

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Curso de Especialização em Microbiologia

Eleen Márcia Martins da Silva Pereira

**Aplicações da terapia com bacteriófagos como controle
microbiológico**

Belo Horizonte
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Especialização em Microbiologia
Eleen Márcia Martins da Silva Pereira

Aplicações da terapia com bacteriófagos como controle microbiológico

Monografia apresentada ao Curso de Especialização de Microbiologia Industrial e ambiental do Instituto de Ciências Biológicas para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Orientadora : Prof.^a Giliane de Souza Trindade.

Belo Horizonte
2011

Dedico este trabalho a minha irmã Ludmilla, que me surpreende com sua alegria e vontade de viver. Ensinando - me a caminhar na dor, superar os obstáculos e driblar as limitações e dificuldades desta jornada. Com você irmã, aprendi que a maior enfermidade está num coração que não acredita no possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço;

A ti Senhor, porque cuidas de mim, mesmo que eu ande pelo vale e o atravesse à sombra da morte, sei que sempre estás ao meu lado. Pois seu amor é como a rocha que não se quebra jamais, é como sol que nasce toda manhã, me ergue, fortalece e me dá vida.

Ao meu pai que mesmo ausente, se faz tão presente em meu coração e em minhas lembranças. Não há um dia em minha vida que não penso em ti, a lembrança de seu sorriso e sua força, não me deixam desaminar. À minha mãe, que tem força e fé inigualável. Obrigada por tudo, por não desistir da vida diante de tantas dificuldades. É o meu alicerce o meu espelho.

Aos meus irmãos. André por seu carinho e por acreditar em meu potencial, a Ludmilla que me faz acreditar que as limitações são apenas impulsos para continuarmos a caminhada e a Angélica, sua ausência se faz presença em tudo de belo que contemplo. A saudade que sinto de você é inexplicável. A Duda e Manu que são minha maior alegria.

Ao meu esposo, por seu amor, carinho e compreensão incondicionais neste período de ausências. Amo você.

A Giliane, minha orientadora que aceitou este desafio me ensinando com paciência, carinho e disposição. Obrigada por me ensinar que os erros fazem parte dos acertos. Que Deus lhe abençoe sempre!

Minhas amigas Grazielle e Fernanda pela amizade e companheirismo neste caminho que juntas trilhamos. A Nathiely, Angélica e Adrienny pela força, carinho e por acreditarem na minha profissão e em meu potencial.

Ao Padre Richard, um amigo incomparável. Suas orações me fortalecem.

“ Que Deus nos dê a sabedoria para descobrir o correto, à vontade para elegê-lo e a força para fazer que seja duradouro”.

Autor : Desconhecido

RESUMO

Os fagos, ou vírus de bactérias, são reconhecidos como os microrganismos mais abundantes e diversificados existentes no mundo. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia destes microrganismos como agentes terapêuticos em diversas áreas. Essa monografia tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre fagos, abordando conceitos como estrutura, características, biodiversidade e as aplicações dos mesmos no controle microbiológico e detecção de bactérias patogênicas nos alimentos, na formação de biofilme, sua ação no meio ambiente e na terapia de antibióticos. Serão também revisados os mecanismos de resistência das bactérias, as estratégias de sobrevivência dos fagos e as limitações da fagoterapia, que tem sido considerada uma alternativa promissora para diversas áreas das ciências.

Palavras – chaves: fagos, bacteriófagos, fagoterapia

ABSTRACT

Phages, or bacterial viruses, are recognized as the most abundant and diversified microorganisms in the world. Many studies have been conducted to evaluate the application of phage therapy in several areas. The aim of this monograph was overview the structure and applications of phage. This review will focus on structure, characteristics and biodiversity of phages, and its use for biological control of bacterial contamination of foodstuffs, for control of environmental microflora and biofilm formation, and for antibiotic therapy. Mechanisms of bacterial resistance, phage survival strategies, and limitations of phage therapy, which has been considered a promising alternative, will also be discussed.

Key words: bacteriophage, phage, phage therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação das 13 famílias descritas para a classificação dos fagos.....	20
Figura 2 -	Estrutura de bacteriófagos e microscopia eletrônica do fago T4.....	23
Figura 3 -	Curva de crescimento da replicação viral	24
Figura 4 -	Placas virais formadas por fagos líticos.....	24
Figura 5 -	Ciclo Lisogênico de um fago.....	27
Figura 6-	Tempo de duração de eventos que ocorre durante a infecção do fago T4...	28
Figura 7 -	Microscopia eletrônica do Fago T4	29
Figura 8 -	Microscopia eletrônica do Fago T3 e T7.....	30
Figura 9	Microscopia eletrônica do Fago MU.....	30
Figura 10-	Microscopia eletrônica do Fago lambda.....	31
Figura 11-	Microscopia eletrônica de partículas e DNA do fago Ø X174.....	32
Figura 12-	Microscopia eletrônica do Fago filamentososo M13.....	33
Figura 13-	Microscopia eletrônica de partículas do fago MS2.....	33
Figura 14-	Efeito do fago no crescimento de <i>L.monocytogenes</i>	38
Figura 15-	Microscopia eletrônica de biofilme formado por <i>S. aureus</i>	39
Figura 16-	Microscopia eletrônica de <i>P. fluorescens</i> .e fagos em lâmina de aço inoxidável.....	39
Figura 17 -	Processo de redução de biofilme utilizando engenharia enzimática de fagos.....	40
Figura 18 -	Infecção a 26°C de biofilmes de <i>P. fluorescens</i>	41
Figura 19 -	Infecção fágica de células de <i>P. fluorescens</i> , aderidas a superfície de vidro.....	41
Figura 20-	Diagrama de aglutinação utilizando colifagos e anticorpo marcado.....	46
Figura 21 -	Curva de avaliação de morte celular bacteriana de <i>S.aureus</i>	47

Figura 22a-	A - Conjugação química de fago e Cloranficol e os efeitos na célula alvo.	49
Figura 22b-	B - Conjugação química de fago e pró-droga (cloranfenicol e neomicina).....	49
Figura 23 -	Desenho reacional do processo de inibição da resposta SOS pelo fago M13.....	50
Figura 24 -	Forma esquemática dos mecanismos de resistência bacteriano.....	53
Figura 25 -	Forma esquemática de prevenção da injeção do DNA do fago.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- ICTVC - International Committee on Taxonomy of Viruses
- F+ - Pillus bacteriano
- PFU - Unidades Formadoras de Placas
- ETEs - Estações de Tratamento de Esgoto
- EUA - Estado Unidos da América
- AESA - Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos
- OMS – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Propriedades Taxonômicas dos vírus.....	20
Tabela 2-	Descrição e taxonomia de algumas famílias de bacteriófagos.....	22
Tabela 3-	Suscetibilidade dos isolados no teste Bactec 460 e no fago ensaio.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Histórico	17
3.2 Taxonomia	19
3.3 Estrutura da Partícula	23
3.4 Ciclo de Multiplicação dos Bacteriófagos	24
3.5 Biodiversidade	29
3.5.1 Bacteriófagos com genoma de DNA de fita dupla	29
3.5.2 Bacteriófagos de DNA de fita simples: vírions icosaédricos	31
3.5.3 Bacteriófagos de DNA de fita simples: Vírions filamentosos	32
3.5.4 Bacteriófagos de RNA	33
4 Aplicação de Bacteriófagos como controle Microbiológico	33
4.1 Bacteriófagos como controle microbiológico de alimentos	34
4.2 Bacteriófagos como controle microbiológico de biofilmes	38
4.3 Bacteriófagos como controle microbiológico no meio ambiente	43
4.4 Aplicação de bacteriófagos na antibioticoterapia	47
5 Mecanismos de resistência x fagos	52
6 Conclusão	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Os vírus diferem das bactérias por apresentarem constituição não celular e serem parasitas intracelulares obrigatórios, não são capazes de crescer em meios de cultura artificiais. Apesar disso é possível estudá-los no laboratório, através de técnicas de cultivo celular, detectando os efeitos que provocam nas células que infectam (efeitos citopáticos) e por métodos sorológicos comumente utilizados, imunohistoquímica, Elisa, Imunofluorescência, soroneutralização e técnicas moleculares para detecção do genoma viral como a reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A estrita dependência das células hospedeiras deve-se à sua incapacidade de sintetizar as enzimas necessárias aos mecanismos de sua propagação. Os vírus ao adsorverem nas células são capazes de usar a maquinaria celular do hospedeiro para a manutenção e propagação da replicação viral (Campbell, 2007).

Os bacteriófagos também denominados apenas de fagos são vírus que infectam bactérias. A maioria dos fagos descritos infecta espécies de bactérias do grupo entérico, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Mas há aqueles que infectam uma variedade de procariontos, tanto bactérias quanto Archaea (Madigan *et al.*, 2008)

Os fagos foram descobertos em 1915 por Frederick Twort sendo descritos como agentes bacteriolíticos, pois, apresentava a capacidade de infectar e matar as bactérias. Em 1917 Felix D'Herelle descobriu um microrganismo invisível antagônico do bacilo da disenteria (*Shigella sp*) e o denominou de bacteriófago (Summers, 1999). D'Herelle continuou seus experimentos e em pouco tempo isolou fagos de outras bactérias causadoras de doenças (ex.: cólera, antrax, difteria, peste bubônica, etc.), desenvolvendo através do estudo com bacteriófagos o método para quantificação de vírus e outras teorias (Campbell, 2007).

Acredita-se que os bacteriófagos são a forma de vida mais abundante do planeta, podem ser encontrados no solo, água doce e salgada, plantas e animais, são ubíquos. O número de partículas virais estimado por gota de água do mar é de aproximadamente 10^6 partículas virais e no planeta o número estimado de fagos é

de 1×10^{30} (Sutle, 2005). Os bacteriófagos têm desempenhado um papel crucial na evolução da biosfera bacteriana, desempenham um papel importante no ciclo de nutrientes e energia, como exemplo o fago T4, também chamado de cianofagos, encontrado no oceano, e que podem codificar e expressar genes da fotossíntese na cianobactéria. Segundo Boyer e colaboradores (2007), os bacteriófagos representam um dos principais elementos genéticos móveis, que contribuem significativamente para a transferência horizontal de genes em bactérias e conseqüentemente aumento da biodiversidade genética bacteriana (Pal *et al.*, 2007).

Os vírus ambientais são sem dúvida o maior reservatório de diversidade genética do planeta. Eles estruturam as comunidades microbianas e são membros abundantes das comunidades aquáticas. Desde muitos anos são vetores de transmissão de genes e condutores de ciclagem de nutrientes e energia. A maioria dos fagos marinhos se assemelha a pequenos podovírus, embora os myovírus sejam os mais comumente isolados. Sabe-se que as cianobactérias contribuem para a fotossíntese no mar, não sendo surpreendente a grande quantidade de cianofagos encontrados (Sutle, 2005).

A fagoterapia é marcada por três eventos distintos, a era pré – antimicrobianos (antes da descoberta dos antibióticos), a era dos antimicrobianos (descoberta das penicilinas e sulfonamidas) e pós – antimicrobianos (descoberta da resistência das bactérias aos antibióticos). Os fagos foram utilizados como agentes terapêuticos logo após a sua descoberta. Em 1919, Felix D’Herelle foi autor do primeiro relato do uso de fagos para o tratamento de disenteria no homem. No entanto com a descoberta dos antibióticos na década de 40, as pesquisas foram interrompidas, mas suas propriedades genéticas abriram caminhos para novos segmentos da microbiologia, como a Biologia molecular (Campbell, 2007). Segundo Sulakvelidze *et al* (2001), outras razões foram responsáveis pelo abandono da fagoterapia, a falta de conhecimento de especificidade de fago bactéria, resposta imune com produção de anti-fagos e falhas nas técnicas empregadas. Na década de 80 a fagoterapia foi revitalizada como uma possível alternativa terapêutica para as infecções bacterianas, tendo em vista o aparecimento de bactérias multi resistentes a antibióticos. Os experimentos foram primeiramente desenvolvidos em animais no Reino Unido e na clínica médica no Leste europeu (Paisano, 2008). A fagoterapia

tem sido um método estudado não só no tratamento e prevenção de infecções bacterianas, mas também no controle microbiológico na indústria alimentícia e farmacêutica. Na área alimentícia relacionada ao controle de contaminação de legumes, frutas e outros alimentos, a terapia por fago pode ser eficaz. São utilizados produtos químicos para a lavagem dos alimentos e radiação gama para carnes, mas estes métodos podem ser prejudiciais a saúde e alterar o sabor e a qualidade do alimento (Behrsing, 2000). Os fagos também podem ser utilizados no controle ambiental como indicador de agentes patogênicos em água e solo; e na área humana em relação à multi resistência das bactérias patogênicas, a terapia fágica pode ser um método de escolha para o tratamento destas infecções e/ou potencializar a atividade das drogas.

A terapia com bacteriófagos para o controle microbiológico pode ser um método promissor, apresentando vantagens em comparação com os outros métodos: os fagos se replicam apenas no subconjunto alvo de bactérias, são auto-limitantes, ou seja, se replicam somente na presença da bactéria, podem ser administrados em dose única e não apresentam efeitos paralelos indesejáveis (Atterbury *et al.*, 2007). O estudo de bacteriófagos poderá levar ao desenvolvimento de tratamentos de baixo custo, novos testes diagnósticos e vantagens para diversas áreas da ciência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre bacteriófagos abordando conceitos como: estrutura da partícula, biodiversidade e possíveis aplicações da terapia com fagos.

2.2 Objetivos específicos

- Pesquisar artigos sobre bacteriófagos (definição, estrutura, tipos e características)
- Pesquisar artigos sobre as possíveis aplicações da terapia por fago
- Discutir comparativamente os resultados obtidos nos artigos assim como as vantagens e limitações das terapias que utilizam bacteriófagos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico

A história da fagoterapia iniciou-se com o relato de Ernest Hankin em 1896, que observou um agente filtrável com ação antibacteriana capaz de matar o *Vibrio cholerae* nas águas dos rios Ganges e Jumna, limitando a expansão das epidemias de cólera. No ano de 1898 o bacteriologista russo Gamaleya observou um fenômeno similar em um trabalho com *Bacillus subtilis*, mas essas descobertas não foram exploradas (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Em 1915 o assunto da terapia fágica foi reintroduzido pelo microbiologista Frederick Twort. Na tentativa de cultivar vírus em meios artificiais, inoculou - se em uma placa de ágar nutritivo o *Vaccinia vírus* na esperança de obter um modo de multiplicação do vírus sem precisar de células animais. Mas na placa foi observado apenas o crescimento de bactérias contaminantes e com as colônias apresentando mudança visível, um aspecto aquoso, mais transparente e que algumas haviam perdido a capacidade de crescimento. O fenômeno foi denominado de transformação transparente. Twort publicou um artigo sobre este estudo, concluindo que havia um vírus que era capaz de infectar e matar as bactérias, mas sua pesquisa foi interrompida devido à segunda Guerra Mundial, não levando esta descoberta em frente (Deresinski, 2009).

Somente 2 anos mais tarde em 1917, Felix D'Hrelle um bacteriologista canadense, estudando a causa de uma grande epidemia de disenteria que devastava a Europa, isolou o bacilo da disenteria e o cultivou em meios de cultura artificiais, observando que enquanto as bactérias cresciam apareciam halos claros indicando que naquele local não havia crescimento do bacilo. Os halos foram denominados de placas. D'Hrelle concluiu que, o agente responsável pela formação das placas era um vírus; capaz de lisar bactérias, denominando-os de bacteriófagos (Summers, 1999). D' Herelle tentou utilizar fagos para tratar a disenteria. Estes experimentos foram realizados no hospital Enfants Malades em Paris no ano de 1919. Os pacientes tratados com a fagoterapia apresentaram melhora logo após a primeira dose. D' Herelle e seus companheiros continuaram utilizando a fagoterapia para tratar várias doenças como a cólera e a peste bubônica na Índia (Campbell, 2007).

Nas décadas de 1920 e 1930, D'Herelle dedicou seu tempo nos estudos do possível uso de bacteriófagos na área médica, mas esta pesquisa não rendeu muitos frutos. Mas já sabiam que existiam bacteriófagos líticos e lisogênicos, características que futuramente seriam de grande relevância científica. D'Herelle chegou a comercializar preparações de fagos para terapia de doenças infecciosas. Estes produtos Bacte'-coli-fago, Bacte'-phage-intesti, Bacte'-pyo fago, e Bacte'- Staphy-fago eram comercializados pela Societe Franco (Deresinski, 2009). Mas com a introdução das sulfonamidas e penicilinas para tratamento das doenças infecciosas, a fagoterapia foi esquecida. Em 1938 os fagos passaram a ser utilizados como modelos para estudo da replicação viral. Ellis e Delbr projetaram uma curva de crescimento, para avaliar a liberação de novas partículas fágicas pela célula, definindo o período de latência quando se perde a infectividade viral. Tom Anderson em 1942 obteve a primeira imagem de microscopia eletrônica de um fago. No ano de 1946 foi realizado o primeiro curso para estudo dos fagos no Laboratório de Cold Spring Harbo nos EUA.

Os anos de 1950 e 1975 foram períodos marcados pelas intensas pesquisas com os bacteriófagos. Destacando as três principais áreas: infecção de *Escherichia coli* por fagos líticos, natureza da lisogenia de fago lambda e replicação e propriedades dos fagos. Durante este período, dois experimentos foram de grande relevância. No ano de 1952 os pesquisadores Hershey e Chase utilizaram proteínas virais marcadas e ácidos nucleicos, para estudar o processo de infecção do fago e suas alterações na célula, com a incorporação do DNA do fago com o DNA da célula hospedeira, observaram que o DNA da bactéria tinha todas as informações necessárias para produzir novos vírus. O segundo experimento foi realizado em 1953, no qual foi identificada uma nova base de hidroximetilcitosina, no DNA do fago T, que substituíra o lugar da citosina no DNA bacteriano. Esta descoberta abriu caminhos para novos estudos, sobre como o fago introduzia informações genéticas para a produção de novas enzimas na célula bacteriana (Campbell, 2007).

Em 1954 Jacob e Wollman, em suas pesquisas com fagos lisogênicos no Instituto Pasteur, observaram que o vírus se comportava como um gene bacteriano em um cromossomo da bactéria, sugerindo que o material genético viral poderia ser mantido em estado de latência nas bactérias por regulação negativa. Esta

observação deu início ao estudo do modelo Operon e a natureza da regulação gênica (Campbell, 2007). Nos anos de 1963 a 1969, Inchley mostrou que o sistema retículo endotelial conseguia remover fagos injetados por via intravenosa. Na década de 70 Geier realizou um estudo para avaliar a eficácia da fagoterapia por via oral. E concluiu que esta via de administração era ineficaz para a distribuição sistêmica. Nos anos 80 Smith e Huggins realizaram várias experiências de terapia fágica e os resultados foram mais eficazes que o tratamento com antibióticos. Na mesma época o Instituto de Imunologia e terapia experimental em Wrocow começa a tratar seres humanos com a fagoterapia (Hynes *et al.*, 1995). Em 1990 e 1996 as indústrias de biotecnologia começam a explorar a terapia fágica nos países ocidentais, neste período também ocorreram estudos da farmacocinética da terapia com fagos (Garvey *et al.*, 1996). Nos anos de 2002 e 2003 foi realizada a fagoterapia para *Enterococcus* resistentes a vancomicina e *S.aureus* metilicina resistente em camundongos (Stummeyer *et al.* , 2006).

3.2 Taxonomia

David Baltimore em 1971 desenvolveu o sistema de classificação de vírus, que é baseado na síntese de RNAm Viral. O sistema de Baltimore agrupa os vírus em sete classes de acordo com seu genoma (DNA e RNA, fita dupla ou simples) modo de replicação e expressão gênica. Os fagos pertencem às classes: I (DNAds que fazem a transcrição do mRNA por assimetria), II (DNAss da mesma polaridade do mRNA), III (RNAds que fazem a transcrição do mRNA por assimetria e produz RNAm diretamente) e IV (RNAss de sentido positivo).

O Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2009) estabelece critérios taxonômicos para diferenciação entre as Ordens, Famílias e Gêneros. Dentre eles os mais importantes são: tipo de organização do genoma viral, estratégia de replicação viral e estrutura do vírion. Para diferenciação de espécies alguns critérios estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Propriedades taxonômicas dos vírus

Propriedades Taxonômicas	
Morfologia	Tamanho, forma, presença ou ausência de envelope, simetria do capsídeo, estrutura.
Propriedades físicas-químicas	Massa molecular, estabilidade (pH, temperatura)
Propriedades do Genoma	DNA ou RNA Tamanho do genoma (kb/kbp), ácidos nucleicos, genoma linear ou circular, fragmentado ou não.
Proteínas Virais	Quantidade e funções
Propriedades Biológicas	Hospedeiro, modo de transmissão, distribuição geográfica, patogenicidade.

Fonte: ICTV, 2009

Os bacteriófagos são agrupados em 13 famílias. Os fagos que possuem na sua estrutura uma cauda pertencem à ordem *Caudovirales* e correspondem a 96% dos fagos descritos. Cerca de 60% dos fagos com cauda longa e não contrátil pertencem à família *Siphoviridae*, 25% dos fagos com cauda contrátil são *Myoviridae* e os de cauda curta e não contrátil são *Podoviridae*. Os 4% dos fagos restantes distribuem-se pelas outras 10 famílias (Figura 01) (Madigan *et al.*, 2008; Birge, 1994, Ackermann, 1999).

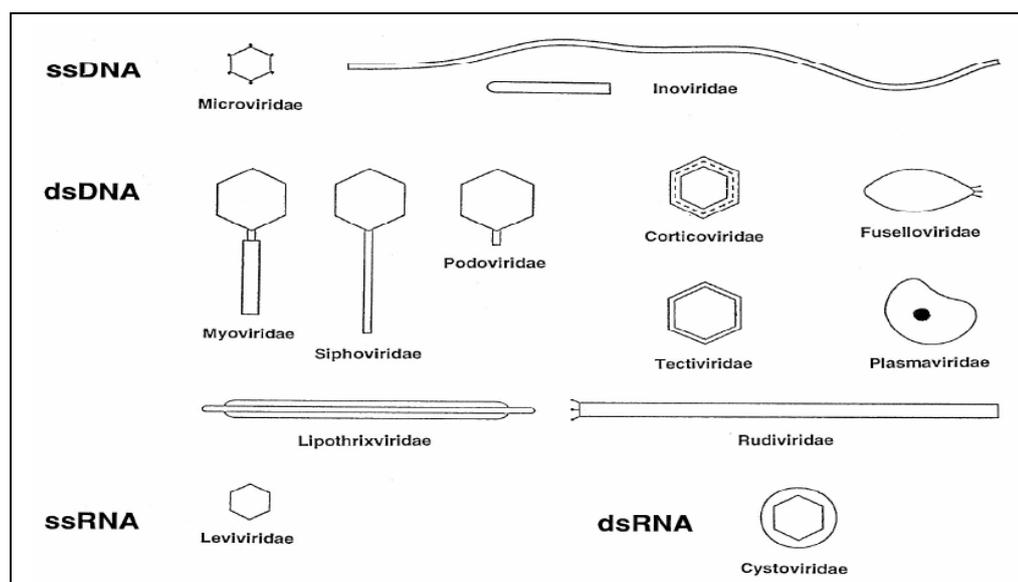


Figura 01: Representação das 13 famílias descritas para a classificação dos fagos
Fonte: Proença, 2009.

Na tabela a seguir estão descritos alguns exemplos das famílias mais predominantes conforme o ICTV.

Tabela 2 – Descrição e taxonomia de algumas famílias de bacteriófagos.

Ordem	Família	Gêneros /Espécies	Características	Classificação de Baltimore
Caudovirales	Siphoviridae	Gênero <i>λ-like viruses</i> ; espécie tipo: <i>Fago λ de Enterobacteria</i>	Genoma DNAfd que sintetiza RNAm diretamente/ forma de replicação pelo método semi-conservativo.	Classe I
	Myoviridae	Gênero <i>T4-like viruses</i> ; espécie tipo: <i>Fago T4 de Enterobacteria</i>		
		Gênero <i>Mu-like viruses</i> ; espécie tipo: <i>Fago Mu de Enterobacteria</i>		
	Podoviridae	Gênero <i>T7-like viruses</i> ; espécie tipo: <i>Fago T7 de Enterobacteria</i>		
		Gênero <i>Inovírus</i> ; espécie tipo: <i>Enterobacteria phage M13</i>	Genoma de DNAfs que utiliza um intermediário de DNAfd para sintetizar RNAm.	Classe II
	Microviridae	Gênero <i>Chlamydia microvívus</i> ; espécie tipo: <i>Chlamydia phage 1</i>		
		Gênero <i>Microvívus</i> ; espécie tipo: <i>Enterobacteria phage phix 174</i>		
	Cystoviridae	Gênero <i>Cystovívus</i> ; espécie tipo: <i>Pseudomonas phage phi 6</i>	Vírus com genoma de RNAfd que sintetiza RNAm diretamente	Classe III
Não inserido a uma ordem	Leviviridae	Gênero <i>Levivirus</i> ; espécie tipo: <i>Enterobacteria phage MS2</i>	Genoma de RNA de sentido positivo	Classe IV

Fonte: ICTV, 2009

3.3 Estrutura da Partícula

A maioria dos bacteriófagos contém genomas de DNA dupla fita sendo o tipo mais comum encontrado no ambiente. Mas existem aqueles com genomas de RNA de fita simples, de fita dupla segmentado e DNA de fita simples que não apresentam envelopes lipídicos. As partículas virais dos fagos com genoma DNA apresentam os seguintes componentes: cabeça, cauda, colarinho, fibras da cauda, placa basal e espículas da cauda (Figura 02). Geralmente os bacteriófagos de DNA dupla fita apresentam cauda como os fagos T2, T4 e MU. As caudas são contráteis sendo essenciais no processo de penetração do material genético. Existem aqueles que apresentam a cauda flexível como o fago lambda (Madigan *et al.*, 2008, Demuth *et al.*, 1998).

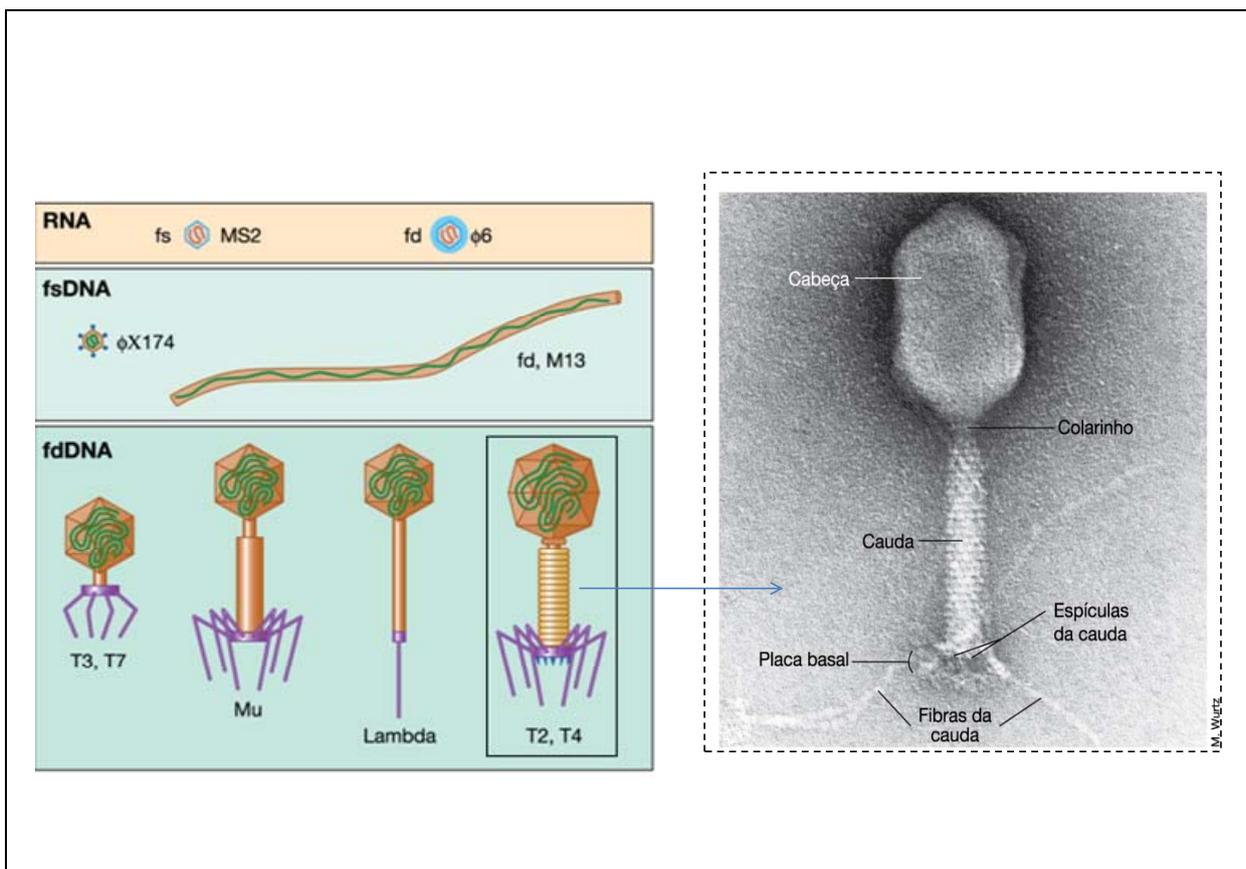


Figura 02: Estrutura de bacteriófagos e microscopia eletrônica do fago T4.
Fonte: Madigan *et al.*, 2010

3.4 Ciclo de Multiplicação dos Bacteriófagos

Quando um fago infecta uma bactéria permissiva acontecerá: a lise ou a lisogenia da bactéria. Quando ocorre a lise o metabolismo da bactéria é reorientado para a síntese do DNA genômico do vírus e das proteínas, para produzir as partículas fágicas maduras (Figura 03). Usado o material celular disponível a célula é lisada e libera os vírus maduros, capazes de reinfectar novas bactérias (Hanlon, 2007). A evidência visual da ação do fago é conseguida pela cultura da bactéria em meio sólido, em camada uniforme e infecção de algumas células com o bacteriófago. A camada de bactérias, naturalmente opaca, apresenta círculos claros correspondentes aos locais em que um fago infectou e destruiu a população de células vizinhas, formando as placas virais (figura 04).

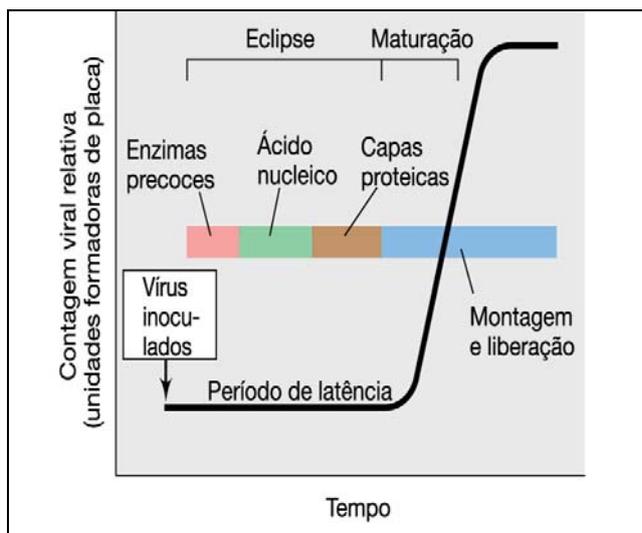


Figura 03: Curva da replicação viral
Fonte : Madigan *et al.*, 2010

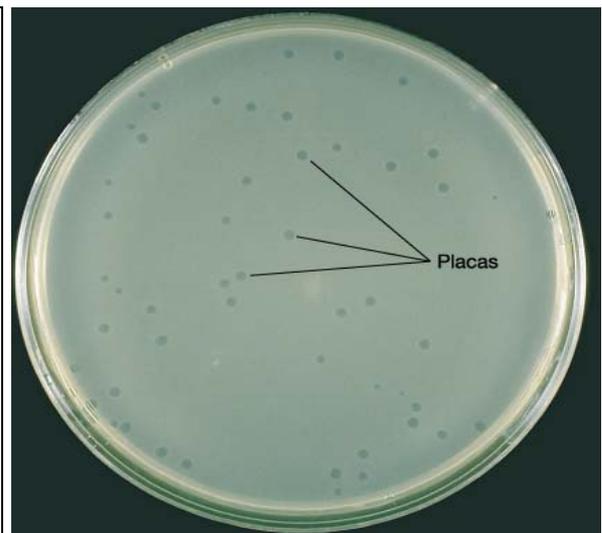


Figura 04 :Placas virais formadas por fagos líticos.
Fonte: Madigan *et al.*, 2010

Várias etapas do ciclo de replicação dos bacteriófagos são similares às de qualquer outro vírus, como as etapas de adsorção e injeção do ácido nucléico que são comuns aos ciclos líticos e lisogênicos.

A primeira etapa da replicação viral é a adsorção, sendo constituída por três fases: contato inicial, ligação reversível e ligação irreversível. O contato inicial ocorre através

dos efeitos de difusão e movimentos Brownianos. Segue-se então a ligação reversível, uma ligação mais fraca através da associação de qualquer estrutura fágica à superfície celular. A ligação irreversível ocorre entre o fago e os receptores da célula hospedeira através da especificidade. Esses receptores podem ser proteína de membrana externa, lipossacarídeos, F+ (pillus) e outros (Weinbauer, 2003). Após adsorção ocorre a penetração dos vírus, que pode acontecer dos seguintes modos, injeção do ácido nucléico, onde o fago contrai a cauda através da membrana celular da bactéria e injeta o ácido nucléico (Campbell, 2007). Os fagos que penetram por endocitose são englobados pela membrana plasmática e ficam no interior de vesículas nas células, essas vesículas podem fundir-se em endossomas para digestão do capsídeo viral, liberando o ácido nucléico, os fagos com envelope penetram na célula hospedeira através da fusão do envelope com a membrana celular. Em seguida ocorre a etapa de desnudamento, separação física do ácido nucléico viral dos outros componentes estruturais do vírion. Geralmente os nucleocapsídeos contêm polimerases e o seu desnudamento ocorre em pH ácido. Nesta fase acontece a perda da infectividade do vírus original denominada de período de eclipse (Ver figura 03) (Silankorva, 2004).

Os vírus temperados ou lisogênicos assumem um estado de latência, em que seu genoma é replicado com o genoma do hospedeiro, sem provocar a morte celular. O DNA do fago é integrado no cromossoma da bactéria e esta se replica normalmente. Mas ocasionalmente uma destas bactérias entra em ciclo lítico e libera os vírus capazes de infectar outras células (Weinbauer, 2003). A lisogenia provavelmente apresenta importância ecológica, uma vez que a maioria das bactérias isoladas da natureza encontra-se em estado de lisogenia para um ou mais bacteriófagos (Figura 05) (Campbell, 2007).

Segundo Liemann *et al* (2002), os estudos com bacteriófagos proporcionaram o conhecimento a respeito dos vírus lisogênicos, demonstrando em seus experimentos que um vírus lisogênico se comporta como um gene bacteriano em um cromossomo de uma bactéria, sugerindo que o material genético viral foi mantido em repouso em bactérias por regulação negativa.

Mas se o fago for virulento, ou seja, se realiza o ciclo lítico, este redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos. Os fagos virulentos ou líticos promovem a lise ou morte de seus hospedeiros após a infecção. Esses fagos são designados como T1, T2 e assim sucessivamente até T7. Um ciclo lítico dura em média 25 minutos, mais de cem novas partículas virais são liberadas de uma célula hospedeira. A lise da célula ocorre devido à produção de uma enzima lítica, a lisozima T4 que degrada o peptidoglicano da célula hospedeira (Figura 05 e 06) (Madigan *et al.*, 2008).

A produção de proteínas específicas apresenta duas fases: A fase inicial que se caracteriza pela síntese de enzimas e substratos para posterior replicação do ácido nucléico e a fase final ou tardia (maturação), onde são sintetizadas proteínas estruturais virais e enzimas necessárias para a morfogênese do capsídeo e empacotamento do ácido nucléico, levando a formação de partículas virais (Figura 03). A liberação das partículas virais e outros componentes celulares é a etapa final de um processo lítico. O peptidoglicano tem que ser hidrolisado através de endolisinas que atacam a porção mureína da parede celular, e a membrana celular têm que ser destruída pelas holinas, liberando as partículas virais (Young, 2005).

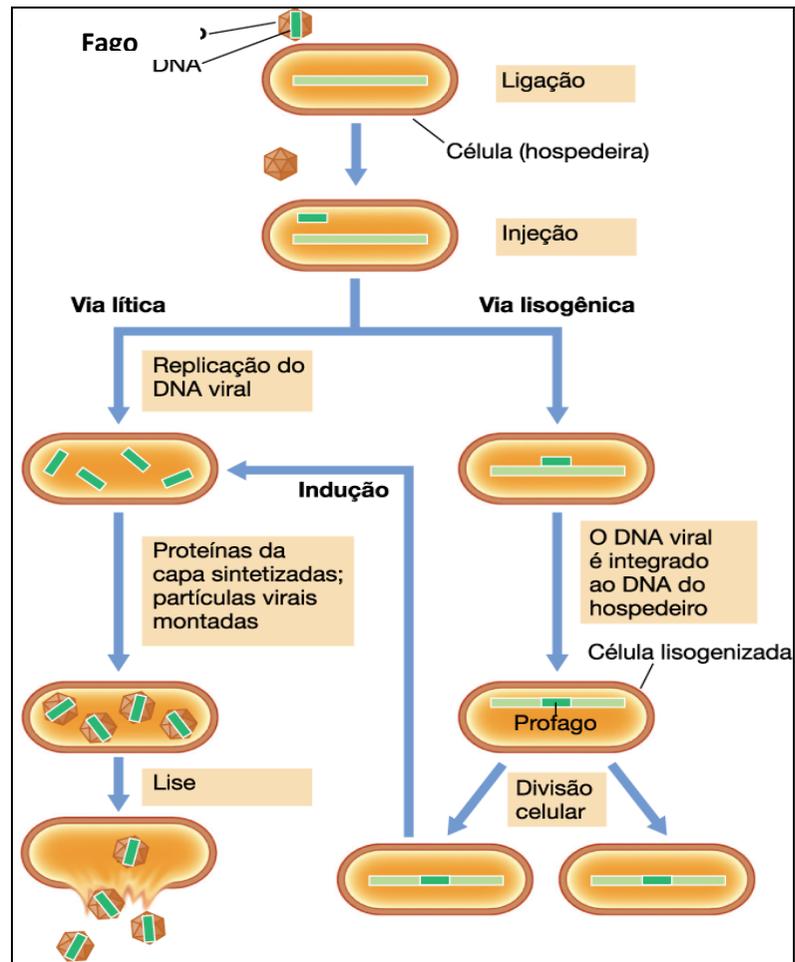


Figura 05: Ciclo Lítico e Lisogênico de um fago

Fonte : Madigan *et al.*, 2010

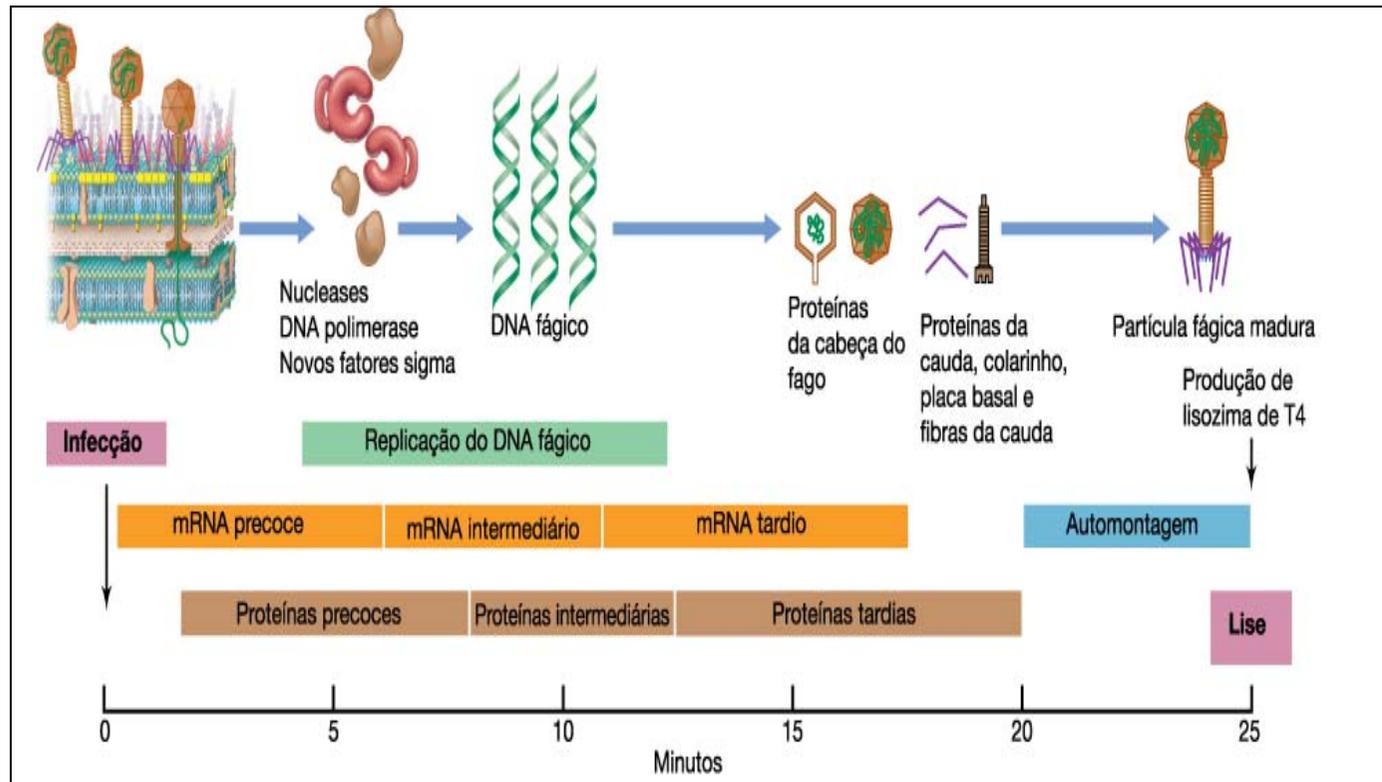


Figura 06: Tempo de duração de eventos que ocorre durante a infecção do fago T4.
 Fonte: Madigan *et al.*, 2010

3.5 Biodiversidade

A abundância dos bacteriófagos varia em diferentes ambientes e está diretamente relacionada com a abundância de seus hospedeiros (bactérias) ou sua atividade. A maioria dos vírus encontrados no ambiente são tipicamente fagos. A seguir estão descritas a diversidade viral e suas características.

3.5.1 Bacteriófagos com genoma de DNA de fita dupla

T4

O fago T4 é o mais estudado, e sua partícula é extremamente complexa, possuindo cauda longa, placa basal com pontas curtas e seis longas fibras da cauda retorcida. O genoma do T4 corresponde a uma molécula de DNA linear, de fita dupla com cerca de 168.903 pares de bases que codifica mais de 250 proteínas diferentes e vários RNAs diferentes (ModA & ModB, 2004). O DNA do fago T4 contém a base 5- hidroximetilcitosina que corresponde a resíduos de glicosídeos em vez de citosina. Moléculas de DNA com esta modificação são mais resistentes às enzimas de restrição, estando mais protegido contra as defesas do hospedeiro. Seus hospedeiros são certas linhagens de *Escherichia coli*, e estes vírus fazem parte do grupo de cianofagos (ver figura 07) (Madigan *et al.*, 2008, Petrov *et al.*, 2010)

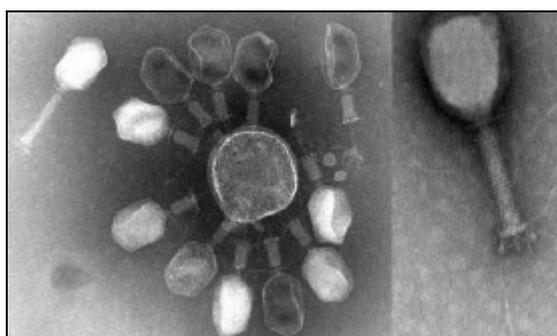


Figura 07: Microscopia eletrônica do Fago T4
Fonte: Chibani-chenoufi *et al.*, 2004

T3 e T7

São vírus relativamente pequenos apresentam cauda curta e infectam *Escherichia coli* e algumas linhagens dos gêneros *Shigella* e *Pasteurella* (Figura 08). São denominados de colifagos. Seu genoma corresponde a uma molécula de DNA

linear de fita dupla. O genoma do fago T7 contém cerca de 39.936 pares de base (pb) que se distribuem em uma molécula de DNA linear de fita dupla. Cerca de 92% do DNA codificam proteínas (Petrov *et al.*, 2010).

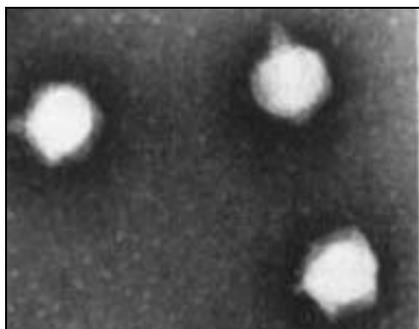


Figura 08: Microscopia eletrônica do Fago T3 e T7
Fonte: ICTV, 2009

MU- vírus transponível

Outro bacteriófago de DNA dupla fita é o MU que corresponde a um vírus grande com cabeça icosaédrica, e no qual a maior parte da informação genética está envolvida na síntese das proteínas da cauda e cabeça (Figura 09). É um vírus temperado e foi denominado como MU por ser mutador, ou seja, é capaz de induzir mutações no genoma de seu hospedeiro. O fago MU é muito utilizado na engenharia genética, constituindo-se numa ferramenta valiosa devido aos mecanismos de transposição replicativa. Apresenta elementos transponíveis que são seqüências de DNA que exibem habilidade de se mover de um local para outro no genoma do hospedeiro (Pato & Oram, 2004).

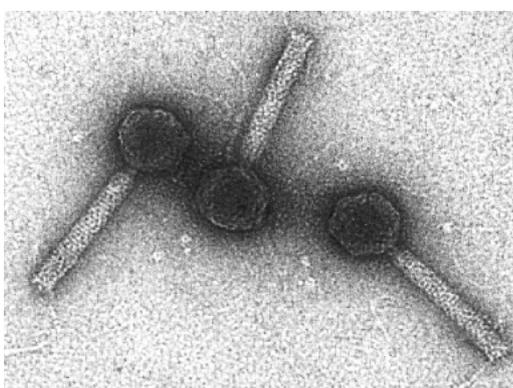


Figura 09: Microscopia eletrônica do Fago MU
Fonte: www.ucm.com.br

Bacteriófago lambda

O bacteriófago lambda é um dos vírus temperados mais estudados e amplamente utilizado na engenharia genética como vetor de clonagem de DNA recombinante. O bacteriófago lambda infecta *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*. (Fogg *et al.*, 2010). Morfologicamente, as partículas do fago lambda são similares às de muitos outros bacteriófagos (Figura 10). Seu genoma consiste em uma molécula de DNA dupla fita linear, que apresenta uma cauda de 12 nucleotídeos de comprimento na extremidade 5' de cada uma das fitas. Essas extremidades são complementares, ou seja, coesivas. Quando as duas extremidades encontram-se livres na célula hospedeira associam-se e originam um genoma circular de fita dupla com 48.502 pares de bases. (Madigan *et al.*, 2008, Pal *et al.*, 2007).

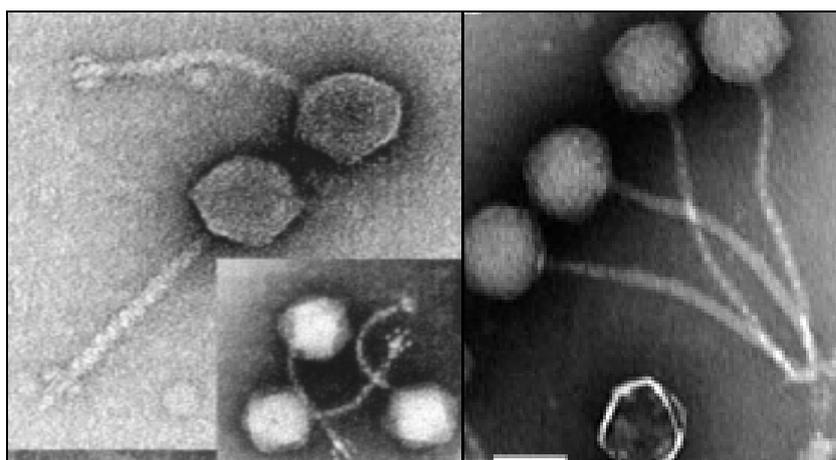


Figura 10: Microscopia eletrônica do Fago lambda
Fonte: Chibani-chennoufi *et al.*, 2004

3.5.2 Bacteriófagos de DNA de fita simples: vírions icosaédricos

Estes bacteriófagos correspondem aos vírus da classe II do sistema de Classificação de Baltimore. Os bacteriófagos da classe II são senso positivo e apresentam genoma de DNAfs que utiliza um intermediário de DNAfd para sintetizar RNAm. Antes que o genoma seja transcrito a fita complementar deve ser sintetizada. Um dos fagos desta classe é o Ø X174 importante nos estudos de replicação de DNA que é uma importante ferramenta na engenharia genética (Tiemann *et al.*, 2004). O bacteriófago Ø X174 foi o primeiro a ser completamente

seqüenciado. Seu genoma apresenta cerca de 5.836 nucleotídeos e seqüências de codificação para pelo menos 10 proteínas importantes para sua replicação. Os fagos Ø X174 são pequenos vírus de 25 nm e DNA circular, que possuem apenas uma quantidade limitada de informação genética em seu genoma (Figura 11), utilizando a maquinaria de replicação de DNA da célula hospedeira na replicação do DNA viral. Este fago tem como hospedeiro específico as células de *Escherichia coli* (Madigan *et al.*, 2008).

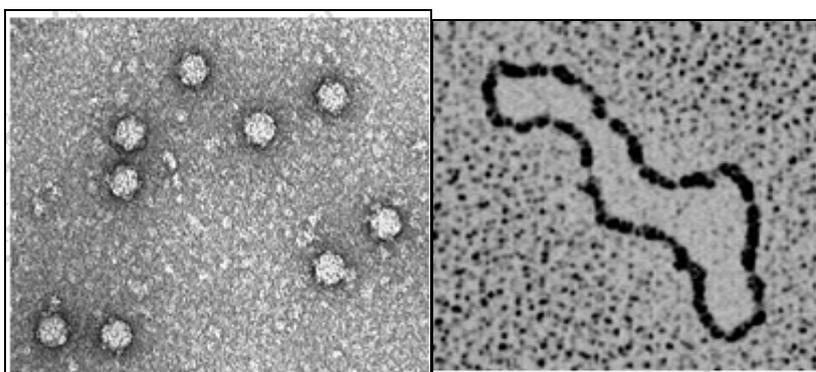


Figura 11: Microscopia eletrônica de partículas e DNA do fago Ø X174
Fonte: ICTV, 2009

3.5.3 Bacteriófagos de DNA de fita simples: Víriões filamentosos

Os fagos filamentosos de DNA apresentam simetria helicoidal. O membro mais estudado deste grupo é o M13 (Figura 12) (Straus *et al.*, 2008). O fago M13 infecta *Escherichia coli*, penetrando após se ligarem ao pillus da bactéria. Apesar de sua estrutura ser linear, seu DNA é circular. Estes fagos apresentam uma propriedade interessante, pois são liberados sem matar a célula hospedeira. A célula hospedeira pode continuar se multiplicando enquanto libera as partículas virais (Hemminga *et al.*, 2010). O fago M13 é muito utilizado como vetor de clonagem e também como modelo biológico para a nanotecnologia. O fago M13 é um vírus de alta taxa de produção, composto por cinco proteínas modificadas envolvidas na formação do capsídeo.



Figura 12: Microscopia eletrônica do fago filamentososo M13
Fonte: ICTV, 2009

3.5.4 Bacteriófagos de RNA

Os fagos de RNA são pequenos, com 26nm aproximadamente e de simetria icosaédrica, com 180 cópias da proteína do capsídeo por partícula viral. Um exemplo é o fago MS2 que infecta *Escherichia coli*, muito utilizado no controle de contaminação de água. Seu genoma é composto por 3.569 nucleotídeos que codifica apenas quatro proteínas (proteínas de maturação, capsídeo, lise e RNA ligase) (Madigan *et al.*, 2008). Muitos bacteriófagos apresentam genoma de RNA na configuração positiva, mas o grupo de bacteriófagos de RNA que infectam bactérias entéricas somente as infecta quando estas apresentam plasmídeo conjugativo que permite a bactéria atuar como célula doadora (F+) no processo de transferência de genes. (Figura 13) (Shin & Sobsey 2003).

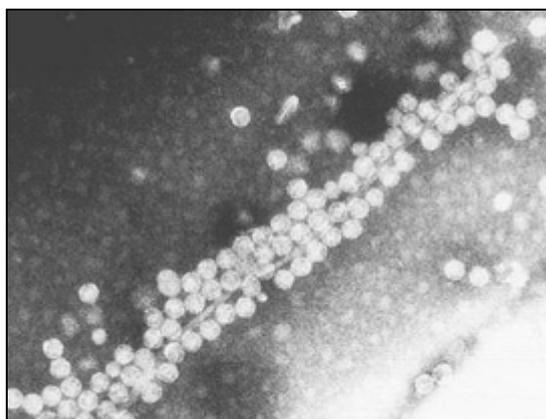


Figura 13: Microscopia eletrônica de partículas do fago MS2
Fonte: ICTV, 2009

4 Aplicações de bacteriófagos como controle microbiológico (Aplicações biotecnológicas dos bacteriófagos)

A fagoterapia é o uso do fago lítico para prevenir infecções e contaminações bacterianas. O conhecimento sobre terapia por fago permite-nos considerar estes

vírus como uma arma poderosa contra bactérias (Hanlon, 2007). Sulakvelidze *et al* em 2001, afirmaram que várias características tornam os bacteriófagos atraentes: podem ser utilizados como agentes terapêuticos, agentes de controle biológico, e são auto-replicantes, etc.

Os bacteriófagos se constituem em uma ferramenta natural, não tóxica, viável para o controle de diversos patógenos, podendo ser isolados do solo, da água, do fundo do oceano, e do corpo de animais, pois os fagos se propagam em bactérias que são simbióticas ou patogênicas aos organismos mais evoluídos. Sabe-se que os bacteriófagos são muito comuns no trato gastrointestinal e junto com as bactérias hospedeiras são um importante componente da flora intestinal. Muitos resultados de pesquisas reportadas no passado mostraram eficiência variada na aplicação dessa terapia, no entanto estudos mais recentes e rigorosos têm demonstrado a efetividade da terapia fágica. Com o presente conhecimento que se tem dos fagos e genética bacteriana é possível driblar os problemas encontrados em tentativas anteriores de se usar os fagos como agente antimicrobiano natural (Merril *et al.*, 2003).

4.1 Bacteriófagos como controle microbiológico de alimentos

A maioria das doenças alimentares tem sido associada ao consumo de alimentos mal cozidos e contaminados com agentes bacterianos patogênicos (Ackers, *et al.*, 1998). No entanto a descontaminação de frutas, legumes e carnes é um grande desafio, uma vez que as técnicas empregadas utilizam tratamento dos alimentos com produtos químicos antibacterianos, que podem ser eficazes, mas sua intensa utilização tem levado à emergência de mecanismos de resistência, diminuindo a ação destes. Ressalta – se também que estas substâncias podem ser prejudiciais à saúde. Vários agentes patogênicos estão relacionados com os surtos de infecção alimentar em nível mundial. As cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella sp* são as mais comumente relacionadas aos surtos de contaminação alimentar. As carnes de varejo podem ser um reservatório destes agentes, causando infecções extra-intestinais em humanos (Vicente *et al.*, 2010). O *Campylobacter jejuni* é uma das principais causas de doença entérica na Inglaterra sendo responsável por aproximadamente 350 mil casos no ano de 2000. A infecção humana pode ser

adquirida pelo consumo de carne de frango mal cozida (Newell & Fearnley, 2003). Seu reservatório natural são as aves de capoeira, e a diversidade genômica do *C.jejuni* limita a aplicação de métodos como a utilização de antibióticos para controle do agente (Dworkin & Blaser, 1997).

A *Listeria monocytogenes*, causadora da listeriose, tem sido detectada em surtos graves de origem alimentar, podendo ser isolada de uma variedade de alimentos prontos para consumo. Este agente representa um grande risco para saúde pública no qual a legislação europeia estabelece como critério de segurança alimentar a ausência do microrganismo em 25g de alimento (Dupont & Augustin 2009). Estima-se que cerca de 2.000 internações e 500 mortes ocorrem anualmente nos EUA devido à contaminação por *Listeria monocytogenes* (Guenther *et al.*, 2009).

Em 2009, a Autoridade Europeia da Segurança dos Alimentos (AESA) publicou um relatório dos riscos biológicos para segurança dos alimentos afirmando que os bacteriófagos, poderiam ser uma forma eficaz de eliminar patógenos específicos dos alimentos. Atualmente a garantia da segurança microbiológica na alimentação é baseada em princípios que envolvem um vasto leque de medidas de controle aplicadas coordenadamente em todas as etapas da cadeia alimentar. A descontaminação de um grande número de diferentes produtos alimentares tem sido descrita na literatura. Alguns processos envolvem a aplicação de microrganismos vivos para inibir ou erradicar a patogenicidade e / ou bactérias decompositoras nos alimentos. Para este propósito, a utilização de bacteriófagos tem atraído recentemente um interesse crescente. O relatório da AESA analisou a fagoterapia principalmente para os tipos de alimentos mais importantes de origem animal (carne e produtos à base de carne, leite e derivados). No relatório foi indicado que os bacteriófagos tendem a persistir mais tempo do que as bactérias e se comportam como partículas inertes no ambiente. No entanto, a sua atividade antibacteriana de longo prazo é reduzida em superfícies secas e sua persistência nos alimentos varia em cada tipo de bacteriófago e com as condições de aplicação. Fatores que estão associados com a eficácia do uso dos bacteriófagos são a dose e fatores físico-químicos associados com os alimentos, tais como pH, umidade e

temperatura. A refrigeração, por exemplo, melhora a persistência de bacteriófagos sobre as superfícies de carne e produtos lácteos (Weekly,2009).

Em 2007 Atterbury e colaboradores realizaram um estudo de terapia com bacteriófagos para testar a redução da colonização de salmonela em frangos. Neste trabalho foram isolados bacteriófagos de vários sorotipos de salmonela, os fagos isolados foram administrados nas aves. Após o período de 36 a 38 dias as aves foram avaliadas através da contagem de amostras de salmonela e fago do ceco, e os resultados obtidos indicaram a diminuição de salmonela quando administrado um título mais alto de fago específico do seu hospedeiro. O trabalho também descreve alguns questionamentos quanto à terapia e que se referem ao período de aplicação, idade e dose, e em especial destaca a possível resistência das bactérias aos fagos. Abulazed *et al*, em 2007 descreve a redução experimental de *E.coli* O157 : H7 na contaminação de superfícies duras e alimentos como , tomates, espinafre, brócolis e carne moída. Conforme OMS (2002) outro aspecto importante é a contaminação de equipamentos, instalações de processamento de alimentos por bactérias patogênicas que podem ser veiculadas por bioterroristas. O uso de químicos para desinfecção de superfícies duras pode ser eficaz, mas muitos apresentam atividade corrosiva e tóxica. Para testar a terapia fágica um coquetel de fago ECP-100 de *E.coli* O157:H7 de bacteriófagos específicos foi utilizado para o estudo nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 PFU/mL. A atividade lítica foi avaliada. O resultado obtido foi a redução significativa de 99% - 94% de cepas de *E.coli* O157:H7 viáveis.

El Shibiny *et al* em 2005 avaliaram a diversidade de espécies de *Campylobacter* presentes em sistema de criação de frangos ao ar livre e orgânicos assim como a susceptibilidade deste agente aos fagos. A espécie predominante foi o *Campylobacter jejuni* e os resultados obtidos na terapia fágica demonstraram a redução significativa de *Campylobacter jejuni* no rebanho orgânico ao 28º dia da terapia. Em contrapartida Scott e colaboradores em 2007 avaliaram a dinâmica do genoma de *Campylobacter jejuni* e a resposta na predação de bacteriófagos. Alguns trabalhos descrevem a resistência aos bacteriófagos em frangos de corte devido a rearranjos genômicos, que causam inversões intra genômicas levando à resistência aos bacteriófagos. Uma das maiores preocupações em relação à terapia com fagos

para *C. Jejuni* é a possibilidade dos fagos MU temperados capazes de induzir mutações, estarem associados a determinantes de virulência. Um exemplo são os genes que codificam as toxinas da difteria e *E.coli* verotoxigênica (Nechaev & Severinov, 2009). Com estas hipóteses o principal benefício terapêutico seria reduzir temporariamente a transmissão e eliminação de *C.jejuni* em vez de eliminá-lo. No trabalho de Scott e colaboradores em 2007 foi realizado um teste in vitro, no qual identificaram 91% de isolados resistentes aos fagos devido às inversões intra genômicas.

Segundo Kim e colaboradores (2008), as plantas (fábricas) de processamentos de alimentos nos EUA apresentam freqüentes contaminações por *Listeria monocytogenes*, bactérias formadoras de biofilmes e resistentes a vários tipos de desinfetantes. Neste trabalho foram identificados 12 tipos de fagos e seus respectivos hospedeiros (diversas espécies de *Listeria* e principalmente *Listeria monocytogenes*), no qual algumas cepas de *Listeria monocytogenes* apresentaram resistência aos fagos diminuindo a capacidade de adsorção do vírus. Em contrapartida Guenther e colaboradores (2009) realizaram um estudo com fagos virulentos para o biocontrole de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos, como fermentados, queijos e carnes. Neste estudo foram selecionados 8 tipos de alimentos (salsichas, queijos, leites fermentados, mariscos cozidos, carnes de peito de peru, etc.) freqüentemente contaminados com *L. monocytogenes*. Os alimentos foram contaminados experimentalmente e infectados com fagos na concentração de 10^8 PFU/g ou ml de alimento. Os alimentos foram incubados em temperatura própria de armazenamento, e também em temperatura mais elevada próxima a temperatura ambiente. Após o armazenamento as bactérias viáveis foram quantificadas. As figuras a seguir apresentam os resultados obtidos com a utilização da fagoterapia realizada neste experimento.

A figura 14a demonstra a redução de *Listeria monocytogenes* em salsichas e leite achocolatado, o teste foi realizado a 6°C por 13 dias. A redução de *Listeria monocytogenes* na salsicha foi de 10^7 para 10^2 UFC/ ml e no leite achocolatado a redução foi de 10^8 para zero. Na figura 14b o teste foi realizado a 20°C por 6 dias. Observa-se que a fagoterapia reduziu o nº de *Listeria monocytogenes*, mas não foi

tão eficaz quanto o primeiro teste. A redução na salsicha foi de 10^9 para aproximadamente 10^6 e no leite achocolatado de 10^9 para aproximadamente 10^3 .

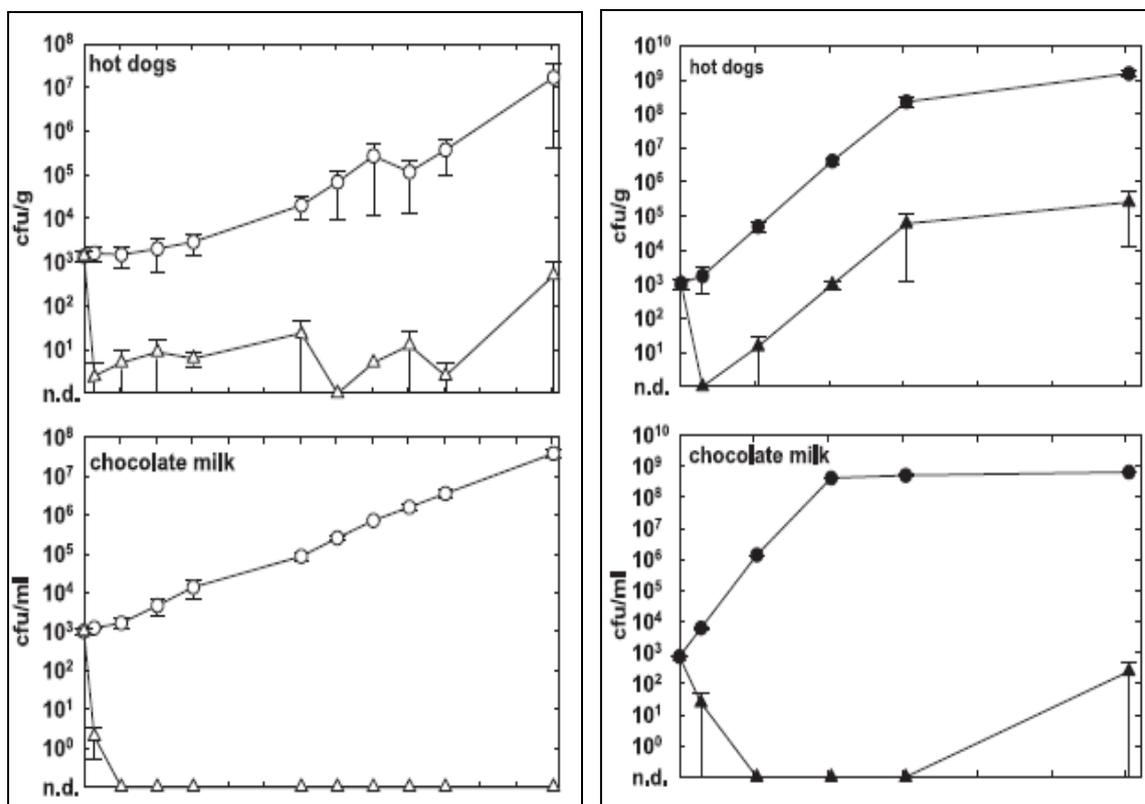


Figura 14a: Efeito do fago no crescimento de *L.monocytogenes*. Amostras armazenadas por 13 dias a 6°C. Círculos abertos controles sem o fago e triângulos abertos amostras de alimentos tratados com fagos. Fonte: Guenther *et al.*, 2009

Figura 14b: Efeito do fago no crescimento de *L.monocytogenes*. Amostras armazenadas por 6 dias a 20°C. Círculos fechados controles sem o fago e triângulos fechados amostras de alimentos tratados com fagos. Fonte: Guenther *et al.*, 2009

O sucesso da fagoterapia no controle microbiológico de alimentos depende de vários fatores, como carga viral utilizada, pois quanto maior o título utilizado maior será a redução de microrganismos. Outros fatores importantes também são o tipo de alimento, pH, umidade, temperatura e fatores intrínsecos como força iônica que podem prejudicar na adsorção do fago à superfície bacteriana. Os parâmetros citados são definidos para cada alimento e podem ser alterados durante o processo de produção (Carlton *et al.*, 2005). Segundo os autores em estudos anteriores foi relatada a ineficácia da terapia devido a utilização de fagos temperados incapazes de realizar o ciclo lítico.

4.2 Bacteriófagos como controle microbiológico de biofilmes

Vários problemas envolvem o biofilme bacteriano, pois são importantes na patogênese de infecções, e podem se desenvolver em uma variedade de ambientes, como materiais cirúrgicos em hospitais, sistemas de obtenção de água em indústrias, etc. A *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* são os principais microrganismos formadores de biofilme (Figura 15 e 16). Estes microrganismos apresentam capacidade de deterioração devido à produção de lipases termo-estáveis, proteases e lecitinases, provocando o aumento da colonização de superfícies inertes por outros microrganismos formando o biofilme, sendo de difícil erradicação devido a resistência destes microrganismos aos produtos químicos utilizados para sua remoção (Dogan & Boor, 2003). Outro microrganismo de grande importância na formação de biofilmes é o *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (Figura 15) freqüentemente isolados de cateter no ambiente hospitalar, sendo o principal agente causador de endocardite e infecções renais. Nos EUA estima-se entre 12-25% de mortalidade devido a formação de biofilmes nos instrumentos cirúrgicos. Os métodos de esterilização utilizados nem sempre são eficazes para destruição de biofilmes em instrumentos hospitalares, e a resistência intrínseca dos microrganismos às drogas são uma grande preocupação, levando deste modo ao interesse da utilização de fagos para o controle (Jikia *et al.*, 2005).

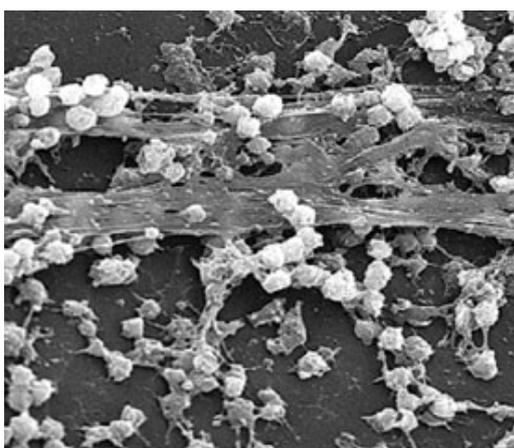


Figura 15: Microscopia eletrônica de biofilme formado por *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Dolan, 2002.

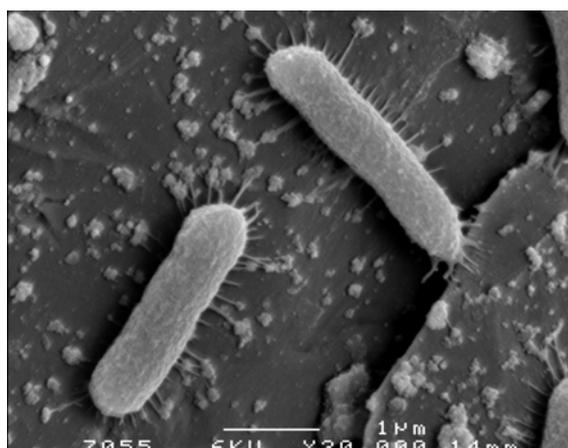


Figura 16: Microscopia eletrônica de *P. fluorescens* e fagos em lâmina de aço inoxidável.

Fonte: Silankorva, 2008.

O tratamento com bacteriófagos segundo Curtin e Donlan (2006) tem sido um método para controlar o biofilme bacteriano, os fagos têm sido utilizados desde o início do século 20 para tratar infecções bacterianas principalmente na Europa oriental. Entretanto estes métodos de controle de biofilme devem ser considerados um complemento para as demais terapias já utilizadas (Merril *et al.*, 2003). O seqüenciamento de DNA em larga escala, a síntese de DNA, e tecnologia de biologia sintética permitirão a fagotipagem e a produção de enzimas heterólogas para a melhoria da terapia com fago por muitos anos (Chan *et al.*, 2005). O FDA em 2006 autorizou a utilização de fagos para o controle de bactérias patogênicas em ambientes industriais.

Existem vários estudos acerca do tema relacionado ao uso da fagoterapia para tratamento de biofilmes. Em 2007 Lu & Collins realizaram um trabalho de dispersão de biofilmes através de engenharia enzimática de bacteriófagos. O desafio do trabalho foi desenvolver bacteriófagos para produzir uma enzima degradadora de biofilmes. A enzima Dspb que é uma enzima produzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* que hidrolisa adesinas necessárias para a formação do biofilme. A fagoterapia para redução de biofilmes requer um coquetel de fagos, uma vez que a população bacteriana do biofilme é variada (Andrianantoandro *et al.*, 2006). No trabalho de Lu & Collins em 2007 foi utilizado um Fago T7 de *Escherichia coli* para codificar a enzima Dspb intracelular durante a infecção nas células do biofilme, de modo que a enzima seria liberada na lise celular para o meio extracelular (Figura 17).

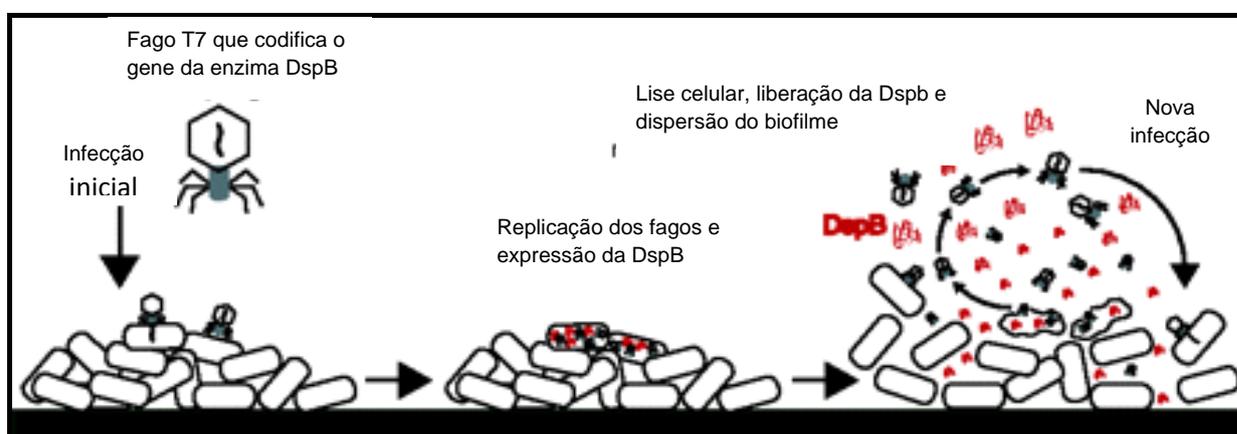


Figura 17: Processo de redução de biofilme utilizando engenharia enzimática de bacteriófagos.

Fonte: Adaptado de Lu e Collins, 2007.

Em 2004, Silankorva em sua dissertação de mestrado estudou o controle de biofilme de *Pseudomonas fluorescense* através da terapia com fago Φ S1. Sabe-se que os estudos de controle e eliminação de biofilme têm demonstrado que a comunidade bacteriana do biofilme tem apresentado resistência aos agentes químicos, além de produzir um impacto ambiental importante. Conforme os resultados deste estudo os bacteriófagos, sob condições ótimas e na presença de hospedeiros crescidos à temperatura e meio de crescimento ótimo, são muito eficientes na remoção de biofilmes em seu estado inicial (células aderidas a superfícies) e biofilmes maduros, tendo-se obtido percentagens de remoção acima dos 80%. Todavia, verificou-se que a infecção fágica é condicionada por diversos fatores, como a temperatura, fase e meio de crescimento do hospedeiro. Estes estudos demonstram que a fase exponencial é o ponto crucial da eficácia da infecção fágica. A figura 19 apresenta o experimento de Silankorva em 2004. O biofilme foi formado em uma placa de vidro e infectado por fagos específicos de *Pseudomonas fluorescense* a uma temperatura de 26°. (ver figura 18 e 19).

Figura 18

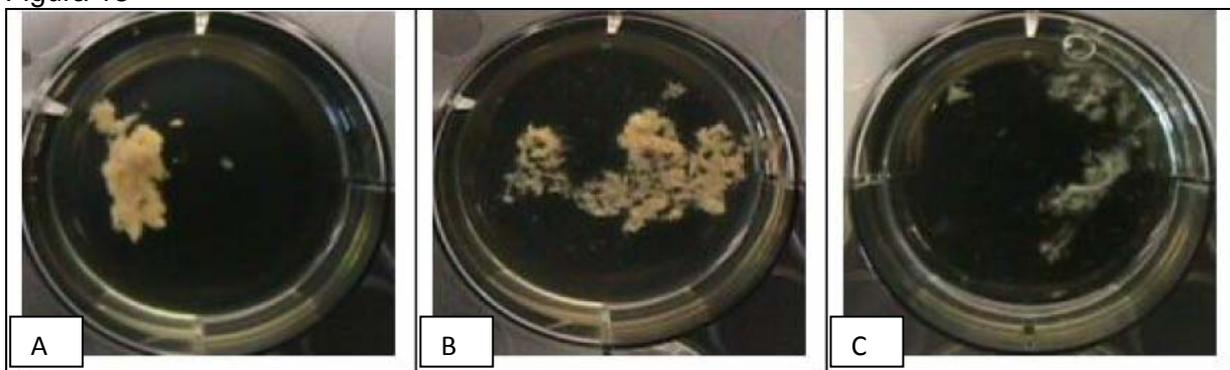


Figura 19

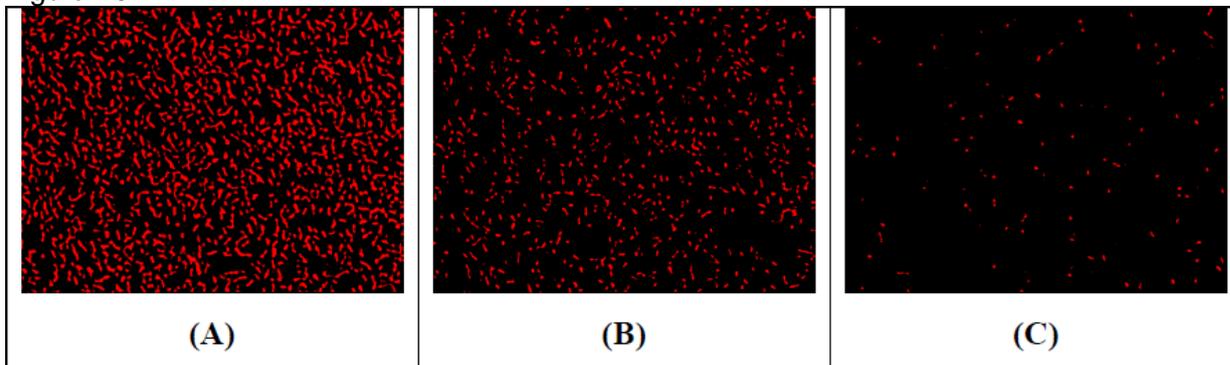


Figura 18 e 19: Infecção fágica de células de *Pseudomonas fluorescens*, aderidas à superfície de vidro, a 26°C. (A- 0 minuto, B – 90 minutos, C – 200 minutos).

Fonte: Adaptado de Silankorva 2004

Os resultados dos estudos de Silankorva e colaboradores em 2008 corroboram com os dados produzidos pelo mesmo autor em 2004. Em 2008 Silankorva e colaboradores realizaram experimentos com a cepa de *Pseudomonas fluorescens* isolada de biofilme formado em teteira de aço inox, em uma indústria de laticínios. Desafiando o biofilme formado com fagos T7 philBB-PF7A, para avaliar os eficácia da fagoterapia em biofilmes de condições estáticas e dinâmicas, e também nos biofilmes novos e velhos. A concentração de fagos aplicada foi 10^7 PFU/ml. Os testes mostraram redução celular máxima dentro de 4 horas para biofilmes formados entre 24 e 72 horas. Entretanto, nos biofilmes velhos (120 e 168 horas), o processo foi mais lento, devido ao fato das células já estarem na fase estacionária atrasando o processo de lise celular e também a replicação viral. Mas em todas as condições testadas ocorreu uma redução de 3-5 unidades logarítmicas da contagem de células viáveis. Os trabalhos demonstraram o potencial do fago T7 philBB-PF7A como agente de controle de biofilmes. No entanto a erradicação completa não foi atingida em nenhum dos estudos.

Curtin & Donlan (2006), investigaram a utilização de fagos para prevenir a formação de biofilmes por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* em cateteres. Neste estudo avaliaram em sistema in vitro se um pré - tratamento de um cateter de hidrogel, com fagos, poderia prevenir ou reduzir a formação de biofilme. Os resultados sugeriram que os fagos podem ser utilizados para reduzir o crescimento de cepas de estafilococos crescidas em biofilmes. A redução do biofilme em cateter revestido com hidrogel foi significativa após 24 horas de infecção. Mas estes estudos não avaliaram a capacidade dos fagos de infectar e lisar células em biofilmes estabelecidos, pois o biofilme de *Staphylococcus epidermidis* ocorre em duas fases. Que correspondem à adesão das células bacterianas à superfície, seguida pelo seu acúmulo e múltiplas camadas de bactérias formando o glicocálice (Gotz, 2002).

Outra aplicação do uso de fagos como agente de controle microbiológico é a utilização de endolisinas (endopeptidase e amidase) para destruição de biofilmes de *Staphylococcus aureus*. Sass & Bierbaum em 2006, clonaram o gene que codifica as endolisinas 11 e 12 que são enzimas hidrolases da parede celular bacteriana. Estas enzimas são modulares e consistem em dois domínios com

funções distintas: um domínio catalítico e um domínio de ligação à parede celular. As endolisinas foram produzidas e testadas *in vitro* em microplacas para avaliar a capacidade lítica. A endolisina 12 não mostrou nenhuma atividade hidrolítica em biofilmes, mas a endolisina 11 foi eficaz na redução do biofilme constituindo-se em uma estratégia promissora para combater o *S.aureus* nas infecções hospitalares mediadas por biofilmes. Este trabalho está de acordo com os estudos de Yoong e colaboradores (2005) que testaram endolisinas de fagos contra cepas resistentes de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. É importante ressaltar que uma característica importante das endolisinas em relação aos antibióticos é seu espectro de ação. As enzimas são específicas para o gênero bacteriano do qual o fago deriva, já os antibióticos apresentam um espectro de ação muito amplo não distinguindo as bactérias comensais das patogênicas (Dancer, 2004).

4. 3 Bacteriófagos como controle microbiológico no meio ambiente.

A qualidade da água é uma preocupação pública mundial, nos países em desenvolvimento, que apresentam o uso inadequado de água potável e suas fontes. A água contaminada por diversos microrganismos patogênicos e insalubre sem saneamento causa aproximadamente 1,7 milhões de mortes por ano no mundo. O aumento populacional, com o crescimento desordenado das cidades tem elevado o índice de poluição de águas assim como o despejo incorreto de esgotos industriais e domésticos, sem se quer passar por um processo básico de tratamento. Estes aspectos contribuem para o aumento de doenças transmissíveis por fontes de águas contaminadas como a cólera, diarreia infecciosa, etc. dificultam o tratamento destas águas (Craun *et al.*, 2005).

Os microrganismos indicadores fecais como os coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* são utilizados para avaliar a potabilidade da água (Poullis *et al.*, 2005). Entretanto muitos pesquisadores acreditam que as bactérias não são indicadores confiáveis e que os vírus são mais resistentes nas águas doce, salgada e nas águas em tratamento (Jofre *et al.*, 1995). Alguns peritos da união Européia recomendaram a pesquisa de bacteriófagos como bioindicadores da qualidade das águas em detrimento da utilização de vírus patogênicos. As técnicas de detecção

de vírus patogênicos são dispendiosas, complexas e demoradas. Para muitas destas espécies virais não é possível aprofundar o diagnóstico de rotina para a identificação de amostras diferentes de uma mesma espécie e, além disto, alguns vírus patogênicos podem apresentar distribuição sazonal o que dificultaria sua identificação ao longo de todas as estações do ano (Espinosa *et al.*, 2009).

Um bom indicador fecal deve ser sempre presente na ausência ou presença do patógeno, as características de crescimento e persistência de ambos devem ser semelhantes, o indicador deve estar presente na fonte de poluição em níveis maiores que o patógeno, deve ser resistente ao ambiente e aos desinfetantes (Colford *et al.*, 2007). O estudo de novas técnicas de tratamentos com o intuito de poupar o uso das fontes naturais e sim tratar o esgoto para sua reutilização, sem causar danos à saúde do homem é o ponto principal a ser alcançado. Os bacteriófagos podem ser bons indicadores de contaminação fecal, devido à sua morfologia, tamanho, estrutura e composição, semelhantes aos vírus entéricos na água, assim como a sobrevivência no ambiente por longos períodos e a tolerância as mudanças das condições ambientais. Entretanto os métodos utilizados para a sua detecção são mais rápidos e baratos. Nesse sentido os colifagos são os bacteriófagos mais utilizados como indicadores da qualidade da água por sua estrita correlação com as bactérias coliformes.

Livina e colaboradores em 2005 avaliaram a presença de bacteriófagos em duas praias na área de Barcelona. Os resultados obtidos demonstraram a presença de colifagos em todas as amostras avaliadas, mesmo na ausência de uma alta contagem bacteriana confirmando a tese de que podem atuar como bons indicadores.

Segundo Bryce *et al* (2005), o *Vibrio cholerae* é uma importante causa de morte em crianças menores de 5 anos a nível mundial, a cólera atinge vários milhões de casos por ano Ásia e na África. Nelson *et al* (2008), estudaram a transmissão de *Vibrio cholerae* antagonizado por fagos líticos em águas, os resultados deste trabalho demonstraram que os fagos exercem um impacto negativo sobre a colonização nas águas e no homem. De acordo Jensen *et al.*, 2006, somente bacteriófagos líticos podem limitar a gravidade dos surtos de cólera, matando as bactérias presentes nos reservatórios e em indivíduos infectados.

Skraber e colaboradores em 2004, no estudo de comparação entre coliformes e colifagos como ferramentas para avaliação da contaminação viral da água do rio de Mosela (Alemanha), foram utilizados três indicadores bacterianos de poluição fecal (coliformes termotolerantes, enterococos e esporos de anaeróbio sulfito redutores) com três bacteriófagos (colifagos somáticos que são um grupo heterogêneo de vírus com morfologia variada e boa resistência ambiental, bacteriófagos específicos que se constituem em um grupo não homogêneo do ponto de vista morfológico com hospedeiros específicos e fagos de *B. fragilis*). O objetivo do estudo foi definir quais indicadores seriam os mais adequados para avaliar a contaminação viral da água. Os resultados alcançados mostraram que coliformes termotolerantes e colifagos somáticos representaram a maioria, indicando a poluição fecal. Os coliformes termotolerantes foram mais sensíveis a variações de temperatura do que os fagos. Ainda neste estudo os vírus patogênicos, *Enterovirus* e *Norovirus* foram avaliados nas 90 amostras de água, no qual 38% foram positivas para *Enterovirus* e 27% para *Norovirus*. As amostras de água positivas para *Enterovirus* e *Norovirus*, foram testadas quanto à presença de colifagos. Os resultados mostraram que o número de amostras de vírus reduziu com a diminuição de colifagos. Os autores afirmam que pode existir uma relação entre as concentrações de indicadores e contaminação viral, mas esta relação deve ser estudada através de biologia molecular. No entanto os resultados deste trabalho concluem que os bacteriófagos não são somente indicadores de contaminação bacteriana, mas também de vírus entéricos patogênicos.

Em 2007, Love & Sobsey desenvolveram um método simples e rápido de detecção de indicadores de contaminação fecal, quando comparado com os métodos atualmente utilizados de cultura bacteriana e de recuperação de fagos. O método baseava-se na cultura de amostras ambientais para aumentar a recuperação do fago, seguido pelo teste de detecção do fago por aglutinação em látex visto que as amostras ambientais ao contrário das humanas apresentam baixos títulos de fagos. Foi utilizado o colifago lítico que infecta bactérias do grupo coliforme e anticorpos policlonais contra fagos de DNA e RNA (ver figura 20). O teste foi eficaz na detecção da presença de fagos em amostras ambientais, e a presença ou ausência de aglutinação foi interpretada como positiva e negativa respectivamente. Segundo

os autores, este ensaio para detecção de fagos fornece informações úteis sobre sua ecologia, propriedades e riscos a saúde pública. Este método pode ser usado para prevenção de surtos e disseminação de doenças, devido à agilidade nos resultados.

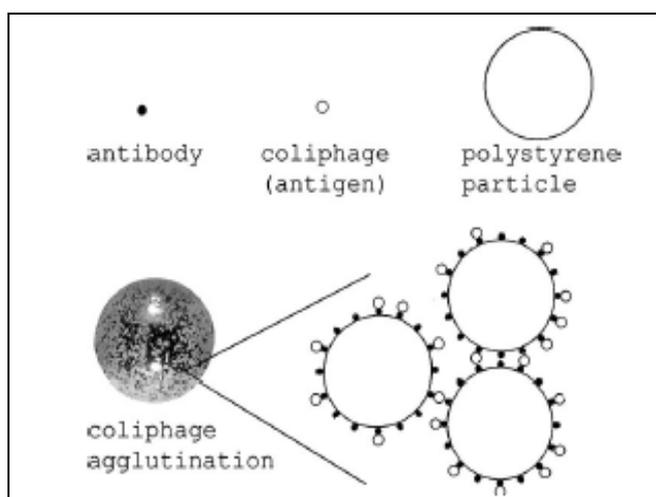


Figura 20: Diagrama de aglutinação utilizando colifagos em volumes iguais de enriquecimentos e anticorpo marcado.

Fonte: Love & Sobsey., 2007

Em 2004, Reis realizou um estudo de controle biológico bacteriano e tratamento de afluentes utilizando fagos líticos que podem ser aplicados nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). O trabalho apresenta um estudo com bacteriófagos mutantes líticos, na redução de unidades formadoras de colônias de bactérias potencialmente patogênicas. Reis utilizou neste trabalho fagos mutantes capazes de realizarem apenas o ciclo lítico, capazes de infectar *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que o uso de fagos lítico mutantes reduziu potencialmente o número de células viáveis de *S. aureus*, comprovando que podem ser utilizados nas ETEs para diminuir a carga bacteriana contaminante (figura 21).

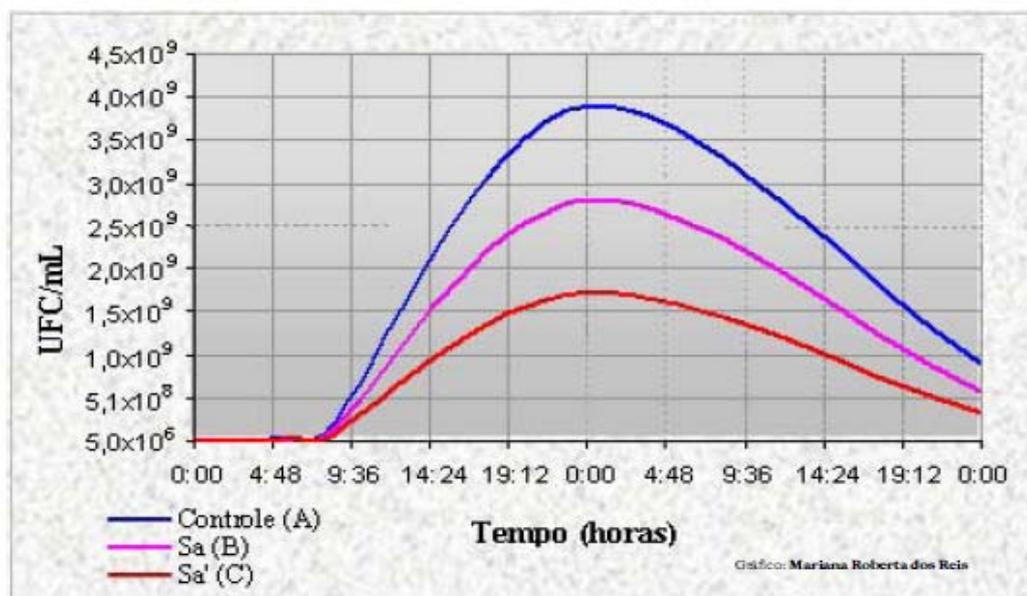


Figura 21: Curva de avaliação de morte celular bacteriana de *S.aureus*. (A) Curva contendo apenas *S.aureus*, (B) Curva contendo *S.aureus* e fago não mutante. (C) curva contendo fago mutante lítico e *S.aureus*.

Fonte: Reis, 2004

4.4 Aplicações de bacteriófagos na antibioticoterapia

Segundo Coates *et al* (2002), um grande problema de saúde pública, é o crescente desenvolvimento de resistência bacteriana aos tradicionais antibióticos, que tem atingido níveis preocupantes. Como exemplo temos o *Streptococcus pneumoniae* que foi altamente sensível a penicilina e hoje 25% das cepas são resistentes. Cerca de 70% das infecções hospitalares bacterianas no EUA são resistentes a um ou mais antibióticos e 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* isolados no Japão são multiresistentes. Atualmente resoluções em curto prazo consistem na modificação química das drogas utilizadas, para melhorar a potência e o espectro de ação. O impacto econômico das infecções resistentes aos antibióticos é de aproximadamente 24 bilhões de dólares por ano nos EUA (Hall, 2004).

Benjamin *et al* em 2008, realizaram um trabalho abordando a fagoterapia e a janela de seleção de mutantes, que ocorre no intervalo entre a primeira e segunda dose da antibioticoterapia. O objetivo do trabalho era inibir a resistência bacteriana adquirida entre a primeira e segunda dose, para que futuramente alguns problemas de resistência aos antibióticos fossem amenizados. Uma maneira de fazer isto é

utilizar terapias de combinação, como coquetel de bacteriófagos líticos (Leverentz *et al.*, 2003, McVay *et al.*, 2007). Segundo os autores, um aspecto inovador seria a utilização de baixas doses de fagos, confiando no aumento de partículas virais (replicação) durante a terapia de bacteriófagos. Mas isto dependeria da sensibilidade das bactérias aos vírus, visto que no caso de uso de drogas, as altas concentrações seriam necessárias para inibir o crescimento das cepas resistentes.

Yacoby e colaboradores em 2006 e 2007 estudaram uma nova aplicação de bacteriófagos filamentosos (M13) como uma plataforma para carreamento de drogas, para a bactéria alvo que poderia inibir parcialmente a multiplicação de bactérias como o *Staphylococcus aureus*. O objetivo dos pesquisadores foi elaborar uma conjugação química baseada na ligação de drogas hidrofóbicas como o cloranfenicol, que apresenta características como a facilidade de conjugação ao fago através de antibióticos aminoglicosídeos. Foi testada a capacidade da droga alvo transportada por nanopartículas de fago em inibir o crescimento de bactérias patogênicas mais comuns, como o *S. aureus* resistente a metilina, o *Streptococcus pyogenes* e a *Escherichia.coli*. No trabalho de 2006 Yacob e colaboradores concluíram que a conjugação de apenas cloranfenicol e fago não foi muito eficaz, pois o cloranfenicol devido a sua característica hidrofóbica, provocou a precipitação dos bacteriófagos e com isso somente retardou o crescimento da bactéria. Já no trabalho de 2007 um novo modelo de conjugação química foi proposto, adicionando um aminoglicosídeo (Neomicina) à plataforma causando a solvatação de materiais hidrofóbicos, obtendo assim resultados mais satisfatórios, ou seja, a inibição do crescimento bacteriano. Neste trabalho os autores afirmam que a genômica de bactérias e fagos apresentam uma nova alternativa para a melhoria da antibioticoterapia.

A figura 22a ilustra o desenho reacional do experimento realizado por Yacoby *et al* em 2006. Em (1) está representado a preparação da pró-droga (Cloranfenicol), (2) Conjugação da pró-droga e fago, em (3) os fagos transportam a droga para o interior das células alvo e (4) a liberação da droga potencializando o efeito através da internalização do antibiótico . A figura 22b apresenta a adição de neomicina ao fago M13, para potencializar a ação do cloranfenicol (Yacoby *et al.*, 2007).

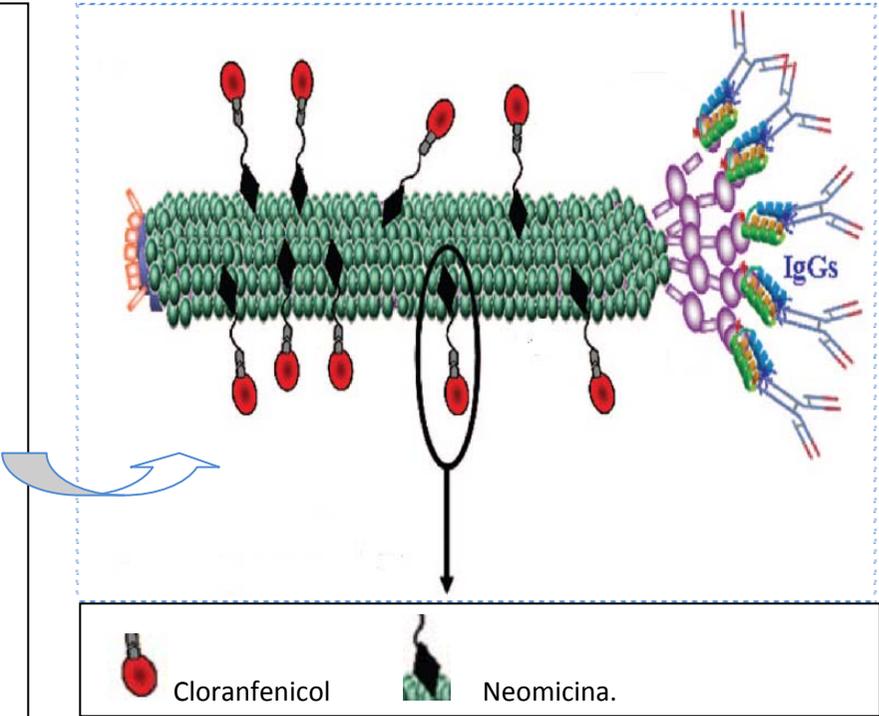
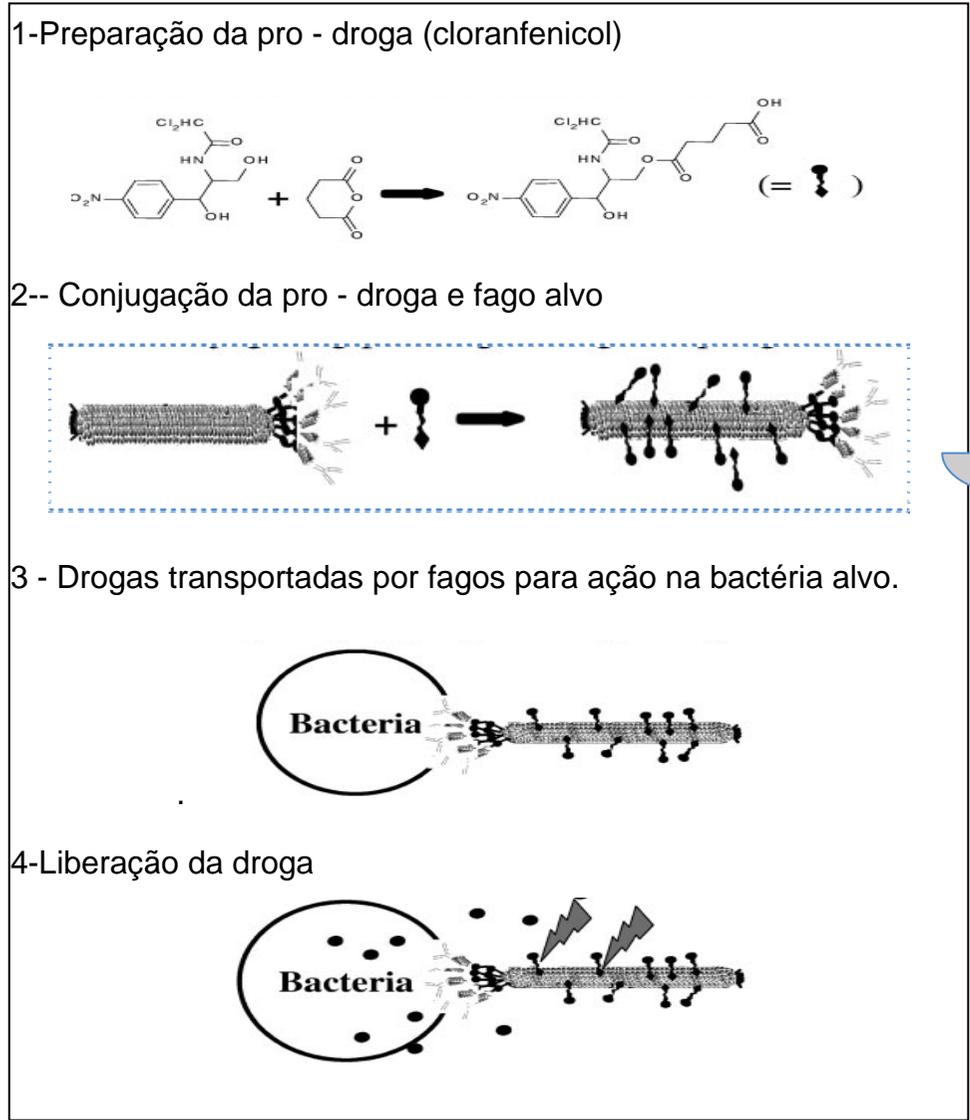


Figura 22 b: Fago filamentoso M13 e conjugação da pró droga cloranfenicol e neomicina
 Fonte: Yacoby *et al* em 2007

Figura 22a: Conjugação química e liberação da droga.
 Fonte: Yacoby *et al* em 2006

Em 2009 Lu & Collins projetaram um bacteriófago para codificar proteínas alvo com a finalidade de melhorar a morte bacteriana por antibióticos. Pois as bactérias apresentam um sistema de reparo de DNA denominado de resposta SOS, que faz reparos no DNA cujo antibiótico danificou, tornando a bactéria resistente à droga. Neste trabalho os genes a serem expressos codificam a proteína LexA3 que não sofre diretamente a ação dos antibióticos. A proteína LexA3 impede a atividade da resposta SOS, potencializando a ação da droga provocando a morte bacteriana. O fago utilizado foi o M13 projetado para expressar o gene *LexA3*, um repressor da resposta SOS. Na figura 23 está representado o mecanismo de inibição da resposta SOS. Em (1) está representado o bacteriófago M13 que expressa o gene da proteína LexA3, em (2)- o gene codifica a proteína LexA3, a proteína interfere no sistema SOS (3), que inibe o reparo do DNA (4). As partículas do antibiótico agem no DNA bacteriano (5), e consegue manter sua atividade provocando a morte celular (6), pois o sistema de reparo foi inibido.

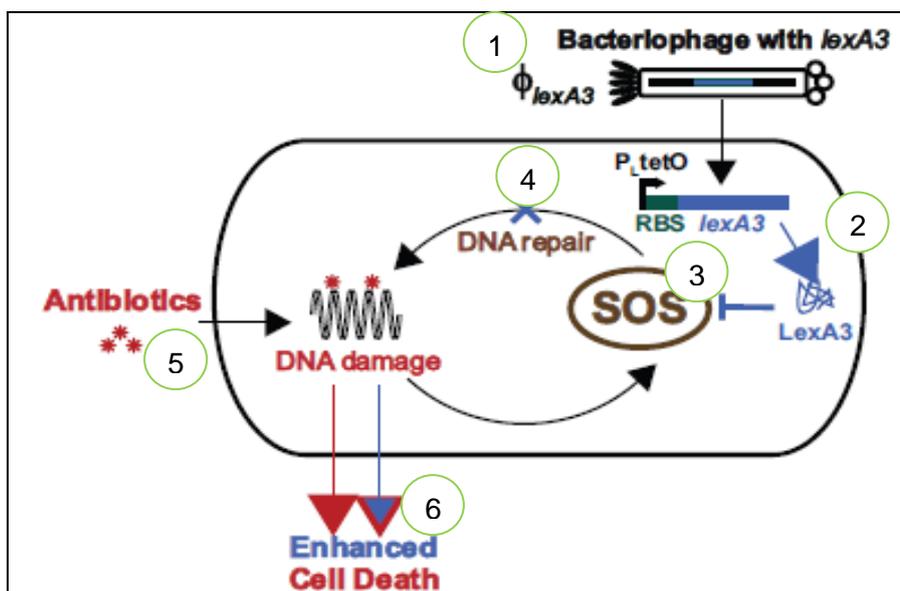


Figura 23: Desenho reacional do processo de inibição da resposta SOS pelo fago M13

Fonte: Lua & Collins (2009)

Segundo os autores a combinação de fagoterapia funciona como um adjuvante que facilita a ação da droga no DNA da célula hospedeira.

Outra preocupação da Organização Mundial de saúde é a multiresistência de bactérias às drogas para tratamento de tuberculose, dentre elas a rifampicina e

isoniazida. Métodos fenotípicos são utilizados para detectar resistência às drogas, mas são demorados. Técnica de biologia molecular tem sido empregadas para avaliar mutações que induzem a resistência a rifampicina, mas estes testes não foram implementados em ambientes de recursos limitados (MCNerney *et al.*, 2000). No entanto há a necessidade de métodos mais simples, baratos e rápidos para investigar a suscetibilidade *M.tuberculosis* à rifampicina. Traore *et al* (2007) desenvolveram um método simples a ser aplicado nos países em desenvolvimento. Os autores utilizaram um micobacteriófago, no qual o sucesso da replicação do fago indicaria a presença de micobactérias viáveis e resistentes. A rifampicina interrompe a replicação do fago impedindo a síntese de RNAm bacteriano, demonstrando que as bactérias são sensíveis às drogas. Os autores compararam a eficácia do ensaio com fagos com o BACTEC 460, método atualmente utilizado para detecção de cepas de *M.tuberculosis* e a resistência a rifampicina. Das 149 amostras testadas na concentração de 2mcg/ ml de rifmapiquina, 91 foram susceptíveis e 58 resistentes no ensaio com fagos. No Bactec 460, 35 amostras foram resistentes. Mas com o aumento da concentração da droga para 4 e 10 mcg/ml o número de resistentes foi de 39 no ensaio com o fago comparado com 35 resistentes no Bactec 460 (Tabela 3) .

Tabela 3: Suscetibilidade de isolados no teste BACTEC 460 e no Fago ensaio

Assay	Drug concentration µg/ml	Susceptible Isolates	Resistant isolates
BACTEC 460	2	114	35*
Phage	2	91	58
Phage	4	110	39
Phage	10	110	39

Tabela 3: Suscetibilidade dos isolados no teste Bactec 460 e no fago ensaio.*Os 35 isolados resistente no BACTEC 460, também foram resistentes pelo fago ensaio em todas as concentrações.

Fonte: Adaptado de Traore *et al.*, 2007

A incapacidade do Bactec 460 em detectar quatro isolados resistentes a rifmapiquina é preocupante, pois o teste constitui no padrão ouro utilizado. Os autores concluem que o Bactec 460 pode apresentar resultados falsos negativos e que a utilização de

fagos para detectar cepas resistentes pode ser mais eficaz, pois apresentou maior sensibilidade e especificidade.

5 Mecanismos de resistência x fagos

Apesar dos potenciais benefícios descritos, alguns aspectos na terapia fágica devem ser analisados cautelosamente. Dentre eles ressalta-se a imunogenicidade do fago, eficácia e identificação da célula hospedeira, especificidade de hospedeiro, liberação de toxinas e concentração de partículas virais (Hagens *et al.*, 2004, Merrill *et al.*, 2003).

Uma das limitações da terapia é o risco de se encontrar bactérias resistentes aos fagos, sendo um fenótipo de sobrevivência crucial para uma variedade de nichos ecológicos. As bactérias utilizam diversos mecanismos para a prevenção da infecção mediada por bacteriófagos (Okafor, 2007).

As enzimas de restrição é o mecanismo mais antigo que as bactérias utilizam para resistir à infecção pelos fagos. Quando o DNA do fago entra na célula este é reconhecido pelas enzimas de restrição que rapidamente degrada o DNA. Os fagos têm desenvolvido estratégias para evitar a clivagem do DNA pelas enzimas de restrição, quando o DNA do fago é metilado este fica protegido contra as enzimas, outra forma é a falta de reconhecimento da endonuclease devido a mutações pontuais no genoma (Pingoud *et al.*, 2005).

As bactérias desenvolvem várias barreiras para impedir a adsorção do fago. Estas barreiras se caracterizam por bloqueadores dos receptores dos fagos, produção de matriz extracelular e produção de inibidores competitivos (Labrie *et al.*, 2010). Na figura 24 estão exemplificados de forma esquemática os mecanismos de resistência das bactérias e o contra ataque dos fagos para driblar cada mecanismo.

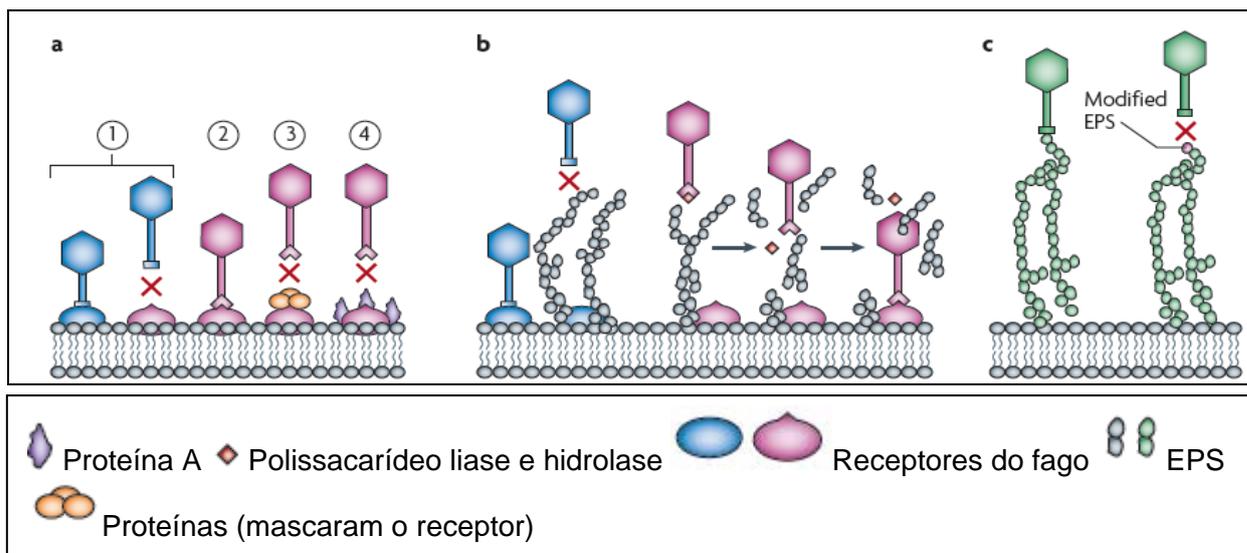


Figura 24: Forma esquemática dos mecanismos de resistência bacteriana. A – 1 e 2) modificação de receptores da superfície celular e adaptação do fago e reconhecimento do receptor. 3) Produção de proteínas que mascaram o receptor do fago. 4) Produção de proteína A. B) Produção de EPS (polissacarídeos extracelulares) e bloqueio dos fagos, produção de polissacarídeo liase e hidrolase e ligação no receptor da célula. C) os fagos podem reconhecer antígeno K modificado.

Fonte: Labrie *et al.*, 2010

Outro mecanismo utilizado pelas bactérias é a prevenção da injeção do DNA do fago no interior da célula bacteriana, através da produção de proteínas que bloqueiam a entrada do DNA, conferindo imunidade contra fagos específicos. Um exemplo são as bactérias gram negativas infectadas pelo colifago T4. A proteína Imm impede a transferência do DNA do fago para o citoplasma bacteriano alterando a conformação do local da injeção, mas sozinha não confere imunidade completa, por isso é associada à proteína de membrana SP que inibe a atividade da lisozima de T4, que impede a degradação do peptidoglicano e posterior injeção do DNA do fago (Figura 25) (Labrie *et al.*, 2010).

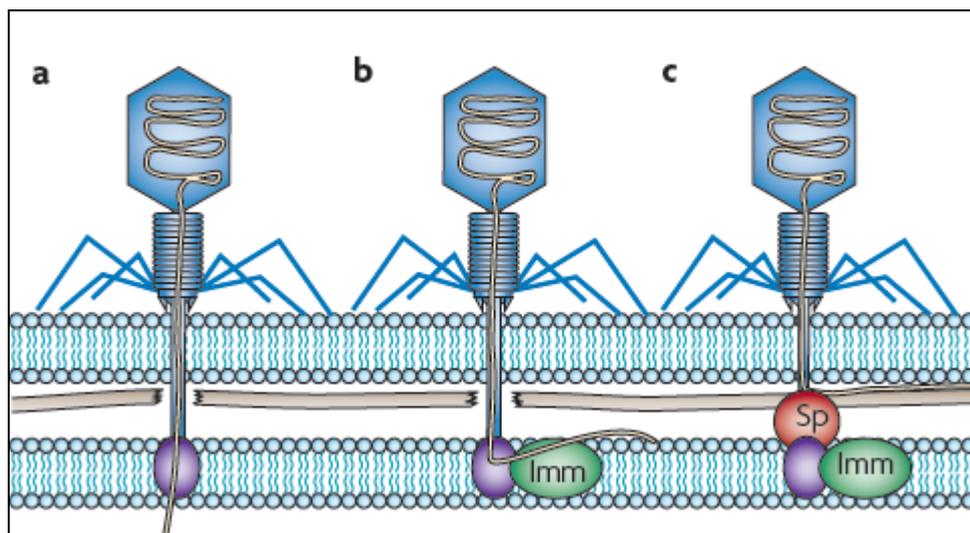


Figura 25: Forma esquemática de prevenção da injeção do DNA do fago. A) Infecção normal de fago T4. B) Produção da Proteína Imm que bloqueia a translocação de DNA para o citoplasma. C) Proteína Sp inibe degradação dos blocos de peptidoglicano deixando o DNA entre a camada de peptidoglicano e a membrana externa.
 Fonte: Labrie *et al.*, 2010

Zegans *et al.* (2009) avaliaram outro mecanismo de resistência e estudaram a interação de fagos DMS3 (lisogênicos) com hospedeiros que apresentam seqüências de DNA (CRISPR). As seqüências de DNA CRISPR são capazes de bloquear plasmídeos e DNA do Vírus impedindo sua multiplicação. Mas Mutações nestas regiões do genoma podem resultar na perda de resistência aos fagos. Outros mecanismos, como a degradação de ácidos nucléicos, e infecção abortiva são mediados pelas bactérias alvos como estratégias de sobrevivência. Muitas barreiras de resistência aos fagos podem ser descobertas assim como muitos mecanismos deste vírus para a continuidade de sua replicação (Labrie *et al.*, 2010).

6 Conclusão

Os fagos atualmente são reconhecidos como grandes ferramentas biológicas em várias áreas. A pesquisa com fagos vem passando por um renascimento, principalmente devido às perspectivas da fagoterapia. Neste estudo foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a estrutura, diversidade e as diversas aplicações da fagoterapia com foco no controle de alimentos, biofilme, meio ambiente e antibioticoterapia. Os estudos avaliados aqui revelaram a eficácia desta abordagem na redução de microrganismos patogênicos em alimentos, e também na redução de biofilmes, utilizando não só fagos líticos para realizar infecção da célula hospedeira, como as endolisinas produzidas pelos fagos. Como controle microbiológico do ambiente os artigos apresentaram várias aplicações, como a melhoria de indicadores de contaminação fecal, que de acordo com os resultados os fagos apresentaram melhor eficácia para avaliação de contaminação bacteriana e viral em água. Outra abordagem foi a melhoria das técnicas empregadas para identificação de potabilidade da água, o método de aglutinação em látex foi desenvolvido apresentando vantagens sobre os métodos atualmente utilizados. Os fagos também foram avaliados como ferramentas para melhorar a ação de drogas antimicrobianas, através de terapia combinada e expressão de enzimas específicas para aumentar a atividade do fármaco. De uma maneira geral os fagos são ferramentas promissoras, mas muitos estudos devem ser realizados, pois necessitam de condições adequadas para manutenção de sua replicação na célula alvo. Os mecanismos de resistência bacterianos ainda é o ponto crucial para o insucesso da fagoterapia, assim como o estudo dos mecanismos dos fagos para resistir às células hospedeiras. Outros aspectos que devem ser considerados são a transferência de genes de resistência a antibióticos para outras linhagens de hospedeiros, assim como a indução de fatores de virulência como a verotoxina em *Escherichia coli*, influência na imunidade inata quando aplicada a terapia humana e problemas ambientais como o desequilíbrio ecológico bacteriano quando utilizados no meio ambiente.

Referências Bibliográficas

Abuladze T., et al. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 74(20): 6230–6238, 2008

Ackermann, H. W. Tailed bacteriophages: The order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.* 51, 135-20, 1999.

Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R *Mol Syst Biol.* 2006

Ackers, M. L., et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis*, 177:1588–1593, 1998.

Atterbury R. J., M. A. P. Van Bergen, F. Ortiz, M. A. et al. Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.*, 73(14): 4543–4549, 2007.

Behrsing, J., S. Winkler, P. Franz, and R. Premier. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. *Postharvest Biol. Technol*, 19:187–192, 2000.

Benjamin J, Cairns and Robert J. H, Payne. Bacteriophage Therapy and the Mutant Selection Window. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 4344–4350, 2008.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO. Estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365: 1147–1152, 2005

BIRGE, E. A. Bacterial and Bacteriophage Genetics. 1994.

Boyer M., Haurat J, Samain S., et al. Bacteriophage Prevalence in the Genus *Azospirillum* and Analysis of the First Genome Sequence of an *Azospirillum brasilense* Integrative Phage. *Applied and Environmental Microbiology*, No. 3, p. 861–874, 2008.

Campbell, A. M.. Bacteriophages History In: Kinipe, David M.; Howley, Peter M. *Filds Virology*, 5 th edition. V1, (23), p. 771-772, 2007.

Carlton, R. M, W. H. Noordman, B. Biswas, E. D. de Meester, and M. J. Loessner.. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43:301–312, 2005.

Chibani-Chennoufi et al. Isolation of *Escherichia coli* Bacteriophages from the Stool of Pediatric Diarrhea Patients in Bangladesh. *Journal of Bacteriology*, p. 8287–8294, 2004

Coates, A., Y. Hu, R. Bax, and C. Page.. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1:895–910, 2002,

Colford, J. M., Jr., T. J. Wade, K. C. Schiff, C. C. Wright, J. G. Griffith, S. K. Sandhu, S. Burns, J. Hayes, M. Sobsey, G. Lovelace, and S. B. Weisberg. Water quality indicators and the risk of illness in non-point source impacted recreational waters. *Epidemiology* 18:27–35, 2007.

Chan LY, Kosuri S, Endy D *Mol Syst Biol.* 2005.

Curtin JJ, Donlan RM. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1268-1275, 2006.

Craun, G. F., R. L. Calderon, and M. F. Craun.. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int. J. Environ. Health Res.* 15:243–262, 2005.

Dupont Claire, Augustin Jean-Christophe. Influence of Stress on Single-Cell Lag Time and Growth Probability for *Listeria monocytogenes* in Half Fraser Broth_ *Applied and Environmental Microbiology*, No. 10, Vol. 75, p. 3069–3076, 2009.

Dancer, S. J. How antibiotics can make us sick:the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis.* 4: 611-619, 2004.

Deresinski Stan. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clinical Infectious Diseases*; 48: 1096-1101, 2009.

Demuth,J., Neve, H. and Witzel, K.p. Direct electron evidence studyofbacteriophage populations in lakePlubsee. *Appl Environ.Microbiol.* 59, 3378-3384, 1998.

Dogan B, Boor KJ: Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:130-138, 2003.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2002 Sep [date cited];8. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/02-0063.htm>.

Dworkin J, Blaser MJ Nested DNA inversion as a paradigm of programmed gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 985–990, 1997.

El- Shibiny et al. Enumeration and Diversity of campylobacter and Bacteriophages isolated during Rearing Cycles of Free – Range and Organic Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1259-1266, 2005.

Espinosa A.C., et al Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude System. *Environmental Health*, 8:49, 2009.

Foog, P.C. et al. Bacteriophage Lambda: a Paradigm Revisited. *Journal of Virology*, p.6876 – 6879, 2010.

Garvey, P., Hill, C. & Fitzgerald, G. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol*, **62**, 676–679, 1996.

Gotz, F.. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiology*, **43**:1367–1378, 2002.

Guenther, S. et al. Virulente Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready- To-Eat- Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p.093-100, 2009.

Hagens S, Habel AvAU, von Gabain A, Blasi U .Therapy of experimental pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10):3817–3822, 2004.

Hall B. G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5):430–435, 2004.

Hanlon, G. W. Bacteriophage: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128, 2007.

Hemminga, M. A. et al. Viruses:incredible namomachines. New advances with filamenous phages. *Eur Biophys J*, 39: 541-550, 2010.

Hynes, W. L., Hancock, L. & Ferretti, J. J. Analysis of a 2nd bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a 3rd hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect. Immun.*, N.63, 3015–3020., 1995.

Jensen M. A, et al. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Applied Biological Sciences PNAS.*, vol. 103, no. 12, 4653, 2006.

Jikia, D., N. Chkhaidze, E. Imedashvili, I. et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr 90. *Clin. Exp. Dermatology*, 30:23–26, 2005.

Jofre, J., E. Olle, F. Ribas, A. Vidal, and F. Lucena. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiology*, 61:3227–3231, 1995.

Kim, J.W et al. Host Ranges of *Listeria monocytogenes* specific Bacteriophages from the Turkey Processing Plant Environment in the United states. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6623-6630. 2008.

Labrie Simon J., E. S. Julie, Moineau Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews Microbiology*. V8, 2010

Leverentz, B., W. S. Conway, M. J. Camp, W. J. Janisiewicz, T. Abuladze, M. Yang, R. Saftner, and A. Sulakvelidze. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiology*, 69:4519–4526, 2003.

Llivina L. M, Lucena F., and Jofre J. Enteroviruses and Bacteriophages in Bathing Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, p. 6838–6844, 2005.

Liemann S, Chandran K, Baker TS, Nibert ML, Harrison SC. Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma 3. 2002.

Love, D. C.; Sobsey, M. D. Simple and Rapid F₂ Coliphage Culture, Látex Agglutination, and Typing Assay To Detect and Source Track Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, No. 13 Vol. 73, p. 4110–4118, 2007.

Lu T. K., Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Applied Biological Sciences PNAS*, vol. 104 no. 27 11197–11202, 2007.

Lu, T. K., Collins J.J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Applied Biological Sciences PNAS*. vol.106, p. 4629–4634, 2009.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; and Clark, D. P. (2010). *Microbiologia de Brock*, 12a edição. Artmed Editora S/A. Porto Alegre, RS.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; and Clark, D. P. (2008). *Microbiologia de Brock*, 10a edição. Artmed Editora S/A. Porto Alegre, RS.

Merril CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discover*, 2(6):489–497, 2003.

McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG: Rapid screening of Mycobacterium tuberculosis for susceptibility to rifampicin and streptomycin. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 4(1):69-75, 2000.

McVay, C. S., M. Vela'squez, and J. A. Fralick. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob. Agents Chemother*, 51:1934–1938, 2007.

Nelson EJ, Chowdhury A, Flynn J, Schild S, Bourassa L, et al. Transmission of *Vibrio cholerae* Is Antagonized by Lytic Phage and Entry into the Aquatic Environment. *PLoS Pathog*, 2008.

Newell, D. G., and C. Fearnley. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiology*, 69:4343–4351, 2003.

Nechaev S and Severinov K. The Elusive Object of Desire - Interactions of Bacteriophages and Their Hosts. *Curr Opin Microbiol*. Author manuscript; available in PMC 2009.

- Okafor, N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology* (Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 2007).
- Paisano, A.F. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de bacteriófagos em canais Radiculares infectados por isolados clínicos de *Enterococcus faecalis*. 2008. Tese de Doutorado (Endodontia), Universidade de São Paulo/SP
- Pato, M. L.; Oram M. MU- Like Strong Gyrase Site seqüencies: Analysis of Properties Required for Promoting Efficient UM DNA Replication. *Journal of Bacteriology*, p. 4575-4584, 2004.
- Pal C, Macia M, Oliver A, Schachar I, Buckling A. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450:1079–81. 2007.
- Petrov et al. Genomes of the T4-related bacteriophages as windons on microbial genome evolutoin. *Virology Journal*, 7:292, 2010.
- Pingoud, A., Fuxeiter, M., V& Wend, W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell .Mol. Life Sci.* 62, 685-707, 2005.
- Poullis, D. A., R. W. Attwell, and S. C. Powell. The characterization of waterborne-disease outbreaks. *Rev. Environ. Health*, N.20 p.141–149, 2005.
- Proença, D. S. M. Estudo da atividade de lisinas codificadas por bacteriófagos que infectam *Enterococcus sp.* 2009 Dissertação de Mestrado (Genética Molecular e Biomedicina). Universidade de Lisboa.
- Reis, M.R. Conrole biológico bacteriano e tratamento de efluentes através do uso de bacteriófagos. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Ed 33^o Universidade Estadual de campinas. 2004.
- Sass P, and Bierbaum G. Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage 11 and 12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Applied Environmental Microbiology*. No. 1, p. 347–352 Vol. 73, 2007.
- Skraber, B. Gassilloud, and C. Gantzer. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. *Applied and Environmental Microbiology*, No. 6, Vol. 70, p. 3644–3649, 2004.
- Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Loc Carrillo C, Adzfa Radzum K, et al. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Pathog.* 2007.
- Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Sutherland I, Azeredo J: *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage phiS1: the influence of temperature, host growth phase and media. *Fems Microbiology Letters.*, **241**:13-20, 2004.
- Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Azeredo J: Real-time quantification of *Pseudomonas fluorescens* cell removal from glass surfaces due to bacteriophage phiS1 application. *Journal of Applied Microbiology.* 2008.

Shin, G.A., and M. D. Sobsey. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003.

Summers, William C. Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology, Yale University. (1999).

Stummeyer, K. *et al.* Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol. Microbiology*, 60, 1123–1135, 2006.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr JG. Bacteriophages therapy. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 45 (3): 649-59, 2001.

Suttle, C.A. Viruses in the sea. *Nature* 437, 356 e 361. (2005).

Straus S, Scott W, Symmons M, Marvin D. On the structures of filamentous bacteriophage Ff (Fd, F1, M13). *Eur Biophys J*, 37: 521-527, 2008.

Tiemann, B., Depping, R., Gineikiene, E., Kaliniene, L., Nivinskas, R., Ruger, W. (2004). ModA and ModB, Two ADP-Ribosyltransferases Encoded by Bacteriophage T4: Catalytic Properties and Mutation Analysis. *J. Bacteriol.* 186: 7262-7272.

Traore H, Ogwang S, et al. Rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.*, 2007.

Vicente, C. et al. Food Reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infections Diseases*. www.CDC.gov/eid.v.16.2010.

Zegans, M. E. Jeffrey C. Wagner, Kyle C. Cady, Daniel M. Murphy. Interaction between Bacteriophage DMS3 and Host CRISPR Region Inhibits Group Behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, No. 1, Vol. 191, p. 210–219, 2009.

Yacoby, I., H. Bar, and I. Benhar.. Targeted drug bacteriophages. as antibacterial Nanomedicines. *Antimicrob Agents Chemother*, p.2156-2163, 2007.

Yacoby, I., M. Shamis, H. Bar, D. Shabat, and I. Benhar. Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2087–2097, 2006.

Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D. e Fischetti, V. A. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal Bacteriology*. 2005.

Young, R. Phages Lysis. *In Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology* (Waldor, M. K., Friedman, D. I. e Adhya, S. L. Eds). American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1^a ed., p 92-127, 2005.

WHO. Terrorist threats to food: guidance for establishing and strengthening prevention and response systems. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2002.

Weinbauer M. G. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews, 2003.

<http://www.alimentos.bio.br/efeito-dos-bacteriofagos-alimentos>. Weekly Acesso em 22 de janeiro de 2011.

<http://www.icvtonline.org/virustaxonomy.asp?version=2009>. Acesso em 24 de janeiro de 2011.

<http://www.umc.es/info/genetica/grupo/Cromovibac.htm> . Acesso em 24 de janeiro de 2011.

.