérias que, ao afectarem o metabolismo daquelas, são responsáveis pela sua morte (Sulakvelidze *et al*, 2001).

Sabe-se que entre 10 a 80% das mortes bacterianas são causadas pelos fagos, sendo assim estes, considerados, um factor limitante destas populações tão comumente causadoras de infecções no Homem (Jończyk *et al*, 2011).

A grande maioria destes vírus, exceptuando os filamentosos, possui um genoma constituído geralmente por uma dupla fita de ácido desoxirribonucleico (ADN), protegido por uma cápside poliédrica proteica - a cabeça (Figura 1). Associada a esta cápside está ainda uma estrutura helicoidal proteica, a cauda, local através do qual passa o ácido nucleico para as células bacterianas no momento de infecção. Na extremidade da cauda estão incorporadas geralmente seis fibras, as quais são responsáveis pela adsorção do fago à célula bacteriana, graças à existência de receptores específicos para a superfície da mesma (Inal, 2003).



**Figura 1.** Estrutura de um Bacteriófago do Tipo T4 (Adaptado de Carlos, 2012).

Existem também fagos, embora em menor quantidade, que apresentam ARN como ácido nucleico. Todavia, independentemente de se tratar de ADN ou ARN, esta cadeia pode ser simples, dupla ou linear, segmentada, circular ou helicoidal (Henriques, 2008).

Bacteriófagos cuja cápside apresente maiores dimensões, têm uma maior capacidade de sobreviver em condições adversas, em detrimento dos que têm uma cápside com dimensões mais reduzidas (Jończyk *et al*, 2011).

São parasitas bacterianos obrigatórios, específicos. São também capazes de penetrar em diferentes órgãos e tecidos, entre os quais o Sistema Nervoso. Têm dimensões compreendidas entre 20 e 100  $\mu\text{m}$ , admitindo-se uma inter-relação específica bactéria-vírus presente em todas as bactérias (Kropinski, 2006).

Tal como outros vírus, os fagos podem também ser caracterizados consoante a sua gama de hospedeiros. Por exemplo, alguns fagos provocam lise a uma espécie específica de bactérias (por exemplo, *Escherichia coli*), enquanto outros têm como alvo um espectro bastante mais alargado, considerando-se estes últimos mais adequados à aplicação terapêutica (Kropinski, 2006).

## **1.2. Classificação taxonómica**

No que se refere à sua classificação taxonómica, também diversas evoluções foram ocorrendo ao longo da história (Ackermann, 2007).

Com o aparecimento dos primeiros tipos de fagos foram surgindo as primeiras classificações, embora, só por volta de 1940, com o aparecimento do microscópio electrónico é que esta classificação se tornou mais descritiva e rigorosa, uma vez que já se mostrava possível a medição dos componentes estruturais do fago (Ackermann, 2007).

Em 1960, era já possível diferenciar o material genético fágico, podendo assim acrescentar mais um relevante parâmetro de classificação (Ackermann, 2007).

Diversas actualizações vão surgindo na classificação taxonómica dos bacteriófagos. A Tabela 1 reúne as principais famílias de fagos tidas em consideração na actualidade, salientando as suas principais características (Hanlon, 2007).

**Tabela 1** Principais famílias e características de Bacteriófagos

(Adaptado de Hanlol, 2007).

| Forma       | Ácido Nucleico |                                  | Grupo de Vírus   | Particularidades                          | Exemplo     |
|-------------|----------------|----------------------------------|------------------|---|-------------|
| Cauda       | ADN            | cadeia dupla/linear              | Myoviridae       | Cauda contráctil                          | T4          |
|             |                |                                  | Siphoviridae     | Cauda longa não contráctil                | $\Lambda$   |
|             |                |                                  | Podoviridae      | Cauda curta                               | T7          |
| Poliédrico  | ADN            | cadeia simples/circular          | Microviridae     | Capsómeros                                | $\Phi$ X174 |
|             |                | cadeia dupla/circular/segmentada | Corticoviridae   | Capside complexo, lípidos                 | PM2         |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Tectiviridae     | Vesícula lipidica interior<br>pseudocauda | PRD1        |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Grupo SHI        | Vesícula lipidica interior                | SH1         |
|             |                | cadeia dupla/circular            | Grupo STV1       | Torre                                     | STIV        |
|             | ARN            | cadeia simples/linear            | Leviviridae      | Tipo poliovirus                           | MS2         |
|             |                | cadeia dupla/linear/segmentada   | Cystoviridae     | Invólucro, lípidos                        | $\Phi$ 6    |
| Filamentoso | ADN            | cadeia simples/circular          | Inoviridae       | filamentos longos<br>hastes curtas        | fd<br>MVL1  |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Lipothrixvitidae | Invólucro, lípidos                        | TTV1        |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Rudiviridae      | Tipo TMV                                  | SIRV-1      |
| Pleomórfico | ADN            | cadeia dupla/circular/segmentada | Plasmaviridae    | Invólucro, lípidos,<br>sem cápside        | L2          |
|             |                | cadeia dupla/circular/segmentada | Fuselloviridae   | Forma de limão                            | SSV1        |
|             |                | cadeia dupla/linear/segmentada   | Salterprovirus   | Forma de limão                            | His1        |
|             |                | cadeia dupla/circular/segmentada | Guttaviridae     | Forma de gota                             | SNDV        |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Ampullaviridae   | Forma de garrafa                          | ABV         |
|             |                | cadeia dupla/circular            | Bicaudaviridae   | Duas caudas                               | ATV         |
|             |                | cadeia dupla/linear              | Globuloviridae   | Tipo paramyxovirus                        | PSV         |

### 1.3. Ciclo de vida

Os bacteriófagos possuem essencialmente quatro ciclos de vida. São eles designados por ciclo de vida lítico, lisogénico, pseudo-lisogénico/persistente ou o ciclo de vida do tipo de infecção crónica. São, os dois primeiros, os tipos de ciclo fágico mais atractivos para a terapêutica, uma vez que, se o primeiro leva directamente à lise da célula bacteriana, o segundo pode, mediante estímulos específicos, provocar de igual modo a

sua morte, uma vez que o efeito destes estímulos induz também um percurso lítico (Costa, 2010).

Um bacteriófago pode classificar-se em virulento ou temperado, consoante sofra um ciclo lítico ou lisogênico, respectivamente (Deresinski, 2011).

São diversas as etapas que se realizam desde um primeiro contacto fago-célula bacteriana até à destruição desta célula hospedeira, se for caso disso. É a extremidade distal da cauda dos fagos a responsável pela adsorção destes às bactérias. Esta conexão específica entre as fibras do bacteriófago com a superfície bacteriana vai determinar a afinidade que dado fago possui para determinada bactéria. Após a união entre ambas as superfícies, o bacteriófago injecta o seu conteúdo genético (ácido nucleico) para o interior da bactéria alvo onde será posteriormente transcrito. Seguidamente, pode dar-se início a um dos dois possíveis ciclos de vida fágica (Deresinski, 2011).

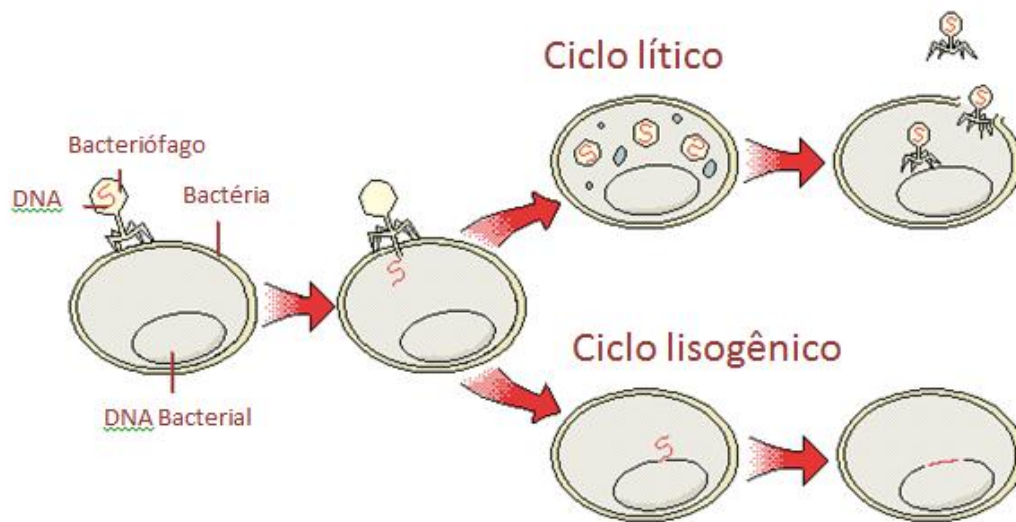
Fagos virulentos (ex. KVP 20 e fagos do Tipo-T) são geralmente considerados mutantes dos temperados (ex.  $\phi$ MR11 e  $\lambda$ ), sendo os primeiros responsáveis pela lise da bactéria que infectam, com término do seu ciclo de vida caracterizado pela libertação de novos fagos. Assim, bacteriófagos que sofram um ciclo de vida lítico, após encontrarem o seu material genético na célula bacteriana, dirigem todas as “operações” que ocorram no interior da mesma. Dá-se a degradação do genoma da bactéria, reutilizando os seus nucleótidos na replicação do ADN fágico, sintetizam-se partículas fágicas funcionais e estruturais, montam-se os componentes de estrutura, dando-se então origem a viriões, com consequente lise do hospedeiro (Kropinski, 2006).

Em média, estima-se que cada bacteriófago produza no final do seu ciclo de vida cerca de 200 novos fagos (Carlton, 1999). Mesmo que o número inicial de bactérias infectantes seja superior ao número de partículas fágicas, este último acaba por exceder o número de bactérias após várias gerações, não só porque a sua produção é feita em larga escala, como também porque as bactérias envolvidas acabam por ser destruídas (Matsuzaki, *et al*, 2005).

Por outro lado, o ciclo de vida lisogênico, caracteriza-se pela persistência de material genético do vírus na célula hospedeira por tempo indefinido –profago. No entanto, esta condição pode alterar-se se ocorrer um estímulo do meio que provoque a sua saída deste estado, voltando novamente a ser considerado um fago, estado este em que provocará a

lise bacteriana- ciclo de vida lítico. Esta permanência do material genético na bactéria pode verificar-se de duas distintas formas: ou integrado no cromossoma bacteriano, sendo que é esta a via mais comum, ou separado desse cromossoma permanecendo sob a forma de “plasmídeo”. O profago replica-se juntamente com o cromossoma bacteriano, sendo transmitido também às células filhas (Inal, 2003; Amaral *et al*, 1995).

Segundo Kropinski (2006), fagos temperados são raramente usados com finalidades terapêuticas, uma vez que, se por um lado não lisam a totalidade das bactérias que infectam, por outro, devido a determinados genes dos quais são possuidores, podem potenciar a virulência dessas mesmas bactérias segundo um fenómeno descrito por “conversão lisogênica”.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo de ciclo de vida lítico e lisogênico

(Adaptado de [www.sabedoria.ebrasil.net](http://www.sabedoria.ebrasil.net)).

A utilidade fágica assenta essencialmente na capacidade que estes vírus têm para lisarem a célula bacteriana, daí que, fagos do tipo filamentosos (ex. M13) não tenham interesse marcado, uma vez que a expulsão fágica deste género viral é feita por mecanismos secretórios, não levando desse modo à lise da célula bacteriana (São José *et al*, 2007).

Esta degradação da parede bacteriana deve-se essencialmente à acção de lisinas e também holinas, proteínas fágicas, codificadas no genoma de bacteriófagos de cadeia duplas de ADN. Lisinas são enzimas capazes de hidrolisar o peptidoglicano da parede celular. Holinas, por outro lado, formam uma “cavidade” na membrana celular, facilitando a acção de lisinas ao permitir-lhes o alcance do exterior do peptidoglicano. Dá-se desta forma a libertação da progenia fágica (Loessner, 2005; Young *et al.*, 2000).

Bacteriófagos de dimensões mais reduzidas, nomeadamente aqueles que não apresentem cauda na sua estrutura, como é o caso do  $\Phi$ X174, não possuem os genes que codificam as proteínas mencionadas, lisinas e holinas, uma vez que estes são expressos pela cauda. Nestes casos, a degradação do peptidoglicano encontra-se comprometida. (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Para compensar esta falta, estes fagos, inibem a síntese da parede celular, ou seja, produzem uma enzima que inibe a síntese do peptidoglicano, presente na parede celular bacteriana (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Por não possuir um metabolismo próprio, todas as etapas da replicação propriamente dita do bacteriófago são altamente dependentes da célula que infecta (Matsuzaki *et al.*, 2005).

O primeiro contacto entre o fago e a célula bacteriana é conseguido por um processo de adsorção, no qual se reúnem condições para que seja efectuada uma ligação do fago a um receptor específico presente na superfície da célula bacteriana, geralmente uma proteína ou um açúcar (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Esta primeira fase de adsorção reflecte-se em três distintas sub-fases: um contacto inicial, uma ligação reversível e uma ligação irreversível. O primeiro contacto permite a chegada do fago à célula bacteriana, através de movimentos Brownianos e de efeitos de difusão. Segue-se uma ligação fraca e reversível, terminando numa ligação forte, estável e irreversível, actuando nesta fase as anteriormente descritas enzimas hidrolíticas que facilitam a passagem de material genético pela parede bacteriana (Costa, 2010).

Esta passagem do material genético é já integrada numa segunda fase deste mecanismo. Assim, o vírus, após adsorvido à parede celular bacteriana, injecta o seu conteúdo genético para o interior da célula, graças à existência de “poros” previamente abertos na parede (Matsuzaki *et al.*, 2005). Em alternativa a esta injeção, o vírus pode também ser

introduzido na célula bacteriana por processos de endocitose, translocação ou fusão do invólucro fágico (Costa, 2010).

Quando já no interior no citoplasma bacteriano, o material genético fágico pode sofrer, como já foi referido, um de quatro distintos processos, o lítico, o lisogénico, o pseudo-lisogénico ou persistente, ou o do tipo de infecção crónica. O processo lítico e o lisogénico desencadeiam os anteriormente referidos ciclos de vida lítico e lisogénico, respectivamente (Costa, 2010).

No processo de infecção crónica o genoma fágico não é recombinado com o genoma da célula bacteriana, havendo todavia de igual forma produção de novas partículas fágicas, embora em menor quantidades. Não se verifica nesta alternativa a lise celular (Costa, 2010).

A via menos conhecida, crendo-se porém a mais comum na Natureza, é a persistente. Neste caso o material genético fágico não é inserido no genoma bacteriano, não despoletando subsequente lise celular (Costa, 2010).

Daqui para a frente, o bacteriófago apodera-se da maquinaria celular bacteriana para produzir novas moléculas de forma sequencial, como proteínas, enzimas e outros compostos necessárias à formação de novas partículas virais (Comeau e Krisch, 2005).

A destruição da membrana citoplasmática, permite numa última fase facilitar o processo de lise celular, onde se dá a libertação de componentes celulares e das novas partículas fágicas, para o meio exterior (Sillankorva, 2004).

## **I. Origem da Terapia Fágica**

Em 1896, Ernest Hankin relatou uma intensa actividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* nas águas do rio Jumna na Índia, atribuindo responsabilidade deste fenómeno a microrganismos de dimensões micrométricas, que tinham a capacidade de limitar as epidemias de cólera (Hankin, 1896).

Nos anos que se seguiram, foram diversos os testemunhos de vários historiadores descrevendo fenómenos similares. É o caso de Gamaleya, que dois anos após o

testemunho de Hankin, que afirmou ter assistido a um fenômeno semelhante durante um trabalho com *Bacillus subtilis* (Helvoort, 1992).

Em 1915, o bacteriologista Frederick Twort reintroduziu o tema, após ter visualizado um fenômeno semelhante ao de Hankin, em experiências de crescimento de vírus em meio de cultura artificial. Twort observou então que as placas se encontravam contaminadas com bactérias, porém, as suas colônias tinham um aspecto transparente, não se conseguindo reproduzir, uma vez que sofriam lise (Twort e Lono, 2011).

Já nesta fase o acontecimento fora atribuído a uma espécie viral. Porém, uma vez mais, este estudo não foi desenvolvido, devendo-se esta inexploração sobretudo a dificuldades financeiras (Twort e Lono, 2011).

O termo bacteriófago foi oficialmente empregue apenas em 1917, graças ao contributo de Felix d'Herelle nesta investigação. Este microbiologista francês vê a sua descoberta associada ao surto de graves hemorragias e disenteria nas tropas francesas, durante a Primeira Guerra Mundial (d'Herelle, 1917).

Estudos laboratoriais levaram-no assim a concluir que a solução para este problema estaria nestes vírus, concluindo que são mortíferos para a bactéria hospedeira, permanecendo inofensivos para o Homem (d'Herelle, 1917).

Também d'Herelle foi responsável pela atribuição da denominação de “bacteriófago” como a conhecemos hoje. Esta tem origem de dois termos distintos porém bastante relacionados neste campo, o termo “bactéria” e o termo “phagein”. Este último significa na língua grega “comer” ou “devorar”. Assim “bacteriófago” mais não é que um ser que come/devora bactérias (Sulakvelidze, 2001).

Foi no Verão de 1918, um ano após o surto hemorrágico nas tropas francesas, que o bacteriologista conseguiu isolar o primeiro bacteriófago. D'Herelle afirmou haver diferenças entre o fenômeno que visualizou e o observado por Frederick Twort, porém, diversos cientistas referem-se a ele como o fenômeno “Twort- d'Herelle” e não como o termo “bacteriófago” proposto pelo microbiologista Francês (Silva *et al.*, 2009).

Não muito tempo após a descoberta de d'Herelle, a terapia fágica é colocada em prática no tratamento de disenteria. Felix d'Herelle garantiu a segurança da preparação, podendo afirmar-se que “sucesso” fora a palavra-chave nesta experimentação, uma vez

que se verificou um cessar dos sintomas com apenas uma administração (Silva *et al.*, 2009).

Com resultados tão positivos, mais não era de esperar que uma crescente aplicação de bacteriófagos nos mais variados ramos da medicina, como foi o caso de tratamentos de doenças de pele por *Staphylococcus*, cólera, peste bubónica, entre outros (Silva *et al.*, 2009).

Com o passar dos anos deu-se início à comercialização das preparações fágicas, aumentando a cada dia a sua popularidade (Silva *et al.*, 2009).

## **II. Aplicações da Terapia Fágica**

Considera-se hoje que, os bacteriófagos são agentes de extrema importância, não só aplicáveis no tratamento de diversas patologias, como também a nível ecológico, nomeadamente ao nível da reciclagem de matéria orgânica, apresentando-se também como uma relevante ferramenta de biologia molecular e epidemiológica (Kropinski, 2006).

A terapia anti-infecciosa, tendo por base o uso do bacteriófago, exige alguns requisitos. A biologia do fago, utilizado no tratamento, deve estar previamente esclarecida, uma vez que, o sistema interactivo fago-hospedeiro é bastante complexo. O componente “fago”, utilizado neste sistema, deve cumprir rigorosamente determinados critérios de segurança, ou seja, é imprescindível que se proceda a uma exigente purificação da preparação fágica, para que esta não transporte consigo restos bacterianos (Skurnik e Strauch, 2006; Levin e Bull, 2004).

O receptor fágico deve ser bem conhecido. A resistência ao fago por parte da bactéria é um dos obstáculos à implementação desta terapia, não sendo porém considerado um entrave, visto considerar-se que as mutações fágicas são perfeitamente capazes de acompanhar as alterações bacterianas (Skurnik e Strauch, 2006; Levin e Bull, 2004).

As bactérias podem sofrer diferentes mutações que as levem à não sensibilização fágica. Se por um lado são capazes de perder um gene essencial à replicação fágica, por outro, têm a capacidade de adquirir sistemas que conduzem à degradação do ácido nucleico injectado pelo fago (Skurnik e Strauch, 2006; Levin e Bull, 2004).

Entre outros requisitos, vigora ainda a necessidade de um teste prévio em animais. Assim sendo, após reunidas todas as condições para dar seguimento à prática terapêutica, deve proceder-se à sua realização primariamente em animais teste, isto porque, cada fago testado pode apresentar diferentes comportamentos *in vivo* (Skurnik e Strauch, 2006; Levin e Bull, 2004).

Alguns autores consideram ainda que o uso de bacteriófagos apenas se torna imprescindível até que estes reduzam a quantidade de bactérias infectantes para um nível a partir do qual as defesas do organismo infectado tomem controlo da situação (Levin e Bull, 2004).

Durante os anos de 1963 e 1964, desenvolveu-se, na Geórgia, aquele que viria a ser um dos mais completos, se não mesmo o mais completo estudo avaliativo das capacidades profiláticas do fago como agente terapêutico. Reuniram-se um total de 30 769 crianças, oscilando entre 6 meses e 7 anos de idade, tendo-se posteriormente dividido em 2 grupos tratados de forma distinta. A um deles foram administrados bacteriófagos específicos para *Shigella*, por via oral. O outro grupo permaneceu sem a receção de qualquer terapêutica (grupo placebo), ficando ambos os grupos sob vigilância. Amostras fecais de todas as crianças com distúrbios gastrointestinais (GI) foram recolhidas, testando-se a presença, não só de *Shigella*, como de qualquer bactéria causadora de diarreia (Silva *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos foram bastante promissores, uma vez que se verificou no grupo placebo uma incidência de diarreia 2,6 vezes superior à observada no grupo de crianças trabalhado com fagos. Admitiu-se ainda a possibilidade de o bacteriófago não ter sido apenas activo contra *Shigella*, mas concomitantemente contra outras bactérias patogénicas causadoras dos mesmos distúrbios (Silva *et al.*, 2009).

Diversos outros estudos foram posteriormente despoletados, tendo sido usados para avaliar a segurança e eficácia dos fagos no tratamento de pacientes infectados por diversos agentes patogénicos, provando-se não tóxicos para os doentes (Silva *et al.*, 2009).

A continuidade das observações centrou-se posteriormente, não na procura de certezas de eficácia, mas no aperfeiçoamento da terapêutica. Foi também comparada a eficácia de fagos específicos para cepas bacterianas isoladas, com a eficácia de preparações de

fagos já comercializadas, notando-se, ao tratar dois grupos de pacientes de forma distinta, que os bacteriófagos específicos para cepas isoladas eram entre 5 a 6 vezes mais eficazes do que o grupo de preparações existentes no mercado, prevendo os bacteriologistas tratar-se de uma melhora na especificidade (Silva *et al.*, 2009).

Entende-se agora que o uso de fagos não tem apenas proveito quando se fala em terapia medicamentosa mas também quando se pretende um controlo bacteriano no campo agrícola, das pescas ou até mesmo alimentar sem que as propriedades dos alimentos sejam alteradas, uma vez que a sensibilidade destes agentes virais para a detecção de patogéneos é bastante elevada, aumentando assim a segurança alimentar, no que se refere, essencialmente, a produtos frescos (Kropinski, 2006).

Assim, quando posto em contacto com o alimento teste, o fago tem a capacidade de se replicar dentro da célula bacteriana, causadora de contaminação, levando à lise da bactéria com conseqüente aumento do número de partículas fágicas, sendo este facilmente mensurável. É de igual forma perceptível a utilidade dos fagos no controlo alimentar quando estes são marcados com fluorescência ou seja, quando se usam bacteriófagos que se revelam capazes de actuar contra uma ampla gama de bactérias e, uma vez expressos, emitem luz visível, facilmente quantificável (Kropinski, 2006).

*Salmonella*, *E.coli*, *Listeria* e *Campylobacter* são algumas das mais preocupantes bactérias a causar infecções alimentares. Estudos recentes revelam que após tratados com partículas fágicas, os alimentos reduziram significativamente a quantidade de bactérias apresentadas inicialmente (Fiorentin *et al.*, 2005).

*Listeria monocytogenes*, como já referido, é uma das bactérias que mais preocupações desperta a nível alimentar, isto porque, esta bactéria, após entrar no hospedeiro, comporta-se como uma bactéria intracelular, camuflando-se assim do sistema imunitário ou até mesmo de um tratamento fágico. Alimentos susceptíveis à infecção por esta bactéria, têm progredido no que se refere a contaminações, uma vez que se encontram já aprovadas duas substâncias, específicas para a bactéria em questão, a utilizar aquando do processamento destes alimentos, isto porque é nesta fase prévia ao embalamento que esta bactéria geralmente contamina as instalações. A FDA classificou este tipo de fagos que eliminam *Listeria*, como GRAS (Castro, 2008).

Geralmente, a FDA, aprova a utilização de fagos no fabrico de alimentos, tornando-se este campo burocraticamente mais facilitado, comparativamente com áreas como a clínica ou a veterinária (Hagens e Loessner, 2010).

Jameel Inal (2003) relata a prática da terapia fágica no controlo de agentes patogénicos em peixes. Esta terapia revelou-se um sucesso, devido ao facto de os bacteriófagos terem uma boa distribuição no ecossistema, uma vez que se encontram deste modo bem integrados em sistemas aquáticos, favorecendo um continuado e estreito contacto com os animais aquáticos.

Kropinski, por outro lado, refere a inexistência de estudos, bem controlados, em animais, que indiquem os fagos como agentes terapêuticos (Kropinski, 2006).

Contudo, já na época do aparecimento da terapia fágica foram realizados, diversos estudos clínicos em animais que se contrapunham à ideia de Kropinski . Salientam-se alguns dos mais conhecidos, levados a cabo nos laboratórios de William Smith na Grã-Bretanha. Num deles, é relatado, com sucesso, o uso de bacteriófagos para tratar uma infecção por *E. coli* em ratinhos. Descobriu-se assim, que apenas uma dose de fagos específicos para *E.coli* (anti-K1) seria suficiente para diminuir significativamente o número de bactérias no trato alimentar de ratinhos, alargando-se mais tarde este procedimento experimental para outros animais infectados, como foi o caso de bezeros. O tratamento parou a perda de líquidos, associada à infecção, e garantiu a sobrevivência dos animais envolvidos (Silva *et al.*, 2009). Ainda neste mesmo estudo, contrapôs-se a eficácia destes fagos específicos para a bactéria infectante, por via intramuscular, com a eficácia de antibióticos como tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, entre outros, administrados pela mesma via. Concluiu-se desta forma que uma única dose da preparação fágica se revelava mais eficaz que múltiplas doses de qualquer um dos antibióticos testados (Matsuzaki, *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em 1943, nos EUA, afirma que um dado fago, injectado intraperitonealmente numa espécie de ratinhos, foi encontrado na corrente sanguínea, atravessando inclusivamente a barreira hematoencefálica. Outra experiência relata a infecção de ratos por uma dada bactéria que leva à morte de 95% dos animais em apenas 4 dias, taxa esta que, reduz para 28%, quando se injecta intraperitonealmente uma preparação de bacteriófagos (Kropinski, 2006).

Nos anos 80, Williams Smith e seus colaboradores, foram mais além, apresentando diversos outros estudos com animais que se revelaram bastante promissores. Um dos seus notórios estudos utilizou como animais teste bezerros, variando a sua idade entre 6 e 12 horas de vida. A estes, foi administrado oralmente, na alimentação, uma mistura de *E. coli* enteropatogénica, 97% desenvolveram diarreias entre 12 a 46 horas, 80% acabaram mesmo por morrer. A administração de um fago específico nas primeiras horas diarreicas reduziu as mortes existentes em 100% (Kropinski, 2006).

Estudos relacionados revelaram também que a virulência do fago *in vitro*, nem sempre é similar à verificada *in vivo* (Kropinski, 2006). Levin e Bull, referem que é difícil concluir acerca do motivo destas diferenças (Levin e Bull, 2004).

Uma investigação anterior, compara a eficácia de uma dose única de fagos com a de um antibiótico- estreptomicina, no combate à infecção, tendo-se revelado ambos, de igual forma, eficazes. Neste caso, os investigadores atrasaram a toma em algumas horas, a fim de ver qual seria a consequência deste acto. Acabara então por concluir que, para ambas as terapêuticas, fágica e antibiótica, este atraso da terapêutica tinha consequências negativas. Contrariamente, Bull e seus colaboradores, assumem haver consequências negativas no atraso do tratamento, porém, apenas seriam marcadas no que se refere à terapêutica com antibióticos, uma vez que diminui consideravelmente a percentagem de sobreviventes da amostra, tendo-se este atraso mostrado pouco significativo quando falamos em antibióticos (Kropinski, 2006).

Um terceiro grupo de investigadores, Soothil James e colegas, no Reino Unido, avalia otites externas em cães (similares às dos humanos), causadas pela *Pseudomonas aeruginosa*, revelando-se esta patologia bastante susceptível ao tratamento com uma única dose de uma preparação fágica polivalente (Kropinski, 2006).

Também no âmbito de infecções vegetais esta terapêutica ganha vida. É certo que a grande maioria das infecções apresentadas pelas plantas têm a sua origem em fungos, porém, as de maior gravidade são de facto bacterianas. Deste modo, a fim de colmatar a ineficácia dos bactericidas existentes actualmente no mercado, desenvolvem-se terapias eficazes e seguras, tendo como partícula activa o bacteriófago. Encontra-se já disponível no mercado o agrifago, um produto fágico capaz de controlar fitobactérias nocivas, essencialmente atacantes de tomates e pimentões (Balogh, 2006).

O uso de bacteriófagos como agentes terapêuticos foi então uma notória realidade a partir de 1919 em todo o mundo, não parecendo na altura ser importante a falta de conhecimentos aprofundados sobre a mesma, já que, os estudos científicos realizados na época para escavar conhecimentos acerca do bacteriófago eram raros (Hanlon, 2007).

A falta de aprofundamento na terapia fágica mostrou-se deste sempre uma prática bastante invulgar. Grande parte dos estudos realizados na época revelaram-se incompletos, isto devido, ou ao estilo científico de d'Herrelle, ou mesmo à sua intensa vontade de introdução destes fagos destruidores de bactérias no mercado. Foi, a fim de colmatar esta falha, solicitada pelo Conselho de Farmácia e de Química da Associação Médica Americana, a publicação de um artigo que revia todos os outros até então editados. Assim, em 1934, foi lançado este relatório, que em pouco enalteceu esta terapia, não mostrando sequer conclusivo o facto de que este material até então falado, fosse de facto um vírus causador da morte bacteriana, chegando mesmo a ser considerado material inanimado. Sabe-se hoje, que estas conclusões não são consideradas verídicas (Silva *et al.*, 2009).

É no entanto notória, toda a problemática que o artigo levantou, uma vez que se verificou na época um grande decréscimo de interesse por parte, não só de cientistas ocidentais, como de apoios à investigação, nesta temática (Silva *et al.*, 2009).

Relatórios posteriores, seguiram a mesma linha negativista do até então publicado, cessando totalmente os resistentes estudos ainda elaborados nos Estados Unidos.

### **III. Segurança**

Já na época de d'Herrelle se apostavam em estudos para comprovar a segurança de preparações fágicas em seres humanos. Ele próprio consumiu, via oral e injectável, alguns preparados, tendo-os também administrado a familiares e amigos, não verificando qualquer efeito adverso indesejável. Se ponderarmos que convivemos diariamente, tanto ao nível do organismo interno, quanto a nível externo, como no ambiente, com seres virais, outra coisa não seria previsível se não a sua inofensividade para conosco. A ingestão de bacteriófagos parece hoje ser impossível de evitar, sabendo que estes seres estão presentes não só na nossa cavidade oral, fecal, águas potáveis, como também nos alimentos que ingerimos (Kropinski, 2006).

Estudos bastante mais extensivos que os de d'Herrelle foram realizados nos EUA pelos *Staphage Lysate Delmont Laboratories*, tendo sido, num deles, administrado em humanos, por distintas vias (oral, tópica, subcutânea e intravenosa), uma elevada concentração de fagos específicos para *Staphylococcus*, durante um intervalo de tempo que rondou os 12 anos (Kropinski, 2006).

Embora não sejam descritos quais os efeitos colaterais observados, admite-se a existência de alguns, não se considerando no entanto relevantes para serem tidos em conta (Kropinski, 2006).

Afirma ainda Andrzej Górski e seus colaboradores, do Instituto de Imunologia e Terapia Experimental da Polónia que, embora os estudos até então descritos e seus similares não obedeçam a criteriosas formalidades agora exigidas, sugerem a terapia fágica como altamente eficaz estando praticamente isenta de efeitos colaterais (Gorski *et al.*, 2004).

Existem actualmente descritos, diversos estudos que salientam a eficácia da terapia fágica no tratamento e prevenção de infecções por *Staphylococcus*, uma bactéria extremamente prejudicial à saúde pública. Num deles, em particular, é avaliado o comportamento de um fago específico para esta bactéria. A uma ferida subcutânea, fora injectada a bactéria em questão, injectando-se concomitantemente um fago específico para a mesma, tendo este demonstrado uma favorável prevenção de formação de um abscesso infeccioso (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Acrescenta ainda que, estudos recentes, desenvolvidos no instituto em questão, revelam os bacteriófagos como sendo uma óptima arma para alcançar órgãos que geralmente se consideram de difícil acesso (Kropinski, 2006).

Foi também neste Instituto conduzido, aquele que viria a ser o estudo mais relevante para a terapia fágica, que a contrapõe à resistência antibiótica. 2 000 pacientes em risco de vida, causado por infecções de bactérias resistentes a antibióticos, foram tratados com bacteriófagos. A taxa de sucesso deste tratamento variou entre os 60 e 90% (Kropinski, 2006).

Existem actualmente, na Grã-Bretanha, estudos completos de ensaios clínicos de fase I e II realizados no Homem para infecções auriculares por *Pseudomonas*. Esta patologia caracteriza-se pelo seu difícil tratamento, uma vez que a organização espacial bacteriana, não facilita a acção antibacteriana. Além disso, a terapêutica antibiótica

disponível para erradicar a infecção, nos casos de sensibilidade ao fármaco, pode por vezes tornar-se tóxica. Até ao momento, tendo por base os ensaios clínicos já realizados, a terapia fágica revela-se bastante promissora nesta área, uma vez que se tem demonstrado eficaz e segura para o Homem (Bricha *et al.*, 2009).

Uma empresa britânica, destinada exclusivamente à investigação fágica, tem batalhado por uma evolução, na aplicação do bacteriófago enquanto agente bactericida de *Pseudomonas aeruginosa*, causadora de fibrose cística (Bricha *et al.*, 2009).

Investigadores Belgas assumem também um difícil desafio, tentar travar infecções, causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em indivíduos queimados, sendo que estas infecções se caracterizam por apresentar uma elevada taxa de mortalidade (Bricha *et al.*, 2009).

#### **IV. Factores externos que afectam a sua viabilidade**

Se por um lado consideramos os bacteriófagos bastante resistentes a factores externos sejam físicos ou químicos, por outro lado também eles são, por vezes, sensíveis aos mesmos, restringindo a sua viabilidade, podendo mesmo chegar a inactivá-los, como consequência de possíveis danos causados na sua estrutura, quer no conteúdo genético, quer lipídico (Ackermann *et al.*, 2004).

Destaca-se, neste campo, a Temperatura, a salinidade e a acidez, especialmente quando falamos de meios aquáticos (Jończyk *et al.*, 2011).

Etapas como fixação, penetração, multiplicação ou período de latência do material genético fágico no cromossoma bacteriano são altamente dependentes de factores externos, como é o caso da Temperatura. A temperaturas inferiores à temperatura ideal, o material genético tem menor capacidade de penetrar a célula bacteriana hospedeira e, conseqüentemente menos bacteriófagos estarão posteriormente envolvidos no processo de multiplicação (Jończyk *et al.*, 2011).

Por outro lado, temperaturas acima da ideal, prolonga o período de latência do material genético no material bacteriano (Jończyk *et al.*, 2011).

Como já referido, em condições desfavoráveis, a viabilidade destes seres está comprometida, encontrando-se eminente a possibilidade de ocorrerem danos na estrutura do bacteriófago, quer ao nível dos seus elementos estruturais, quer elementos internos (proteínas, DNA...), que levem à inactivação do mesmo (Jończyk *et al.*, 2011).

AcKermann e colaboradores (2004), demonstraram que, fagos distintos, pertencentes à mesma família, apresentam diferentes sensibilidades. PRD1 e AP50 foram testados. Após armazenamento de ambos a -80° verificou-se que os primeiros sobreviveram 6 meses a esta Temperatura, ao contrário do AP50 que perdeu a sua actividade. Também estes fagos foram armazenados num caldo de carne a 4°C, onde PRD1 se detectou após 22 anos nestas condições, ao contrário de AP50 que, após um ano, se mostrou inviável. Depreende-se assim que, fagos da mesma família podem reagir de diferentes formas num mesmo ambiente, do mesmo modo, bacteriófagos que residem num mesmo espaço, ou espaços semelhantes, podem ter diferentes formas (Ackermann *et al.*, 2004).

Duncan Mara e Nigel Horan (2003), sugerem uma relação entre a forma estrutural de cada fago e a sua capacidade de sobrevivência a ambientes diversos (Mara e Horan, 2003).

## **V. A Era do antibiótico e o decréscimo da Terapia Fágica**

Desde que o Homem se interessou pela ciência e conseqüentemente pelas causas de morte humanas, questiona a existência de produtos, de origem natural ou não, que possam travar este crítico panorama.

Com a aquisição de conhecimentos na área, o Homem encara a realidade da evolução infecciosa, testando diversos produtos, visando alcançar uma travagem vitoriosa. Contudo, apenas em 1928, graças a Alexandre Fleming, a luz parece surgir no horizonte. Este bacteriologista descobre a penicilina, aquele que viria a ser o primeiro antibiótico a marcar uma nova era (Hoff *et al.*, 2008).

A era do antibiótico acentuou a descrença da terapia fágica no Ocidente, sobretudo numa época em que tantas contrariedades se levantam, permanecendo porém este uso na Europa Oriental e na ex-União Soviética (Hanlol, 2007).

Fármacos anti-infecciosos, e particularmente os antibacterianos mostraram-se bastante satisfatórios na terapêutica, com eficácia inquestionável. Contudo, a sua introdução na clínica fez notar que bactérias que eram inicialmente sensíveis a dado antibiótico se tornariam agora resistentes (Rohwer, 2003). O recurso a antibióticos, fundamentalmente os de largo espectro, desencadeia assim um aumento notório do crescimento e selecção de microorganismos resistentes, tendo este facto maior preocupação quando nos deparamos com um elevado número de doentes imunodeprimidos (Silva et al. 2009).

O nível de resistências toma, hoje em dia, proporções elevadíssimas. Morrem anualmente 5 milhões de pessoas vítimas de infecções, para as quais os antibióticos já não têm solução. Uma bactéria de grande relevância neste negativo panorama é o *Staphylococcus*, uma vez que para além de ser bastante perigoso para a saúde pública, é apenas sensível à vancomicina, um antibiótico glicopeptídeo. Note-se porém que, esta regra de sensibilidade encontrou já a sua excepção, no ano 2000, onde, no Japão, um bebé a realizar uma grande cirurgia ao coração, se detectou infectado, sem que manifestasse qualquer sensibilidade ao tratamento (Inal, 2003).

A procura de novos antibióticos é demorada e bastante dispendiosa. Em média, são necessários dez anos de estudo intensivo na área, para que um novo antibiótico seja lançado para o mercado, não tendo o Homem capacidade de fazer frente às resistências bacterianas que vão surgindo (Lopes, 2009).

A utilização descontrolada da antibioterapia em hospitais e em doentes de ambulatório, como meio de tratamento ou de prevenção de infecções; a falta de isolamento de pacientes em hospitais; a falta de medidas higiénicas e a utilização irracional destes fármacos a nível agrícola, são alguns dos motivos que levam o Homem a sentir necessidade de uma urgente procura de respostas para colmatar as excessivas resistências à terapêutica que os seres bacterianos têm vindo a desenvolver (Kropinski, 2006).

A tendência mantida na Europa de Leste relativamente ao uso do fago no combate de infecções bacterianas é, agora, reavaliada nas investigações Ocidentais, devido ao elevado número de resistências bacterianas aos antibióticos que até então foram surgindo (Kropinski, 2006).

## **VI. Reaparecimento da Terapia Fágica. Benefícios e obstáculos à sua implementação na prática clínica**

Ressurge então o conceito de Terapia fágica, que se caracteriza por ser uma terapia mais económica que a bacteriana, embora muito pouco explorada. A par da terapêutica medicamentosa baseada nos antibióticos, a terapia fágica, tem elevada actividade antibacteriana, ressaltando nesta ultima algumas vantagens, como é o caso da sua maior eficácia, acreditada mesmo não havendo ainda uma rigorosa prova da mesma (Silva *et al.*, 2009).

Porém, não é ainda chamativo o recurso a esta alternativa, nem a nível profilático, nem de terapêutica. São, ainda hoje, levantadas demasiadas controvérsias, não esclarecidas devido à escassez de estudos realizados, que se contraponham a um grupo placebo (Silva *et al.*, 2009).

A falta de dados sobre a sua farmacocinética é ainda um problema a ultrapassar, visto que, embora as publicações relativas ao tema sejam inúmeras, poucas são as que se referem ao modo de acção de bacteriófagos (Silva *et al.*, 2009).

Reconhece-se apenas, graças a estudos realizados em animais de laboratório, a capacidade que estes fagos têm em chegar à corrente sanguínea, entre 2 a 4 horas após uma administração única por via oral, alcançando órgãos internos passadas 10 horas da sua toma. Favoravelmente, a sua persistência no organismo pode ser bastante prolongada (Silva *et al.*, 2009).

Admite-se ainda uma vantagem, acrescida à terapêutica antibiótica quando, a fim de combater dada infecção cutânea ou sistémica, é administrada ao individuo uma proteína fágica, mesmo em elevada quantidade, esta não apresenta sinais de toxicidade, revelando-se assim segura para o público alvo. Além disso, o bacteriófago apresenta uma capacidade acrescida de penetrar no tecido quando neste estão presentes células bacterianas, alcançando locais mais profundos. Por outro lado, a terapêutica antibiótica interfere com o balanço microbiano da flora normal do individuo, podendo despoletar infecções secundárias (Loeffler e Fischetti, 2003; Nelson *et al.*, 2001).

A par da terapêutica com antibióticos, também na terapêutica fágica se teme a resistência bacteriana, ou seja, receia-se que as bactérias se ambientem de tal forma aos

bacteriófagos que, alterando a sua morfologia, se tornem indiferentes à presença dos mesmos. Alguns autores consideram porém que, a taxa de resistência verificada por uma bactéria a um fago seja cerca de 10 vezes menos que a verificada relativamente a um antibiótico, uma vez que se considera que os bacteriófagos, tendo um crescimento exponencial ensombram a taxa de crescimento bacteriano, reflectindo o mesmo nas taxas de mutações, o que certamente levará uma qualquer espécie mutante a ser capaz de eliminar a bactéria ate então resistente (Silva *et al.*, 2009).

Ou seja, o que se torna por um lado vantajoso, torna-se por outro menos benéfico, uma vez que, se após um tratamento fágico, nenhum anticorpo se nota relevante, o mesmo não acontece com contactos posteriores, uma vez que a exposição prévia a estes agentes leva à libertação de anticorpos pelo nosso sistema imunitário em tratamentos posteriores (Inal, 2003).

Sabe-se que, o reticulo endotelial do organismo tem a capacidade de reconhecer o fago, ou a parte utilitária do mesmo, como sendo um corpo estranho, rejeitando-o. Lisinas, por exemplo, ao contrário dos antibióticos, são proteínas, provocando como tal a indução de uma resposta imunitária celular e humoral, reduzindo assim o número de fagos para um nível não suficiente a combater a bactéria infectante (Shuch *et al.*, 2002).

Favoravelmente descreve-se como reduzida a hipótese do aparecimento de estirpes bacterianas capazes de resistir a lisinas, isto porque estas proteínas são capazes de reconhecer moléculas do invólucro da bactéria, essenciais à sobrevivência bacteriana, não devendo a sua administração continuada desencadear esta resistência (Shuch *et al.*, 2002).

Teoricamente, e como já referido, este não deveria ser um problema, uma vez que se sabe que a cinética de actuação dos fagos é bastante mais rápida do que a produção por parte do hospedeiro de anticorpos neutralizantes (Silva *et al.*, 2009).

Uma possível forma de colmatar este problema, encontra-se na administração de *cocktails* de fagos, ou seja, em detrimento da administração singular de um determinado fago, coloca-se o paciente em contacto com uma maior diversidade dos mesmos, a fim de escapar à defesa do organismo. Este processo de selecção de novas partículas fágicas é relativamente rápido, ocorrendo, geralmente, apenas em alguns dias (Inal, 2003). Uma

outra possibilidade a ter em consideração é a administração de fagos ou lisinas de baixa imunogenicidade (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Salienta-se comumente a positividade deste tratamento no que se refere à especificidade do bacteriófago para uma dada bactéria, deve porém entender-se que, muitos dos resultados negativos do tratamento podem também dever-se a esta mesma especificidade, uma vez que, a selecção dos fagos para dada bactéria-alvo, ao ser feita incorrectamente, comprometerá todo o tratamento. Entende-se então que este passo de selecção é crucial para o não comprometimento de todo o processo (Silva *et al.*, 2009).

Acrescida a esta especificidade do bacteriófago para uma dada bactéria, encontra-se também a sua inespecificidade para células eucariotas, encontrando-se assim o Homem isento de qualquer efeito a ele destinado, assumindo-se assim esta terapia como tendo raramente algum efeito colateral (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Também o custo de desenvolvimento de um sistema fágico é bastante mais apeteável do que o custo de desenvolvimento de um novo antibiótico, mostrando-se assim esta alternativa como sendo mais viável, inclusive do ponto de vista económico (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Um outro aspecto negativo deste tratamento relaciona-se com a baixa pureza das preparações de fago existentes, uma vez que, no início desta terapêutica, os fagos teriam sido lisados directamente nas bactérias hospedeiras, o que vai acarretar consigo diversas impurezas, como é o caso de endotoxinas, que podem ser responsáveis pela neutralização dos efeitos dos fagos. Este problema poderá no entanto ser ultrapassado recorrendo a técnicas de purificação, como é o caso de altas velocidades de centrifugação, ou cromatografia de troca iónica (Silva *et al.*, 2009).

A facilidade de isolar novos fagos do meio ambiente é notória. Do mesmo modo, após o seu isolamento, encontra-se facilitada a tarefa de ampliar o seu número, uma vez que, dispondo de um hospedeiro adequado, o bacteriófago tem a capacidade de se proliferar. Contudo, a incapacidade de diferenciar um fago lítico de um fago lisogénico é uma condicionante, uma vez que, ao utilizar-se um fago lisogénico em detrimento de um lítico o tratamento poderá estar comprometido, visto que o primeiro é bastante menos eficaz no que se refere à lise bacteriana (Silva *et al.*, 2009).

Encontra-se ainda em aberto a viabilidade da utilização de fagos para combater bactérias intracelulares, uma vez que neste caso as bactérias se encontram em multiplicação dentro de células humanas hospedeiras, não estando ainda esclarecida a capacidade dos bacteriófagos as alcançarem, embora já tenha esta terapêutica sido relatada em casos preventivos de salmonelose em crianças (Silva *et al.*, 2009).

Também o comportamento destes seres, em condições anaeróbias, está ainda por descobrir. São poucos os estudos que relatam a cinética de acção dos fagos nestas condições, o que pode comprometer a sua utilização ao nível do intestino, uma vez que este é um compartimento do nosso organismo desprovido de oxigénio (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

Sandra Chibani-Chennoufi e seus colaboradores, após terem conhecimento do efeito causado por um dado cocktail fágico em *E. coli*, residentes no intestino de uma espécie de ratinhos, *in vitro*, provocaram a ingestão deste mesmo cocktail pelo animal teste, não verificando, *in vivo*, o mesmo notório impacto, tendo, este facto, sugerido duas possíveis causas: uma protecção desconhecida de bactérias; ou, por outro lado, uma real ineficácia destes bacteriófagos em anaerobiose (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

Como não poderia deixar de ser, problemas éticos são regularmente levantados. A barreira psicológica do consumidor mostra-se muitas vezes intransponível, mesmo tendo de antemão noção de que estes seres são específicos para a bactéria infectante, convivendo eles connosco nos mais distintos lugares do planeta (Kropinski, 2006).

É também de salientar que as mais eficientes vacinas da época moderna são constituídas por vírus vivos e, inclusivamente, o próprio Homem coabita involuntariamente com estes bacteriófagos na parte inferior do seu intestino, associados à sua flora bacteriana, sem que causem qualquer malefício para o hospedeiro (Kropinski, 2006).

Felizmente já são do conhecimento geral os mecanismos de acção pelos quais os fagos actuam lisando as bactérias alvo. Pode então nos dias de hoje pensar-se mais à frente, ou seja, em detrimento de se fazer uso de fagos vivos como um todo, facto este que não é do agrado geral da comunidade, usam-se as suas partes que efectivamente lisam as bactérias (Kropinski, 2006).

Já em 2001, Nelson e seus colaboradores, demonstraram a eficácia isolada de lisinas recombinantes purificadas na eliminação de bactérias patogénicas (Nelson *et al.*, 2001).

Até aos tempos actuais, qualquer exposição exógena que se tenha realizado entre estas lisinas e bactérias patogénicas, revelou uma actividade de lise bacteriana bastante forte e imediata. Pode ainda ter-se em consideração a possibilidade de administrar simultaneamente duas lisinas cujo local de corte do peptidoglicano difira, resultando esta associação num efeito sinérgico (Matsuzaki, *et al.*, 2005).

Crê-se uma maior aceitação por parte dos consumidores, se apenas tiverem de usar uma enzima isolada que actue por exemplo inibindo a síntese da parede celular bacteriana, ao invés de utilizar todo um organismo vivo (Kropinski, 2006).

Deitando por terra todas as críticas negativistas impostas aos bacteriófagos, um estudo recente realizado a 10 distintos hospitais, pelo Instituto de Imunologia e Terapia Experimental da Academia Polaca da Ciência, afirma que esta terapêutica se manifesta ser de grande sucesso clínico. 550 pacientes, com idades compreendidas entre a primeira semana de idade e os 86 anos, foram testados, estando 518 dos quais infectados por bactérias que não respondiam à terapia por antibióticos. Procedeu-se à produção de fagos de forma padronizada e estéril, tendo-se administrado os mesmos, durante 5 semanas, topicamente, por via oral, ou em gotas para os olhos. A taxa de sucesso desta experiência oscilou entre 75 e 100%, variando com a bactéria causadora de infecção. Para os 518 pacientes resistentes a antibióticos, esta afirmou-se a 94% (Inal, 2003).

Relata-se como único efeito colateral, a toxicidade hepática, alegadamente causada pelas endotoxinas presentes nas preparações fágicas, provenientes da destruição bacteriana. Mais uma vez destaca-se a purificação das preparações como uma etapa crucial para um tratamento totalmente benéfico. O mesmo estudo, utiliza o argumento do “choque tóxico” para ter descartado a administração intravenosa, embora afirme um resultado bastante promissor no que se refere às vias rectal e aerossol (Inal, 2003).

Note-se que a via de administração é fundamental para o sucesso do tratamento. Silva e colaboradores, consideram que a via intraperitoneal é mais eficiente que a subcutânea ou mesmo a intramuscular (Inal, 2003).

Nos EUA, injectaram-se já, por via intravenosa, preparações de bacteriófagos, que, se revelaram bastante promissoras, uma vez que não se observaram quaisquer efeitos secundários (Inal, 2003).

## VII. Perspectivas futuras

Também ao nível do bioterrorismo esta teoria ganha uma ênfase especial. Foi já, nos Estados Unidos da América, registado um ataque bioterrorista, usando como arma uma particular bactéria – *Bacillus anthracis*. Deste atentado resultou a morte de cinco pessoas que inalaram esta bactéria chegada via correio, tendo felizmente, onze outras recuperado de antraz cutâneo (Kropinski, 2006).

Acredita-se ser este *Bacillus* a primeira arma escolhida pelo bioterrorismo, uma vez que a sua facilidade de preparação é notória (Kropinski, 2006).

Os antibióticos- Doxicilina e Penicilina, são favoravelmente eficazes contra esta bactéria, não descartando a contrapartida da sua administração ter de ser efectuada durante dois meses, uma vez que se questionam as suas eficácias contra esporos (Kropinski, 2006).

Apesar desta sensibilidade ao antibiótico ainda se verificar, não se pode excluir a capacidade de moldar esta bactéria através de engenharia genética, tornando-a resistente, servindo deste modo como uma arma mortífera para o próprio Homem (Kropinski, 2006).

Torna-se mais uma vez necessária a procura de uma solução para o Homem combater estes ataques bioterroristas quando o antibiótico já não suprime as suas necessidades (Kropinski, 2006).

Numa época em que ressurgem a terapia do fago, esta não poderia deixar de ser tida em conta também nesta área, porém, a escassez de fagos específicos para a bactéria não permite a esta terapia afirmar-se como uma vincada alternativa ao problema (Kropinski, 2006).

Sabe-se no entanto haver a existência de alguns fagos específicos para *Bacillus*, tratados para tais infecções. Ressalva-se ainda a faculdade do uso de cocktails fágicos, direccionados para grande parte das cepas de *Bacillus anthracis*, tornando dificultada a capacidade das bactérias a desenvolver resistências contra os fagos, servindo como uma outra forma de defesa contra o malefício do antraz (Kropinski, 2006).

Existe já na Geórgia uma evolução marcada no que se refere à utilização da terapia fágica. A ameaça de bioterrorismo, nomeadamente no emprego de antraz, é já tida em

consideração neste país, encontrando-se o mesmo a fazer uso do bacteriófago para detectar esta mortal bactéria. Também a monitorização de cólera e a resolução de problemas ambientais, como detecção de patogéneos em águas é actualmente passível de se realizar (Adamia e Kutateladze, 2008; Chibani- Chennoufi *et al.*, 2004).

Tentando suprir os impedimentos à terapêutica que cada vez mais se destacam na área da antibioterapia, a terapia fágica tem vindo a evoluir no sentido de auxiliar ou mesmo substituir o antibiótico, uma vez que as suas resistências surgem cada vez mais e em larga escala, Assim, a microbiologia tem progredido visando tornar útil o fago, ou partes dele, para que possam impedir a propagação de infecções bacterianas, usando para tal ferramentas de manipulação genética (Costa, 2010).

Torna-se assim frutuoso o genoma fágico neste combate, uma vez que é incorporado, nas mais diversas preparações, como é o caso de vacinas, altamente capazes de serem administradas ao portador da infecção, favorecendo assim o seu combate.

A elaboração de vacinas tendo por base o genoma fágico é já uma realidade. Quando um plasmídeo, contendo um gene fágico específico para dada bactéria, é introduzido numa estirpe da mesma e o gene fágico induzido, as células bacterianas são destruídas transformando-se numa célula bacteriana fantasma. A utilização deste fantasma bacteriano fora já, em estudos realizados, administrado, sob a forma de vacinas, em ratinhos de laboratório, resultando esta administração numa significativa redução do número de bactérias que o colonizavam (Costa, 2010).

Em Portugal esta realidade encontra-se já a dar os primeiros passos. A TechnoPhage e a Innophage são duas empresas que caminham na investigação de novos produtos a fim de prevenir, diagnosticar e tratar infecções bacterianas. Não existem ainda estudos publicados por qualquer uma das referidas empresas (Costa, 2010).

A par da sua aplicação na área do bioterrorismo, também na prática clínica, bem como noutras áreas, a terapia fágica caminha timidamente para um futuro que tudo tem para se mostrar bastante sorridente.

## VIII. Conclusão

Actualmente são muitas as bactérias que se revelam resistentes a diversos antibióticos, resultando deste facto um problema clínico bastante grave.

A terapia fágica mostra-se altamente eficaz no tratamento e prevenção de várias doenças infecciosas de origem bacteriana, salientando, nas referidas, aquelas cuja causa provém de bactérias resistentes a inúmeros antibióticos- multirresistentes.

Áreas como a clínica, a veterinária, alimentação, agricultura, entre outras, vêem já um futuro promissor no que se refere ao combate a doenças infecciosas.

Também as ameaças bioterroristas não levantam actualmente a problemática que até então seria usual, uma vez que igualmente neste campo o uso do bacteriófago se revelou bastante proveitoso.

São inúmeras as vantagens que esta terapia proporciona ao Homem, especialmente numa época em que as bactérias parecem vencer uma guerra contra os antibióticos. Destacam-se entre muitas a sua selectividade, eficácia, isenção de contra indicações, custo atractivo e também a dificuldade que impões aos seres bacterianos em lhes criarem resistências.

Um dos grandes desafios, ainda por superar, nesta terapêutica, é a falta de regulamentação adaptada à mesma, uma vez que, desde a sua descoberta, em meados de 1896, nunca foi suficientemente bem estudada, ao ponto de aferir todas as incógnitas que até hoje se levantam, especialmente, no que se refere à falta de estudos experimentais bem controlados, que comprovem a sua segurança e eficácia, nas mais variadas condições, orgânicas, ou não.

Actualmente, a Geórgia, revela-se como sendo o país mais evoluído na aplicação da terapia fágica. O seu uso, encontra-se já em vigor a nível hospitalar e de ambulatório, sendo que, todas as suas aplicações, descritas, até hoje, se mostraram bem sucedidas.

Também como prevenção de infecções alimentares o panorama é positivo, especialmente no que se refere a produtos frescos, como é o caso de alguns queijos, que mais facilmente são transmissores de infecções.

Existem também, e já a serem comercializadas, preparações fágicas que evitam e eliminam, quando já instaladas, fitobactérias causadoras das mais severas infecções bacterianas em plantas, mostrando-se as mesmas não tóxicas para a planta.

A grande vantagem destes fagos que devora bactérias, passa, sem dúvida, pela sua alargada distribuição na Natureza, encontrando-se o Homem, as plantas e os animais, adaptados à convivência com os mesmos, facto este que se mostra uma mais valia no momento de administração dos mesmos, uma vez que a probabilidade de virem a ser rejeitados na terapêutica é menor.

Diversos estudos estão ainda por realizar, contudo, esta terapia é já vista como auspiciosa num futuro próximo, especialmente ao nível da sua prática clínica, sobretudo num momento em que a necessidade de outras opções à antibioterapia se revelam imprescindíveis.

## IX. Bibliografia

Ackermann, H., Tremblay, D., Moineau, S. (2004) Long term bacteriophages preservation.

Ackermann, H.W.( 2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*, Vol. 152, pp.227 – 43.

Adamia, R., Kutateladze, M. (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute\_L'expérience de l'institut Eliava en phagothérapie. *Médecine et maladies infectieuses*, Vol. 38, pp. 426 – 430.

Amaral,I., Archer, L., Autissier, A., Bloch-Morhange, L., Bois, Y., Bourdaire, J., Carré, O., Carvalho, V., Chorão, J., Chorão, M., Cunha, P., Ferreira, M., Freitas, M., Garcia, J., Guedes, F., Gouguet, J., Kourliandsky, J., Lartigue, P., Lavroff, D., Maltês, J., Martins, L., Masson, P., Mattelart, A., Moreira, A., Raulin, F., Risset, J., Rodrigues, R., Serrão, D., Sigal, S., Silva, C. (1995). Verbo enciclopédia luso-brasileira de cultura. 3.º editorial. verbo liboa. pp.321 – 322.

Balogh, B. (2006) Characterization and Use of Bacteriophages Associated with Citrus Bacterial Pathogens for Disease Control. [*Dissertação*]. Universidade de Flórida.

Bricha, S., Ounine, S., Oulkheir, S., Haloui, N., Attarassi, B. (2009) Facteurs de Virulence et Epidemiologie Lies au Pseudomonas aeruginosa. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, Vol. 2, pp.7 – 14.

Carlos, A. (2012) Bacteiófago T4. [Em linha]. Disponível em <<http://www.google.pt/imgres?q=desenho+esquem%C3%A1tico+de+um+bacteri%C3%B3fago&hl=pt>> [Consultado a 18 de Maio de 2012].

Carlton, R. (1999) Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, Vol. 47, pp.267 – 274.

Castro, I. (2008) Novas tecnologias de processamento alimentar: Bacteriófagos - novas formas de controlo microbiológico. *CPC Newsletter*, Vol. 9, p.31.

Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S., Brussow H. (2004) In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: Implications for phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2558 – 2569.

Comeau, A.M., Krisch, H.M. (2005) War is peace-dispatches from the bacterial and phage killingfields. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 8, pp.88 – 94.

Costa, B. (2010) Terapia Fágica: Perspectivas na Aplicação Clínica [*Dissertação*]. Universidade de Aveiro, pp. 21 – 23.

Deresinski, S. (2011) Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. Department of Medicine, Division of Infectious Disease and Geographic Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, and Santa Clara Valley Medical Center, San Jose, California. *Review article*.

d’Herelle, F. (1917) An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acad. Sciences*, Vol. 165, pp.373 – 375.

Fiorentin, L., Vieira, N., Barioni, W. (2005) Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of Salmonella enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol*, Vol. 34, pp.258 – 63.

Gorski, A., Weber-Dabrowska, B., Dabrowska, K., (2004) Clinical phage therapy: Present and future. America Society for Microbiology Conference on the New Phage Biology. *Key Biscayne*.

Hagens, S., Loessner, M. (2010) Bacteriophages for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 11, pp.58 – 68.

Hankin, ME. (1896) The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, Vol. 10, pp.511 – 523.

Hanlon, W. (2007) Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 30, pp.118 – 128.

Helvoort, T. (1992) Bacteriological and Physiological Research Styles in the Early Controversy on the Nature of the Bacteriophage Phenomenon, Vol. 36, pp. 243 – 270.

Henriques, A.P. (2008) Uso de bacteriófagos para controlo de Salmonella em avicultura [dissertação]. Universidade de Aveiro, pp. 17 – 25.

Hoff, B., Poggeler, S., Kuck, U. (2008) Eighty Years after Its Discovery, Fleming's Penicillium Strain Discloses the Secret of Its Sex. *Eukaryotic Cell*, pp. 465 – 470.

Inal, J. (2003) Phage Therapy: a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, Vol. 51, pp.237 – 244.

Jończyk, E., Klak, M., Międzybrodzki, R., Górski, A. (2011) The influence of external factors on bacteriophages, Vol. 56, pp.191 – 200.

Kropinski, A. (2006) Phage therapy – Everything old is new again. *AMMI Canada Annual Meeting Symposium*, Vol. 17, pp.297 – 306.

Levin, B.R., Bull, J.J. (2004) Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat. Rev. Microbiol*, Vol. 2, pp.166 – 173.

Loeffler, J.M., Fischetti V.A. (2003). Synergistic Lethal Effect of a Combination of Phage Lytic Enzymes with Different Activities on Penicillin-Sensitive and –Resistant

*Streptococcus pneumoniae* Strains. *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 47, pp.375 – 377.

Loessner, M.J. (2005). Bacteriophages endolysins- current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol*, Vol. 8, pp.480 – 487.

Lopes, H.V. (2009) Novos Antibióticos. *Rev Panam Infectol*, Vol. 11, pp.60 – 100.

Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S. (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterialinfectious diseases. *Journal Infect Chemother*, Vol. 11, pp.211 – 219.

Mara, D., Horan, N. (2003) The handbook of Water and Wastewater Microbiology. Elsevier. [Em linha]. Disponível em <<http://books.google.pt/books>> [Consultado a 10 de Agosto de 2012].

Nelson, D., Lommis, L., Fischetti, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, pp.4107 – 4112.

Rohwer, F. (2003) Global Phage Diversity. Previews141. San Diego State University Department of Biology San Diego, California. [Em linha] Disponível em <<http://pdn.sciencedirect.com/science>> [Consultado a 30 de Março de 2012].

São-José, C., Nascimento, J., Parreira, R., Santos, M.A. (2007) Release of progeny phages from infected cells. *Bacteriophages: Genetics and Molecular Biology*, pp. 309 – 336.

Shuch, R., Nelson, D., Fischetti, V. A. (2002). A bacteriolytic enzyme that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, Vol. 418, pp.884 – 889.

Sillankorva, S. (2004) Utilização de bacteriófagos no controlo de células suspensas.

Silva, J., Hirata, R., Hirata, M. (2009) Bacteriophage: laboratorial diagnosis and phage therapy. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 40, pp.547 – 549.

Skurnik, M., Strauch, E. (2006) Phage therapy: facts and fiction. *Int J Microbiol*, Vol. 296, pp.5 – 14.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J. (2001) Minireview Bacteriophage Therapy. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45, pp. 649 – 659.

Twort FW, L.R.C.P.. Lond, M.R.C.S. (2011) An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Laboratories of the Brown Institution*, Vol. 1, pp.127 – 129.

Young, R. Y., Wang, I-N., Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol*, Vol. 8, pp.120 – 128.

[Em linha] Disponível em  
<<http://www.sabedoria.ebrasil.net/db/biologia/estudos/biologia/biologiag/replicacao.php.htm>> [Consultado a 7 de Junho de 2012].