



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE FARMÁCIA

Bruno Secchi Alves

**Uso de Bacteriófagos no Controle da Disbiose em Doenças do Trato  
Gastrointestinal**

Florianópolis  
2023

Bruno Secchi Alves

**Uso de Bacteriófagos no Controle da Disbiose em Doenças do Trato  
Gastrointestinal**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II e obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Garcia Mendes Borba.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alves, Bruno Secchi

Uso de bacteriófagos no controle da disbiose em doenças  
do trato gastrointestinal / Bruno Secchi Alves ;  
orientadora, Beatriz Garcia Mendes, 2023.

60 p.

2. Bacteriófagos. 3. Disbiose intestinal. 4. Fagoterapia.  
5. Doenças intestinais e hepáticas. I. Mendes, Beatriz  
Garcia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. . III.  
Título.

Bruno Secchi Alves

**Uso de Bacteriófagos no Controle da Disbiose em Doenças do Trato  
Gastrointestinal**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de “Bacharel em Farmácia” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 29 de junho de 2023.



Profª Liliete Canes Souza Cordeiro, Drª  
Coordenadora do Curso de Farmácia

**Banca examinadora**



Profª. Beatriz Garcia Mendes Borba, Drª.  
Orientadora



Profª Iara Fabrícia Kretzer, Drª.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Profº Ricardo Ruiz Mazzon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, especialmente à minha mãe e meus avós, Maira, Ary e Maria pelo amor e carinho a mim concedidos, por me prover todo suporte necessário para obtenção de uma educação de qualidade, por me apoiarem e ampararem em todas as decisões necessárias para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha amada namorada, Carolina Peixe, por todo amor e afeto, mantendo-se sempre ao meu lado e me apoiando em cada decisão, me fazendo acreditar mais no meu potencial e, desempenhando um papel fundamental durante minha trajetória acadêmica.

Aos meus queridos amigos do Laranjinha, principalmente Geremias, Thomáz, Nicácio e Matheus Rocha, por estarem sempre presentes me distraíndo como boas risadas e companheirismo, por me permitirem viver uma vida mais leve, regada de divertimento e descontração.

Aos amigos que a UFSC me proporcionou, Cassiano, Tayná, Flora, Caio, Cauê, Gui e Isadora, amizades essenciais para minha formação, pessoas que tanto admiro e carrego no peito.

Aos meus grandes amigos que carrego ao longo de toda minha trajetória, Guilherme, Thiago e João, que me mostraram o que realmente é a amizade, me proporcionando diversos momentos de felicidade.

À minha orientadora Profa Dra Beatriz Garcia Mendes Borba, por todo tempo a mim atribuído e dedicado às diversas sugestões e correções, se fazendo sempre presente e me auxiliando ao longo dessa jornada.

À banca avaliadora, Profa Dra Iara Fabrícia Kretzer, Prof Dr Ricardo Ruiz Mazzon e Me. Izadora Borgmann Frizzo, pela excelência em suas áreas de docência, por suas contribuições para minha formação acadêmica e, pelo tempo despendido e aporte na realização do referente trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, por sua excelência em ensino público de qualidade, pelo alto padrão de corpo docente e oportunidade de proporcionar à população, o melhor que a educação tem a oferecer.

## RESUMO

O organismo humano abriga uma quantidade grandiosa de microrganismos simbióticos em seu trato gastrointestinal. Contudo, alterações na homeostase microbiótica acabam por permitir o crescimento anormal de microrganismos patogênicos associados a diversas doenças, incluindo as gastrointestinais e hepáticas. A fagoterapia, uso de vírus bacteriófagos para tratar infecções bacterianas, tem despertado um renovado interesse devido à diminuição da eficácia dos antibióticos e avanços na compreensão da microbiota humana. Essa terapia demonstra efeitos imunomoduladores e bactericidas contra as bactérias-alvo, sendo explorada principalmente no tratamento de doenças gastrointestinais, como cólera e diarreia. Além disso, estudos têm investigado seu potencial em doenças não transmissíveis, como doença de Crohn, colite ulcerativa, câncer colorretal e doença hepática gordurosa não alcoólica. A terapia fágica visa controlar o crescimento anormal de microrganismos patogênicos associados a essas doenças, combatendo patógenos resistentes a antibióticos e restaurando a homeostase microbiótica. É uma abordagem terapêutica direcionada, utilizando bacteriófagos que infectam especificamente as bactérias patogênicas, minimizando desequilíbrios microbióticos. Nesta revisão, avaliamos o potencial uso terapêutico de bacteriófagos na diminuição da colonização intestinal com bactérias patogênicas causadoras de disbiose, assim como, estudos que verificaram a segurança e eficácia para essa terapia, sendo possível alcançar resultados promissores quanto ao futuro tratamento de infecções bacterianas intestinais.

**Palavras-chave:** bacteriófagos; fagos; disbiose intestinal; resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

The human body harbors a large number of symbiotic microorganisms in the gastrointestinal tract. However, changes in microbial homeostasis eventually allow abnormal growth of pathogenic microorganisms associated with various diseases, including gastrointestinal and liver diseases. Phage therapy, the use of bacteriophage viruses to treat bacterial infections, has sparked renewed interest due to the declining effectiveness of antibiotics and advances in understanding the human microbiota. This therapy demonstrates immunomodulatory and bactericidal effects against target bacteria and is mainly exploited in the treatment of gastrointestinal diseases such as cholera and diarrhea. In addition, studies have investigated its potential in non-communicable diseases such as Crohn's disease, ulcerative colitis, colorectal cancer, and non-alcoholic fatty liver disease. Phage therapy aims to control the abnormal growth of pathogenic microorganisms associated with these diseases by combating antibiotic-resistant pathogens and restoring microbiotic homeostasis. It is a targeted therapeutic approach, using bacteriophages that specifically infect pathogenic bacteria, minimizing microbiome imbalances. In this review, we evaluate the potential therapeutic use of bacteriophages in decreasing intestinal colonization with pathogenic bacteria causing dysbiosis, as well as, studies that have verified the safety and efficacy of this therapy, with promising results for the future treatment of intestinal bacterial infections.

**Keywords:** bacteriophages; phages; intestinal dysbiosis; antimicrobial resistance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia dos bacteriófagos.....	20
Figura 2 – Ciclos replicativos dos bacteriófagos.....	22
Figura 3 – Exemplificação de uma placa de lise bacteriana causada por cultura de fago SSsP-1. ....	27

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Morfotipos e Propriedades Básicas de Famílias de Fagos.....20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente-invasiva
CCR	Câncer Colorretal
CDI	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
COU	Colite Ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DHA	Doença Hepática Associada ao Consumo de Álcool
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleico de fita dupla
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NEC	Enterocolite Necrosante
PFU	Unidades Formadoras de Placa
RNA	Ácido Ribonucleico
ssDNA	Ácido Desoxirribonucleico de fita simples
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Células T helper
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
5.1	BACTERIÓFAGOS .....	19
5.2	BACTERIÓFAGOS E INTESTINO.....	23
5.3	BACTERIÓFAGOS E SISTEMA IMUNE.....	24
5.4	DISBIOSE INTESTINAL .....	25
5.5	USO TERAPÊUTICO DE BACTERIÓFAGOS .....	26
5.6	DOENÇAS COM POTENCIAL TRATAMENTO POR FAGOTERAPIA .....	30
5.7	<i>OVERVIEW</i> DE ESTUDOS CLÍNICOS ANIMAIS E HUMANOS BASEADOS EM FAGOTERAPIA .....	34
5.7.1	<b>Avaliação da segurança de tratamento com bacteriófagos</b> .....	<b>34</b>
5.7.2	<b>Tratamento em adultos saudáveis</b> .....	<b>37</b>
5.7.3	<b>Uso de bacteriófagos no tratamento da DII</b> .....	<b>39</b>
5.7.4	<b>Bacteriófagos como opção terapêutica no CCR</b> .....	<b>42</b>
5.7.5	<b>Uso de bacteriófagos no tratamento da DHA</b> .....	<b>43</b>
5.7.6	<b>Estudos em andamento</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maioria dos antibióticos administrados por via oral altera a microbiota intestinal, mesmo que transitoriamente durante o tratamento. Alguns antibióticos, no entanto, induzem mudanças duradouras e relevantes na microbiota do Trato Gastrointestinal (TGI). Por exemplo, enquanto alguns antibióticos não apresentam um impacto expressivo a longo prazo na microbiota intestinal, o tratamento com antibióticos macrolídeos em crianças pode levar a uma diminuição significativa e prolongada de *Firmicutes* (incluindo os gêneros *Clostridioides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*) e *Actinobacteria*, com aumento concomitante de *Bacteroidetes* (incluindo os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*) e *Proteobacteria* (incluindo *Escherichia coli*) (WEISS, HENNET, 2017). A exposição repetida a antibióticos pode desestabilizar a microbiota intestinal e promover o crescimento de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos, como observado através do desenvolvimento de diarreia associada a espécie *Clostridioides difficile* em idosos (FURUYA-KANAMORI *et al.*, 2015). Alguns antibióticos aumentam a taxa de mutação bacteriana, aumentando assim, a probabilidade de desenvolvimento de resistência (SAHA, MUKHERJEE, 2019). Contudo, antibióticos como a rifaximina causam um efeito eubiótico, isso é, promove uma expansão de bactérias benéficas através da supressão de patobiontes, contribuindo para aumentar a diversidade microbiana intestinal em pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) e melhorando também os sintomas da síndrome do intestino irritável (GUSLANDI, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2022).

Os antibióticos continuam sendo vitais para a medicina moderna, mas a pandemia oculta de superbactérias resistentes a medicamentos está levando os cientistas a explorar alternativas possíveis. Um tipo de terapia em particular está atraindo grande interesse científico: os bacteriófagos ou simplesmente fagos, que são vírus com a capacidade de infectar bactérias, de modo a inativá-las, evitando seu crescimento dentro do organismo hospedeiro. Entre uma das vantagens associadas à terapia com fagos está na sua capacidade de co-evoluir junto ao seu hospedeiro, diminuindo as chances de bactérias desenvolverem resistência a eles, quando em comparação com os antibióticos. Outra propriedade interessante é sua capacidade de auto dosagem, onde após uma única dose, multiplicam-se *in situ* e desaparecem após a lise da população bacteriana alvo (SAHA, MUKHERJEE, 2019). Outras vantagens

estão relacionadas com os fagos em si, isso porque seu efeito lítico impede que as bactérias infectadas se recuperem de alguma maneira, evitando o desenvolvimento de resistência (LOC-CARRILLO, ABEDON, 2011). Os fagos são considerados agentes com baixa toxicidade inerente, pois sua composição se faz basicamente por proteínas e ácidos nucleicos. Dessa forma, as possibilidades dessa terapia causar desconfortos estão principalmente relacionadas à interação dos fagos com o sistema imune do hospedeiro, além de estarem também relacionadas com a liberação de toxinas provenientes das bactérias lisadas (KUTTER *et al.*, 2010). Devido à sua especificidade, os fagos acabam por afetar minimamente a microbiota saudável, pois seus alvos são, geralmente, bactérias patogênicas (SKURNIK, PAJUNEN, KILJUNEN, 2007). Eles também não apresentam resistência cruzada a antibióticos, pois atuam utilizando diferentes mecanismos de eliminação. Com isso, o perfil de resistência bacteriana a antibióticos não se reflete no uso dos bacteriófagos, porém o mesmo ocorre no sentido oposto (LOC-CARRILLO, ABEDON, 2011).

Com base em suas características de segurança para utilização em terapias fágicas e devido ao fato dos fagos serem facilmente isolados do ambiente natural, a descoberta de fagos virulentos é rápida em comparação com novas entidades químicas, sejam elas de origem sintética ou natural. Assim, os fagos têm potencial para uma entrega mais rápida do laboratório à clínica, porém isso requer o desenvolvimento de processos de fabricação adequados, para que sejam sequenciados e isolados com base na terapia fágica específica para cada tratamento (SAHA, MUKHERJEE, 2019).

Esses são alguns dos fatores interessantes para se considerar uma terapia baseada em bacteriófagos ou, pelo menos, baseada na associação de antibióticos e fagos. Segundo alguns estudos como de Tagliaferri, Jansen e Horz (2019), Gu Liu e colaboradores (2020), Michodigni e colaboradores (2022) e Save e colaboradores. (2022), a terapia conjunta mostrou melhores resultados na diminuição ou eliminação de bactérias patogênicas, sejam elas resistentes ou não aos antibióticos químicos ou aos bacteriófagos, quando em comparação com o uso de terapias individuais.

Essas informações em conjunto evidenciam que a utilização de fagos está se tornando uma alternativa cada dia mais atraente de tratamento para controle de infecções. Nesse sentido, o presente trabalho fundamentou-se na realização de uma revisão narrativa com a finalidade de avaliar os aspectos que permeiam as terapias

envolvendo a utilização dos fagos no controle da disbiose intestinal e nos problemas acarretados por este desequilíbrio em doenças do TGI.

## 2 JUSTIFICATIVA

O consumo desenfreado de antibióticos, associado ao uso irracional, tratamentos extensivos e infecções recidivas, levou a uma crise de resistência bacteriana global, tornando-se uma das principais preocupações sanitárias pelos órgãos de saúde ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). O descobrimento dos bacteriófagos e a elucidação de seus mecanismos terapêuticos tornou possível a análise de novas propostas de terapia para diversas doenças intestinais e hepáticas provenientes do desequilíbrio microbiótico, ou que a partir de seu agravamento, resultem no desenvolvimento de disbiose bacteriana intestinal.

A antibioticoterapia, muitas vezes, tem como resultado o desequilíbrio da microbiota, visto que, em grande parte dos tratamentos para as principais cepas patogênicas, se faz necessário a utilização de antibióticos de amplo espectro de ação, afetando, desta forma, não apenas a bactéria alvo, mas também aquelas comensais ao organismo (YU, CHEON, 2022). Com a fagoterapia, limitações como essas apresentariam resoluções, dado a especificidade que estes vírus dispõem em relação às bactérias patogênicas (SKURNIK, PAJUNEN, KILJUNEN, 2007).

Portanto, é de suma importância que temas como esse sejam abordados em trabalhos acadêmicos na formação de futuros profissionais de saúde, como os farmacêuticos, beneficiando a ciência, com a maior diversidade de estudos, e a população, com o conhecimento de novas propostas terapêuticas seguras e eficazes para o tratamento de uma ampla gama de patologias.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar uma revisão narrativa sobre o potencial uso de bacteriófagos para o tratamento da disbiose em doenças do trato gastrointestinal.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Apresentar a estrutura e função dos bacteriófagos;
- Descrever a interação de bacteriófagos com o sistema imune;
- Analisar e avaliar as terapias utilizando bacteriófagos para o controle da disbiose intestinal;
- Apresentar os ensaios clínicos que utilizam a terapia fágica no tratamento de doenças do trato gastrointestinal.

#### 4 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão narrativa em que a base metodológica consistiu em uma pesquisa bibliográfica com o propósito de discorrer sobre potencial uso de bacteriófagos para o tratamento da disbiose nas doenças do trato gastrointestinal.

Para tal, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nos portais de periódicos Scielo, PubMed, EMBASE, Cochrane Library e ClinicalTrials.gov, assim como publicações em livros. A pesquisa compreendeu o período do início de janeiro de 2023 ao fim do mês de maio de 2023. As palavras-chave/descriptores utilizados foram: bacteriófagos, fagos, “bacteriophages”, “phages”, disbiose intestinal, “gut dysbiosis”, “intestinal dysbiosis”, fagoterapia, “phage therapy”, tratamento com bacteriófagos e doenças inflamatórias intestinais, podendo ou não estes termos estar associados através dos operadores booleanos (AND/OR). Foram aplicados os filtros de restrição de artigos publicados nos idiomas inglês, português e espanhol, sem restrição de tempo de publicação, e com *free full text* disponíveis. Foram excluídos artigos no formato de comentários, carta, editorial, teses e dissertações. Finalmente, as informações e dados foram extraídos e organizados por meio de uma síntese narrativa, e posteriormente, elaborada esta revisão narrativa da literatura.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Patógenos resistentes à antibióticos tradicionais constituem um sério problema de saúde global, agravados pelo seu uso irracional, transferência horizontal de genes, disseminações em ambientes hospitalares e evolução natural de microrganismos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020) sendo assim uma grande preocupação para todos os órgãos de saúde mundiais, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Uma avaliação de tratamentos antibacterianos não convencionais, como os baseados em bacteriófagos, é, portanto, necessária para enfrentar esse importante problema de saúde pública mundial. Os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, foram descobertos na era pré-antibiótica e são usados há muitos anos em países principalmente da Europa oriental, como Rússia, Geórgia e Polônia, em tratamentos antibacterianos conhecidos como terapia fágica (MYELNIKOV, 2018). Os fagos são onipresentes no ambiente, incluindo o TGI humano, onde são tão numerosos quanto as bactérias comensais. Ao contrário dos antibióticos, esses vírus são altamente específicos, infectando apenas um número limitado de cepas dentro de uma determinada espécie bacteriana e, portanto, têm um impacto muito menor na composição da microbiota (KORTRIGHT *et al.*, 2019).

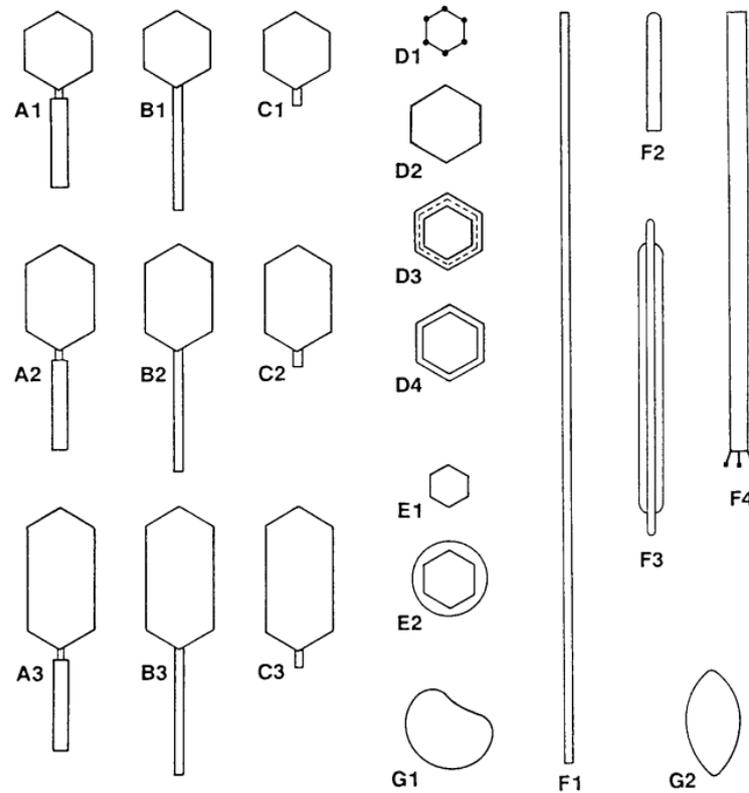
A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na regulação da patogênese da doença humana e na manutenção da saúde. Em pessoas saudáveis é composta principalmente por bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, representando mais de 90% do número total de bactérias intestinais (FUJIMURA *et al.*, 2010). Contudo, quando há diminuição destes filos e conseqüente aumento de *Enterobacteriaceae*, o equilíbrio microbiótico comensal se transforma em um desequilíbrio patogênico chamado de disbiose (WEISS, HENNET, 2017). A disbiose intestinal está diretamente associada a DII, como a Doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (COU), e com o câncer colorretal (CCR) (KAUR *et al.*, 2011). Além disso, mostra relacionar-se também com doenças hepáticas, incluindo doença hepática associada ao consumo de álcool (DHA), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e cirrose hepática (DUAN, YOUNG, SCHNABL, 2022).

## 5.1 BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam bactérias sendo considerados o grupo de vírus mais numeroso, com um total estimado de  $10^{31}$  partículas de fagos em todo o planeta (HSU *et al.*, 2021). Eles ocorrem em archaea e bactérias e possuem capacidade de colonizar todos os habitats concebíveis na natureza (ACKERMANN, 2001). Sua descoberta aconteceu de maneira independente por pesquisadores de diferentes países. Inicialmente em 1915 por Frederick Twort, bacteriologista britânico com formação médica, e em 1917 por Félix D'Herelle, microbiologista Franco-Canadense, que foi o pesquisador que propôs a utilização do termo “bacteriófago”, algo como “devorador de bactérias” (SULAKVELIDZE, ALAVIDZE, MORRIS JR., 2001).

Esses vírus são geralmente classificados com base em sua estrutura morfológica e sequência genética (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022), podendo se apresentar em distintas formas e tamanhos e com genomas consistindo de DNA ou RNA de fita simples (ssDNA e ssRNA) ou dupla (dsDNA e dsRNA). Foram originalmente definidos e categorizados em 21 morfotipos com base em sua morfologia (Figura 1), antes que as tecnologias de sequenciamento de ácidos nucleicos começassem a ser usadas na classificação taxonômica (HSU *et al.*, 2021). Desse modo, cada morfotipo apresenta-se em sua forma específica com características próprias, sendo divididos em filamentosos (*Inoviridae*), poliédricos (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* e *Cystoviridae*), ou pleomórficos (*Plasmaviridae*), caudados, envelopados ou não (Quadro 1) (ACKERMANN, 2001; TURNER, KROPINSKI, ADRIAENSSENS, 2021). Contudo, apesar da grande variedade apresentada por esses vírus, os bacteriófagos caudados de DNA de fita dupla pertencentes à ordem *Caudovirales* são os mais comuns e os mais comumente usados para fins terapêuticos (HSU *et al.*, 2021).

Figura 1 – Morfologia dos bacteriófagos.



Fonte: Ackermann (2001).

Quadro 1 – Morfotipos e Propriedades Básicas de Famílias de Fagos.

Morfotipo	Forma	Ácido Nucleico*	Família	Particularidades
A1 a A3 B1 a B3 C1 a C3	Caudado	DNA, 2, L	<i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	Cauda contrátil Cauda longa não contrátil Cauda curta
D1 D3 D4 E1 E2	Poliédrico	DNA, 1, C, (+) DNA, 2, C, S DNA, 2, L RNA, 1, L, (+) RNA, 2, L, Seg.	<i>Microviridae</i> <i>Corticoviridae</i> <i>Tectiviridae</i> <i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>	Capsômero comum Capsídeo complexo, lipídico Vesículas lipídicas, cauda falsa  Envelopado, lipídico
F1 F2 F3 F4	Filamentoso	DNA, 1, C, (+)  DNA, 2, L DNA, 2, L	<i>Inoviridae</i>  <i>Lipothrixviridae</i> <i>Rudoviridae</i>	Filamentos longos Hastes curtas Envelopado, lipídico Semelhante ao Vírus do mosaico do tabaco
G1 G2	Pleomórfico	DNA, 2, C, S DNA, 2, C, S	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i>	Envelopado, lipídico, sem capsídeo Forma de limão

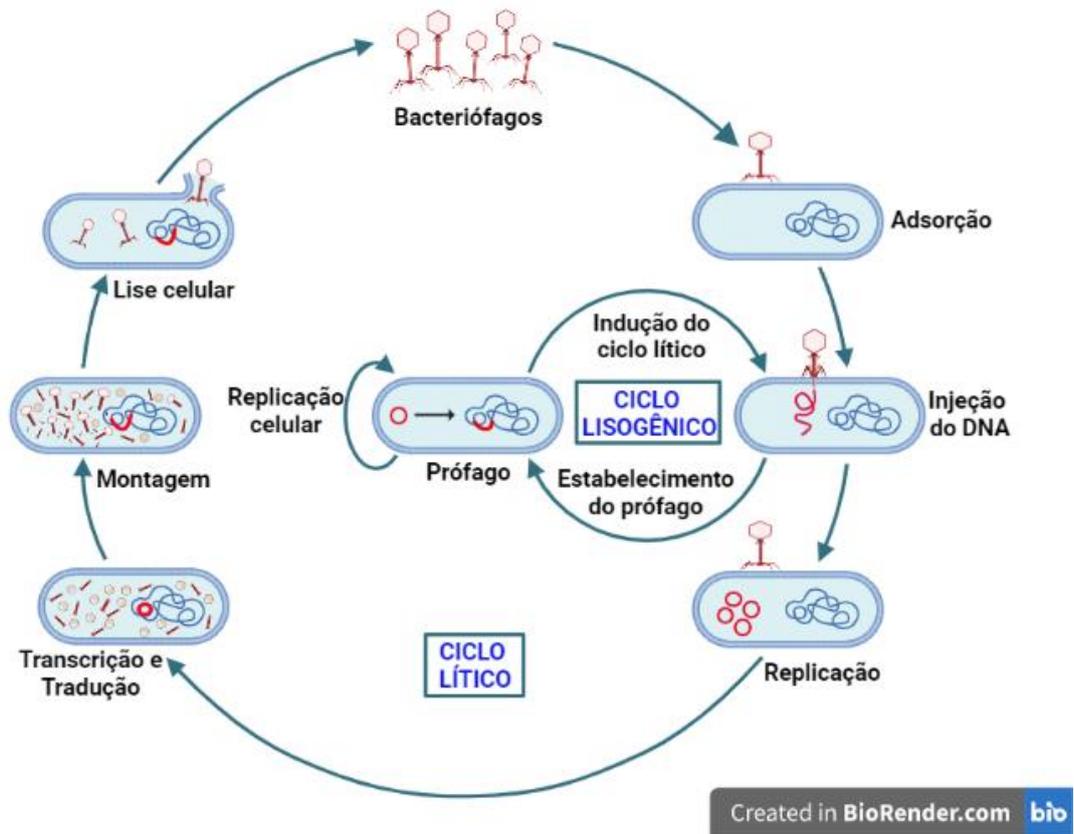
\*C - circular; L - linear; S - supercoil; Seg. - segmentado; 1 - fita simples; 2 - fita dupla; (+) - senso positivo. Fonte: Adaptado de Ackermann (2001).

Além do morfotipo e do tipo de ácido nucleico, existem 2 categorias principais de fagos com diferentes estilos de vida: os líticos (também conhecidos como virulentos) e os temperados (HSU *et al.*, 2021), sendo assim categorizados tendo como base o seu comportamento funcional (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022).

Os fagos virulentos recebem este nome pois seguem estritamente um ciclo de vida lítico (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022), de modo a interromper o metabolismo bacteriano e causar a lise da bactéria (SULAKVELIDZE, ALAVIDZE, MORRIS JR., 2001). Esses são assim categorizados pois reconhecem o receptor na superfície da parede celular bacteriana e injetam seu DNA na bactéria através de sua cauda. Assim, os ácidos nucleicos genômicos dos fagos são replicados dentro da bactéria, sequestrando as funções da célula bacteriana. Depois que os vírions da progênie são montados, as enzimas do fago lisam a parede celular bacteriana interna, resultando na liberação dos fagos recém-montados para o ambiente, fazendo com que, ao serem liberados, continuem atuando nessa relação presa-predador que se perpetua no organismo (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022).

Os fagos temperados podem entrar em um ciclo de vida lítico sob certas circunstâncias, pois também podem injetar DNA (possivelmente contendo fatores de resistência e virulência a medicamentos) em células bacterianas, que então se integram ao cromossomo do hospedeiro como profagos (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022). Sendo assim, quando um fago temperado infecta uma bactéria, existe a possibilidade de duas vias de desenvolvimento para o vírus: a via lítica, que culmina na produção de um grande número de novas partículas virais e lise da célula; mas também a via lisogênica, na qual a célula sobrevive com a capacidade lítica do vírus inativada, e o DNA viral integrado ao DNA do hospedeiro replicando-se como parte do cromossomo do mesmo. Uma vez estabelecido, o estado lisogênico é bastante estável, mantendo o DNA viral (ou profago) reprimido e integrado (ECHOLS, 1972) (Figura 2).

Figura 2 – Ciclos replicativos dos bacteriófagos.



Fonte: Adaptado de Hsu *et al.* (2021) e Silva (2022).

A comunidade total de bacteriófagos do intestino humano é chamada de fageoma, colonizando o intestino desde o nascimento e acompanhando-nos ao longo da vida. O fageoma parece ser único para cada indivíduo e mostra um alto grau de variação interpessoal. Quando referidos a um intestino saudável, os fagos, em sua grande maioria, possuem um estilo de vida lisogênico e, por isso, acabam formando profagos que atuam como um importante repositório de elementos genéticos móveis no intestino e desempenham papéis-chave na troca de material genético entre espécies bacterianas por meio de transferência horizontal de genes (BAKSHINEJAD, GHIASVAND, 2017). Tal papel se mostra muito importante devido ao fato de os fagos serem incrivelmente diversos e possuírem sua própria gama de hospedeiros, ou seja, a gama de bactérias com possibilidade de infecção. Enquanto alguns fagos podem infectar apenas uma ou algumas cepas bacterianas, outros podem possuir um espectro muito amplo, abrangendo vários gêneros de bactérias (BAJAJ, NG, SCHNABL, 2022; ROSS, WARD, HYMAN, 2016).

## 5.2 BACTERIÓFAGOS E INTESTINO

Os bacteriófagos são reconhecidamente povoadores de diversos ambientes do corpo humano. No entanto, em sua grande maioria, encontram-se nas superfícies mucosas, tendo em vista inúmeros estudos demonstrando que o TGI é o ambiente com a maior concentração desses vírus (COLUMPSI *et al.*, 2016). Avaliações clínicas e laboratoriais mostraram que o intestino de neonatos é rapidamente habitado por bactérias provenientes do organismo materno e do meio ambiente. Como os fagos se fazem presentes em todos os ambientes em que haja presença de bactéria, a colonização bacteriana do intestino infantil é seguida pela colonização por fagos. Essa evolução do fageoma no intestino infantil é tão rápida que uma semana após o nascimento,  $10^8$  partículas semelhantes a vírus, em sua maioria fagos, foram detectadas em cada grama de fezes. Além disso, há uma renovação das principais sequências de fageoma durante a segunda semana após o nascimento (BREITBART *et al.*, 2008). Em comparação com os adultos, o fageoma intestinal infantil apresenta menor diversidade, porém com maiores flutuações, demonstrando que com o decorrer do tempo e a maturação do intestino infantil, ocorrem extensas mudanças na composição de seu fageoma, que tende a estabilizar sua estrutura com a idade (DALMASSO *et al.*, 2014). A dieta também foi reconhecida como um dos importantes contribuintes para a composição do fageoma. Em um estudo, vários voluntários foram nutridos com diferentes dietas em teor de fibra e de gordura, sendo revelado que os indivíduos alimentados com a mesma dieta tendem a apresentar um perfil fageômico mais semelhante (MINOT *et al.*, 2011).

No intestino humano, os fagos dsDNA e ssDNA infectam *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, que são os principais filos povoadores deste órgão. No entanto, os fagos de RNA são ingeridos e estão presentes apenas de forma transitória (KRUT, BEKEREDJIAN-DING, 2018) e, por este motivo, não são considerados em estudos de fagos intestinais infectantes. No entanto, reconhece-se a importância do estudo e avaliação de ambos, visto que ainda existe uma alta proporção de fagos não caracterizados no intestino (MIRZAEI, MAURICE, 2017). Mudanças significativas nesses principais filos, como *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, que representam cerca de 90% das bactérias em indivíduos saudáveis, podem permanecer sem consequências patológicas, enquanto quantidades aumentadas de grupos marginais podem ser nocivas, como por exemplo, as *Enterobacteriaceae*, que

normalmente representam uma fração menor da microbiota intestinal, mas que podem se expandir rapidamente após mudanças nas condições oxidativas do intestino, assim como ocorre durante uma inflamação (FUJIMURA *et al.*, 2010). Devido à pirogenicidade do lipopolissacarídeo presentes nas *Enterobacteriaceae*, o crescimento dessa família bacteriana geralmente intensifica uma resposta inflamatória em curso, causando sérios danos ao intestino (WEISS, HENNET, 2017) e fígado do indivíduo (DUAN *et al.*, 2019).

### 5.3 BACTERIÓFAGOS E SISTEMA IMUNE

Classicamente, o sistema imunológico tem sido dividido em dois ramos: a resposta imune inata, que defende o hospedeiro da infecção de maneira não específica, e a resposta imune adaptativa ou adquirida, que reage a antígenos específicos e possui uma memória que agiliza as respostas subsequentes ao mesmo agente, quando em futuras infecções. O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro contra uma infecção sendo que as barreiras físicas apresentadas pelos epitélios, células fagocitárias, proteínas plasmáticas, entre outras, contribuem para essa proteção. Outro fator importante que contribui ativamente para a imunidade inata é o acúmulo de fagos líticos nas superfícies da mucosa (BARR, YOULE, ROHWER, 2013).

A camada mucosa é fortemente colonizada por bactérias, incluindo muitos simbiontes que contribuem com potencial genético e metabólico adicional para o hospedeiro. Por esse motivo, muitos fagos estabelecem relações simbióticas condicionais com seus hospedeiros bacterianos por meio da lisogenia (ALMEIDA *et al.*, 2019). Como profagos integrados, eles geralmente expressam genes que aumentam a aptidão ou virulência do hospedeiro e protegem seu hospedeiro da lise por fagos relacionados; já como fagos livres, eles auxiliam sua cepa hospedeira matando cepas concorrentes relacionadas (BARR *et al.*, 2013). Para atuar como antimicrobianos eficazes para o hospedeiro humano, os fagos aderentes devem reduzir a colonização bacteriana da camada mucosa, assim, protegendo o epitélio subjacente da morte celular resultante do efeito lítico proveniente da interação fago-bactéria. Com base nisso, considera-se que os fagos líticos fornecem uma imunidade não derivada do hospedeiro, não reconhecida anteriormente, que protege ativamente as superfícies mucosas de seu hospedeiro (BARR, YOULE, ROHWER, 2013).

A imunidade adaptativa fornece defesa direcionada contra patógenos específicos, onde a capacidade dos fagos de induzir respostas de anticorpos (imunidade humoral) e células T (imunidade celular) tem implicações importantes para vacinas de exibição de fagos, terapia de fagos e interações com nosso microbioma (POPESCU *et al.*, 2021). Essa interação do bacteriófago com células imunes adaptativas ocorre por meio de peptídeos derivados de fagos que são apresentados por células apresentadoras de antígenos a células T virgens em moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II). As células T específicas para o antígeno-MHC sofrem ativação (liberação de interferon- $\gamma$ ) e proliferação em células Th (T helper). As células Th específicas de fagos são então capazes de ativar células B específicas de fagos imaturos. As células B ativadas diferenciam-se em plasmoblastos, células de vida curta que circulam e produzem grandes quantidades de anticorpos específicos para fagos e células B de memória, que podem ser reativadas após exposição subsequente ao fago e iniciar a produção de mais anticorpos antifagos. Dessa maneira, os anticorpos antifagos ligam-se e inativam os bacteriófagos presentes na circulação e nos tecidos (POPESCU *et al.*, 2021).

#### 5.4 DISBIOSE INTESTINAL

A microbiota intestinal pode ser vista como um sistema organizacional do corpo real que contribui para o bem-estar do organismo hospedeiro. Os trilhões de microrganismo que colonizam o TGI influenciam processos locais e sistêmicos, como transformação de nutrientes, suprimento de vitaminas, maturação da imunidade da mucosa, comunicação intestino-cérebro, intestino-fígado e até mesmo na progressão tumoral (WEISS, HENNET, 2017; ZITVOGEL *et al.*, 2015). Assim como em outros órgãos, o funcionamento adequado da microbiota intestinal depende de uma composição celular estável, que no caso da microbiota humana consiste principalmente de bactérias dos filós *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, e em menor grau, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Alterações significativas na proporção desses filós e/ou a disseminação de novos grupos bacterianos conduzem a um desequilíbrio que viabiliza a promoção de doenças, frequentemente referido como disbiose (WEISS, HENNET, 2017).

Este desequilíbrio microbiano acaba, por muitas vezes, associado a algumas doenças no TGI, como câncer colorretal, síndrome do intestino irritável e as DII, que

incluem a DC e a COU. Essas últimas são idiopáticas e caracterizadas pela disfunção do sistema imune e da microbiota intestinal (KAUR *et al.*, 2011), manifestando-se clinicamente com quadros que podem se estender por anos ou até mesmo décadas, com diarreia de evolução prolongada e recidivante. Em contrapartida, são doenças com algumas características fisiopatológicas e clínicas peculiares que as diferem tanto na evolução quanto na sensibilidade terapêutica, sendo, portanto, fundamental sua distinção durante acompanhamento médico (MARANHÃO, VIEIRA, CAMPOS, 2015). Além das DII, a alteração da microbiota intestinal está também associada a doenças hepáticas, incluindo DHA, DHGNA e cirrose. Por exemplo, em indivíduos com DHA, essa associação se traduz mediante um aumento significativo, principalmente, de cepas de *Enterococcus faecalis*; na DHGNA, o aumento de bactérias comensais se faz evidente através de estudos de amostras fecais de pacientes portadores desta doença, quando comparado à indivíduos controle (DUAN, YOUNG, SCHNABL, 2022).

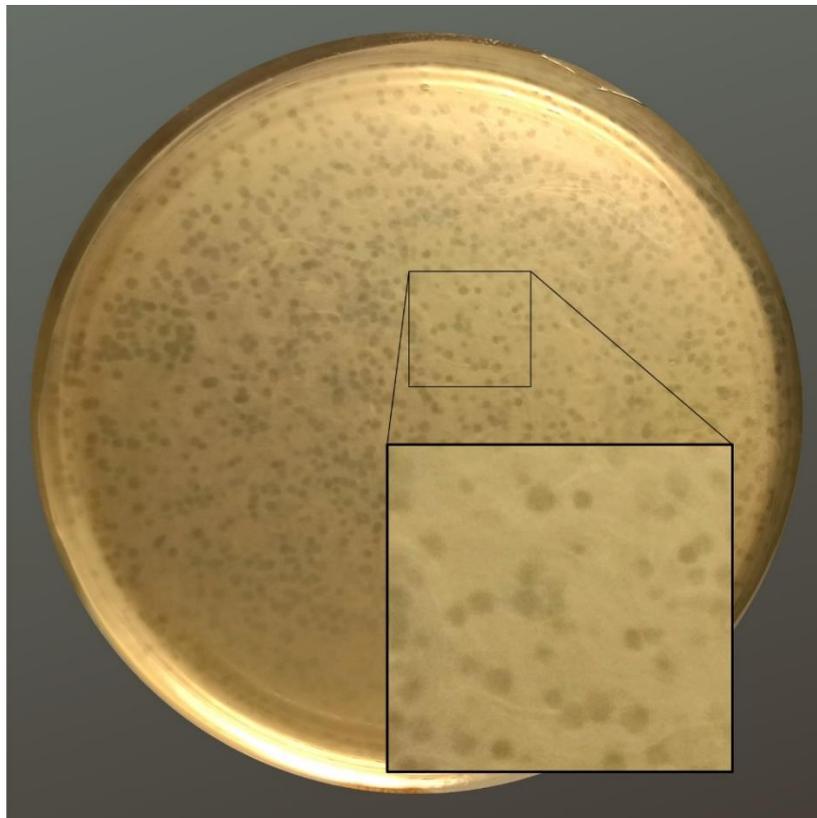
Mesmo que ainda pouco esclarecidas, a etiopatogenia das DII, assim como a relação entre bacteriófagos e doenças hepáticas (DUAN, YOUNG, SCHNABL, 2022), são por muitos relacionadas à resposta imunológica anormal à microbiota bacteriana intestinal, estando associadas a alterações na função de barreira da mucosa. Isso se dá pois o epitélio intestinal representa a principal barreira física para entrada de bactérias, devido a seu revestimento celular por receptores de membrana específicos capazes de distinguir entre bactérias comensais e invasoras, assim, permitindo a manutenção da homeostasia do sistema imune intestinal pela destruição destes organismos invasores (MARANHÃO, VIEIRA, CAMPOS, 2015).

## 5.5 USO TERAPÊUTICO DE BACTERIÓFAGOS

Os primeiros estudos avaliando o uso terapêutico de fagos aconteceu em 1919, no Hospital des Enfants-Malades, em Paris, sob a supervisão clínica do professor Victor-Henri Hutinel, chefe de pediatria do hospital. Os bacteriófagos foram isolados em placas de cultura, como exemplificado pela Figura 3, e utilizados na produção de um coquetel que foi ingerido por D'Herelle, Hutinel e vários internos do hospital para confirmar sua segurança antes de administrá-la no dia seguinte em um menino de 12 anos com disenteria grave. Os sintomas do paciente cessaram após uma única administração do coquetel, recuperando-se completamente em poucos dias. Tendo sua confirmação de eficácia pouco tempo depois, quando administrada

também em outros três pacientes com disenteria bacteriana, onde suas recuperações começaram dentro de 24 horas após administradas as preparações (SUMMERS, 1999). Contudo, os resultados destes estudos não foram divulgados imediatamente, portanto, a primeira aplicação relatada de fagos para tratar doenças infecciosas de humanos veio em 1921 por Richard Bruynoghe e Joseph Maisin, que usaram bacteriófagos para tratar a doença de pele estafilocócica (SULAKVELIDZE, ALAVIDZE, MORRIS JR., 2001).

Figura 3 – Exemplificação de uma placa de lise bacteriana causada por cultura de fago SSsP-1.



Legenda: Cepa de *Enterococcus faecalis* misturada com cultura de bacteriófago SSsP-1 e cultivada em ágar Todd-Hewitt, de acordo com o método de ágar de dupla camada. O bacteriófago pertence ao gênero Saphexavirus da família Siphoviridae. Fonte: Pchelin (2021), via commons.wikimedia.org.

A terapia fágica (ou fagoterapia) é uma prática antiga da era pré-antibiótica na qual os bacteriófagos são utilizados como bioagentes contra infecções bacterianas (SUMMERS, 1999). O advento de antimicrobianos tradicionais eficazes reduziu a utilização da terapia fágica na maioria dos países. No entanto, sua utilização clínica continuou no lugar dos antibióticos, principalmente, na Europa Oriental e na antiga

União Soviética. Atualmente, a terapia fágica vem ganhando muita atenção à medida que as bactérias se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos atuais (MYELNIKOV, 2018). A eficácia terapêutica dos fagos foi demonstrada contra uma ampla gama de patógenos bacterianos, como espécies de *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* (DUAN *et al.*, 2019; HEO *et al.*, 2009; MONK *et al.*, 2010). Normalmente, os bacteriófagos possuem um estreito espectro de ação tanto nas células bacterianas quanto no sistema imunológico, que é ativado por suas proteínas de revestimento (REYES *et al.*, 2012). Por esse motivo, a terapia fágica convencional consiste na aplicação direta de bacteriófagos isolados com o objetivo de lisar as bactérias patogênicas responsáveis pela infecção, sendo que essa administração pode ser feita de diversas maneiras, incluindo sua adição em água potável, coquetéis encapsulados que então são ingeridos pelo paciente, ou até mesmo através do transplante de microbiota fecal (FATHIMA, ARCHER, 2021).

O método produtivo geralmente utilizado para seleção, cultivo e isolamento de fagos é feito através de um processo de fermentação padrão, onde, em suma, as bactérias hospedeiras são cultivadas em cultura líquida em um biorreator. Durante a fase de crescimento logarítmico, os fagos são adicionados ao biorreator para infectar as bactérias. A incubação de fagos com bactérias resulta na adsorção de fagos às bactérias, infecção e, após um curto período, liberação de vírions de bacteriófagos. O lisado resultante contém o produto (o fago amplificado) junto com detritos bacterianos e meio de fermentação residual. A remoção de detritos celulares geralmente é feita utilizando centrifugação e/ou filtração. A troca iônica, a filtração em gel, dentre outras, podem ser usadas para purificar ainda mais o bacteriófago (por exemplo, para a remoção de proteínas da célula hospedeira, DNA da célula hospedeira ou endotoxinas de bactérias Gram negativas). Esses processos permitem que o fago possa ser ressuspenso em solução salina simples ou tampão e armazenado sob condições de refrigeração ou processado posteriormente, por exemplo, seco por pulverização para melhorar o prazo de validade ou encapsulado em formulações de micro ou nanopartículas (MALIK *et al.*, 2017).

Estudos *in vivo* em animais, como os apresentados por Biswas (2002), Cerveny (2002), Smith (1982) e Wills (2005), mostraram que a recuperação dos pacientes tratados com fagos foi dependente tanto da dose administrada quanto do início precoce do tratamento. Contudo, quando em início tardio, os resultados apresentados não se mostraram satisfatórios, sendo esse efeito atribuído às altas

taxas de crescimento bacteriano, resultando em um grande volume de bactérias replicantes que sobrecarregam o sistema imunológico com toxinas bacterianas (MALIK *et al.*, 2017). Para contornar os problemas relacionados à resposta imune, faz-se necessário estudar cuidadosamente cada caso, para então escolher a via de administração adequada, tempo de exposição do fago, dose e forma farmacêutica. Desse modo, é possível encontrar a maneira ideal para lidar especificamente com cada bactéria patogênica, de modo a inibir seu crescimento acelerado e permitir uma maior eficiência terapêutica (SAHA, MUKHERJEE, 2019). O desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento e da biologia molecular aprimorou os conhecimentos básicos das interações entre bactérias e bacteriófagos, permitindo novas possibilidades de utilização de fagos, incluindo fagos geneticamente modificados, terapia dupla e enzimas derivadas de fagos, de modo a aprimorar cada vez mais os tratamentos envolvendo estes vírus (FATHIMA, ARCHER, 2021).

O desequilíbrio microbiótico intestinal característico de um disbiose leva a um crescimento exacerbado de cepas específicas de determinadas bactérias, podendo essas por muitas vezes serem patogênicas, gerando infecções gastrointestinais e, até mesmo desencadeando as DIIs (VITETTA, VITETTA, HALL, 2018). O uso dos bacteriófagos é uma potente arma no controle da disbiose, entretanto o uso de um único bacteriófago, por vezes, não atinge a capacidade necessária para neutralizar certas cepas bacterianas, devido à diversos fatores de resistência, sendo necessário a administração de uma maior gama de fagos para que então seja possível alcançar um resultado terapêutico eficiente. Dessa forma, o uso de coquetéis de fagos tem produzido melhores resultados quando comparados ao uso de fagos isolados, não só pela maior diversidade de cepas presentes nestes coquetéis, mas também devido à arquitetura complexa do TGI, que apresenta um desafio para a terapia fágica, em razão de suas diversas barreiras, como a camada mucosa e a presença de biofilmes (MALIK *et al.*, 2017).

As infecções em estudos clínicos são geralmente induzidas em modelos animais com uma única espécie bacteriana. Contudo, mesmo infecções desencadeadas por uma única bactéria requerem o uso de coquetéis de fagos em vez de tratamentos com um único fago. Isso ocorre porque as misturas de fagos direcionados a diferentes receptores reduzem a probabilidade de encontrar mutantes bacterianos resistentes aos fagos presentes nos coquetéis (MALIK *et al.*, 2017), podendo ser necessário a utilização de 10 a 16 cepas de diferentes bacteriófagos para

cobrir entre metade e dois terços das cepas de bactérias patogênicas, como a *E. coli*, uma das principais bactérias responsáveis por infecções intestinais (DENOUE *et al.*, 2009). Os efeitos sinérgicos apresentados por coquetéis são os principais fatores responsáveis pela sua vantagem em relação ao uso individual de fagos, pois a combinação de diferentes cepas permite a possibilidade de possuir organismos com a capacidade de abrir caminhos no muco e em biofilmes pela presença de enzimas de degradação, e também a presença de fagos que possuam características líticas à determinadas bactérias (SCHMERER, MOLINEUX, BULL, 2014). Assim, a união de diferentes funções por diferentes cepas virais auxilia no contenção do crescimento bacteriano, de modo alcançar o equilíbrio da microbiota e atuar diretamente no controle da disbiose intestinal.

## 5.6 DOENÇAS COM POTENCIAL TRATAMENTO POR FAGOTERAPIA

A diarreia é um importante problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos, atingindo todas as classes e faixas etárias, mas sendo uma grande preocupação principalmente em crianças, onde a causa se dá, sobretudo, pela infecção por *Escherichia coli* resistente aos mais diversos antibióticos (QADRI *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2002). Por este motivo, enquanto vacinas eficazes contra a diarreia por *E. coli* ainda não estão disponíveis (AHMED *et al.*, 2013), somente a administração de zinco e da solução de reidratação oral são alternativas de tratamento, visto que nenhum outro tratamento específico, eficaz, seguro e acessível está disponível para reduzir a gravidade ou a duração dessa doença causada (SARKER *et al.*, 2016). Com isso, segundo a hipótese de Sarker e colaboradores (2016), a administração oral de colifagos poderia vir a se tornar eficaz na redução da gravidade da disenteria em crianças com diarreia comprovadamente induzida por *E. coli* multiresistente.

O CCR representa a terceira maior causa de morte por câncer no mundo. Em virtude do aumento constante em sua incidência, é um dos principais responsáveis pela mortalidade em países desenvolvidos (RAWLA, SUNKARA, BARSOUK, 2019). Seu diagnóstico é frequentemente relacionado com estágios avançados da doença, onde o risco de recorrência é demasiadamente alto, mesmo em casos de cirurgia inicial bem-sucedida e quimioterapia adjuvante (MURGAS *et al.*, 2017). Apesar disso, o CCR quando em estágio avançado acaba por apresentar má resposta aos tratamentos quimioterápicos convencionais, como o 5-fluorouracil (IQBAL,

STOEHLMACHER, LENZ, 2004). Estudos apresentaram evidências que indicam que a microbiota intestinal pode influenciar profundamente o efeito da imunoterapia tumoral (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2018; VÉTIZOU *et al.*, 2015). Por exemplo, a eficácia antitumoral da ciclofosfamida se mostrou dependente de duas espécies da microbiota comensal do intestino, *Enterococcus hirae* e *Barnesiella intestinihominis* (DAILLÈRE *et al.*, 2016). Contudo, bactérias intestinais específicas também podem exercer um impacto prejudicial ao promover o crescimento tumoral (WU *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que o desenvolvimento do CCR está associado à microbiota intestinal e que o enriquecimento de *Fusobacterium nucleatum* no tecido de CCR pode aumentar seletivamente as células mielóides imunossupressoras, resultando em um microambiente tumoral imunossuprimido, diminuindo ainda mais as respostas de células T (TILG *et al.*, 2018). Em razão dos múltiplos efeitos da microbiota intestinal, os tratamentos antibióticos convencionais se mostram limitados, visto que eliminam simultaneamente as bactérias que geram efeitos positivos na imunoterapia do câncer, bem como aquelas com efeitos adversos e/ou resistência aos medicamentos em questão (DONG *et al.*, 2020). Para contornar os problemas gerados pelo desequilíbrio microbiótico intestinal, algumas alternativas vêm sendo buscadas, como é o caso do isolamento de bacteriófagos específicos para determinadas bactérias, como *F. nucleatum* (MACHUCA *et al.*, 2010).

A DC é caracterizada por inflamação profunda, granulomatosa, transmural e em alguns casos, fistulizante, que pode ocorrer em qualquer parte do TGI, embora afete mais comumente o intestino delgado distal (BRASIL, 2017). Uma análise de biópsias da mucosa intestinal de pacientes com DC indicaram um número consideravelmente maior de bacteriófagos em indivíduos portadores da doença em comparação a indivíduos saudáveis (LEPAGE *et al.*, 2008). A partir de estudos foi possível também observar que o local de colonização da doença variava fortemente quanto à presença de diferentes sequências de fagos. Em amostras do cólon de pacientes pediátricos foram encontradas sequências únicas destes vírus; já em amostras de íleo e de lavagem intestinal foram encontradas diferentes sequências de fagos (WAGNER *et al.*, 2013) sendo, em sua maioria, fagos contra cepas de *E. coli*, incluindo as cepas aderentes e invasiva dessa bactéria (GALTIER *et al.*, 2017).

A COU é caracterizada pelo acometimento contínuo do tubo digestivo por um processo inflamatório restrito à mucosa colônica. Esta doença acomete o reto e extensões proximais variáveis do cólon, cujas alterações inflamatórias superficiais

atingem tanto mucosa, quanto submucosas, resultando em criptites e abscessos crípticos nas cristas intestinais (BRASIL, 2020). Ambos os processos da doença exibem manifestações extraintestinais, incluindo artralgia e erupções cutâneas, que são o resultado de inflamação sistêmica (KAUR *et al.*, 2011). Um fator agravante da COU é sua associação com infecções bacterianas, como no caso da infecção por *Clostridioides difficile*, onde foi comprovado que sua associação resultou em pior evolução clínica quando comparado à pacientes com COU e não infectados por *C. difficile* (NAVANEETHAN *et al.*, 2012). Apesar do tratamento para tal infecção ser altamente difundido e eficaz, sendo possível a administração de metronidazol e vancomicina, alguns pacientes não respondem à tal, sendo necessário avaliar terapias alternativas para estes casos em específico (RAMESH, FRALICK, ROLFE, 1999). Uma das alternativas estudada é através do uso de fagos específicos para *C. difficile*, que já demonstraram certa eficácia na redução de comunidades bacterianas relacionadas à doença (GOGOKHIA *et al.*, 2019).

A DHGNA é hoje no mundo uma das doenças hepáticas crônicas mais comuns, podendo afetar de 10 a 24% da população global (GEIER *et al.*, 2021). Estudos recentes associaram a DHGNA a um aumento da prevalência de cânceres extra-hepáticos e doenças metabólicas, como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (MANTOVANI *et al.*, 2021; RUSTGI *et al.*, 2021; SALUNKHE *et al.*, 2021), que podem ameaçar a saúde e causar mortalidade. Essa doença é caracterizada pela resistência à insulina e metabolismo desordenado de glicose e lipídios, seguido de acúmulo hepático de lipídios, que podem induzir inflamação e, por sua vez, levar à fibrose hepática (HAN *et al.*, 2021). A DHGNA representa um grupo de enfermidades que variam entre a esteatose simples e a esteato hepatite não alcoólica (EHNA), que às vezes leva à cirrose e câncer hepatocelular (SALUNKHE *et al.*, 2021). Quando falamos da interação entre os processos decorrentes do intestino que podem ocasionalmente afetar o fígado, estamos nos referindo à intrincada comunicação bidirecional entre o TGI e o fígado por meio do trato biliar, da veia porta e da circulação sistêmica (HAN *et al.*, 2021). O eixo intestino-fígado demonstra um papel essencial na fisiopatologia da DHGNA, sendo possível tal afirmação com base no grande número de estudos clínicos e em animais que apoiam a teoria de que a microbiota intestinal e seus metabólitos exercem grande influência na indução, incidência e progressão da DHGNA. Essa influência ocorre através da modulação das funções da barreira intestinal, do metabolismo hepático e das respostas inflamatórias decorrentes de

alterações nessa microbiota. (BARROW *et al.*, 2021; BEHARY *et al.*, 2021; SHARPTON *et al.*, 2021). Sendo assim, o conhecimento aprofundado desse eixo e a compreensão de seu mecanismo molecular pode fornecer estratégias potenciais para a prevenção e tratamento desta doença (HAN *et al.*, 2021). Da mesma forma, o entendimento sobre as alterações da microbiota intestinal se faz essencial, visto que a colonização por *Klebsiella pneumoniae* produtora de álcool é um agravante e é encontrada em grande parte dos pacientes de DHGNA (YUAN *et al.*, 2019).

O consumo excessivo de álcool se mostra um fator importante na predisposição e desenvolvimento da DHA, que é uma das principais enfermidades relativas ao fígado (MENDES, SCHNABL, 2020). A DHA compreende a esteatose simples, esteatohepatite, hepatite alcoólica e cirrose (ALBHAISI, BAJAJ, SANYAL, 2020). Além disso, o consumo excessivo de álcool também se relaciona com alterações na função imunológica, que estando prejudicada, aumenta a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais (MENDES, SCHNABL, 2020). Esse aumento da susceptibilidade pode ocasionar alterações da microbiota intestinal, mesmo antes do desenvolvimento de DHA, pois, a ingestão contínua de álcool agrava a disbiose, levando à progressão da doença e eventos clínicos relacionados à infecção (PHILIPS, SCHNABL, BAJAJ, 2022).

A cirrose é uma doença prevalente em todo o mundo e pode ser consequência de diferentes causas, como a DHGNA (BERZIGOTTI *et al.*, 2017; ESLAN *et al.*, 2020), DHA (CRABB *et al.*, 2020), hepatites B ou C (VOS *et al.*, 2020), hepatite autoimune (ROBERTS, THERNEAU, CZAJA, 1996), doenças colestáticas (ZEIN *et al.*, 2000) e sobrecarga de ferro ou cobre (GEROSA *et al.*, 2019; SEPANLOU *et al.*, 2020; THACKERAY *et al.*, 2011). A cirrose se desenvolve após um longo período de inflamação que resulta na substituição do parênquima hepático saudável por tecido fibrótico e nódulos regenerativos, levando à hipertensão portal (PELLICORO *et al.*, 2014). A doença evolui de uma fase assintomática (cirrose compensada) para uma fase sintomática (cirrose descompensada), cujas complicações muitas vezes resultam em hospitalização, comprometimento da qualidade de vida e alta mortalidade (D'AMICO, GARCIA-TSAO, PAGLIARO, 2006). Hipertensão portal progressiva, inflamação sistêmica e insuficiência hepática conduzem aos resultados da doença (GINÉS *et al.*, 2021). O manejo da cirrose hepática é centrado no tratamento das causas e complicações, podendo ser necessário o transplante hepático em alguns casos (ALLEN *et al.*, 2016).

Quando o paciente se encontra em estágio de cirrose hepática, as infecções bacterianas são uma grave complicação, pois podem levar à descompensação, falência de múltiplos órgãos e até morte (MENDES, SCHNABL, 2020). Uma das possíveis causas de infecções se dá por meio da translocação bacteriana do lúmen intestinal para locais extra intestinais, principalmente o fígado através da veia porta. Dessa forma, a prevenção de infecções fundamenta-se principalmente na utilização de antibióticos químicos mal absorvidos administrados por via oral (conhecido como descontaminação intestinal seletiva) (GARCIA-TSAO, 2019; YAN, GARCIA-TSAO, 2016). Vários antibióticos foram testados e/ou utilizados para esse fim, como polimixina, neomicina, gentamicina, colistina, paromomicina e sulfametoxazol + trimetoprima (BODE *et al.*, 1997; FERNÁNDES *et al.*, 2016). Atualmente, a norfloxacin e a rifaximina são as formas de descontaminação intestinal seletiva mais evidenciadas na cirrose (SONI *et al.*, 2020; ZAPATER *et al.*, 2009). Contudo, uma grande desvantagem da profilaxia antibiótica de rotina é o surgimento de organismos multirresistentes (PIANO *et al.*, 2018). Desta maneira, novas propostas terapêuticas vêm ganhando força e espaço no meio científico, baseadas em sua capacidade de modificação da microbiota intestinal, tendo como objetivo principal o equilíbrio da mesma, como os probióticos e prebióticos (HORVATH *et al.*, 2020; SAWAS *et al.*, 2015), transplante de microbiota fecal (BAJAJ *et al.*, 2019) e terapia fágica (BAJAJ *et al.*, 2022). Contudo, as evidências para seu uso na prática clínica ainda são limitadas e todas requerem mais estudos e comprovação de sua efetividade, para que assim sejam implantados como alternativa e/ou associação terapêutica.

## 5.7 OVERVIEW DE ESTUDOS CLÍNICOS ANIMAIS E HUMANOS BASEADOS EM FAGOTERAPIA

### 5.7.1 Avaliação da segurança de tratamento com bacteriófagos

A utilização de bacteriófagos para o tratamento de infecções bacterianas é uma prática que possui mais de cem anos (SULAKVELIDZE, ALAVIDZE, MORRIS JR., 2001). Contudo, com o advento dos medicamentos antibióticos, essa prática caiu em desuso por muito tempo e, atualmente, vem ganhando força devido à maior especificidade dos bacteriófagos sobre as bactérias patogênicas causadoras de infecções hepáticas e intestinais (SKURNIK, PAJUNEN, KILJUNEN, 2007). Desta

forma, diversos autores buscaram avaliar a segurança da terapia fágica devido ao grande potencial para a medicina.

Inicialmente, a segurança para esse tratamento foi avaliada por Bruttin e Brüssow (2005), que administraram diferentes doses do fago T4 específico para *Escherichia coli* em 15 pacientes saudáveis entre 23 e 54 anos. O estudo ocorreu de maneira duplo-cego randomizada e controlada por placebo, cujo objetivo era avaliar o controle de uma população específica de bactérias comensais. O método utilizado para avaliar esse possível controle foi baseado na coleta de fezes dos pacientes, antes e durante todo o tratamento, com finalidade de comparar a quantidade de cepas bacterianas contidas em cada etapa do tratamento. Além disso, também foram avaliados possíveis efeitos adversos provenientes da administração dos bacteriófagos. Como resultado, todos os tratamentos foram bem tolerados, não apresentando efeitos adversos significativos em nenhum dos 15 pacientes. Quando avaliadas as amostras de fezes, foi possível verificar que todos os pacientes apresentaram presença de colifagos em pelo menos uma das amostras ao longo de todo o tratamento. Apesar disso, nenhum dos pacientes apresentou redução significativa nas contagens de *E. coli* fecal, questionando assim, se o uso de fagos T4 seria a melhor opção para uma possível formulação terapêutica, devido sua gama muito estreita de cepas de *E. coli*.

Posteriormente, Sarker e colaboradores (2012) avaliaram o tratamento com fagos semelhantes ao fago T4, cuja administração ocorreu por meio de um coquetel contendo 9 diferentes fagos, aplicados a 15 voluntários adultos saudáveis, de 22 a 40 anos, em diferentes doses, de forma aleatória e controlado por placebo. Durante o tratamento, foram avaliados os parâmetros fisiológicos de todos os pacientes, assim como as amostras fecais colhidas durante a administração do coquetel. Os resultados para os parâmetros fisiológicos não apresentaram anormalidades, garantindo assim, a segurança do tratamento. Entretanto, a avaliação das amostras de fezes não se mostrou relevante, visto que apenas 40% das amostras avaliadas apresentaram fagos em sua composição, sendo necessária uma reformulação do coquetel, aumentando a concentração dos fagos e/ou a inclusão de bacteriófagos com maior potencial replicativo.

Em outro estudo, conduzido por McCallin e colaboradores (2013), os autores buscaram identificar a composição de um coquetel bacteriofágico (ColiProteus) produzido por uma indústria farmacêutica russa chamada Microgen, com o propósito

de avaliar sua segurança e possível efetividade no tratamento de diarreia induzida por bactéria. Análises metagenômicas e classificação taxonômica foram utilizadas na identificação dos fagos presentes no coquetel, chegando à conclusão que sua formulação era baseada em fagos T7 e fagos semelhantes à T4, ambos específicos para *E. coli*. O ensaio ocorreu com cinco voluntários adultos, cinco crianças de 5 a 10 anos e cinco crianças com idade inferior a 5 anos, sendo o tratamento controlado por placebo e administrado de maneira aleatória entre os voluntários. Como método avaliativo de segurança, foram examinados os parâmetros fisiológicos de todos os pacientes e avaliadas possíveis queixas de efeitos adversos. Não foram relatadas anormalidades fisiológicas e eventos adversos significativos relacionados ao tratamento, concluindo, assim, que a administração deste coquetel se mostrava segura para o uso tanto em crianças como em adultos.

Em uma nova análise, Sarker e colaboradores (2016) avaliaram a segurança e eficácia do uso do coquetel bacteriofágico Microgen ColiProteus em comparação a um coquetel de fagos semelhante à T4 e ao tratamento tradicional, uma solução de reidratação oral suplementada com zinco. Neste estudo, realizado em Bangladesh, foram avaliadas 120 crianças com diarreia aquosa aguda, que foram subdivididas em 3 grupos, representando os diferentes tratamentos. Para avaliação de segurança, foram verificadas possíveis alterações hepáticas, renais e hematológicas em 75 pacientes iniciados na terapia, não sendo verificadas significativas alterações ou efeitos adversos relacionados ao tratamento. Quando avaliados os dados baseados nas altas clínicas dos pacientes envolvidos, não foi possível observar diferenças significativas entre os 3 grupos. Apesar disso, foi importante considerar que apenas 60% dos pacientes apresentavam *E. coli* nas fezes e, ainda, somente metade delas eram cepas sensíveis aos fagos utilizados.

Finalmente, Sarker e colaboradores (2017) avaliaram a segurança de tratamento em 40 crianças saudáveis ou que apresentavam disenteria, recebendo diferentes doses de um coquetel de fagos semelhantes à T4, de maneira aleatória e controlada por placebo. Para avaliar a segurança, foram verificados os parâmetros clínicos dos pacientes e suas queixas quanto à efeitos adversos, não sendo constatado fatores que incidam na falta de segurança deste tratamento. Desta forma, concluiu-se que as preparações de fagos orais são seguras tanto em crianças saudáveis quanto em crianças em tratamento hospitalar por disenteria bacteriana.

Baseando-se nos estudos apresentados, pode-se concluir que o perfil de segurança da fagoterapia se mostra muito favorável tanto à adultos quanto crianças, gerando assim uma ótima oportunidade de aprofundar os mais diversos estudos com foco em terapia fágica, de maneira a avaliar então a eficácia deste tratamento em ensaios clínicos com maior escopo, possibilitando o melhor entendimento e aplicação destes vírus no controle de bactérias patogênicas associadas à doenças intestinais e hepáticas.

### 5.7.2 Tratamento em adultos saudáveis

O uso de probióticos é uma prática comum que provém de muitos séculos. Com o intuito de melhorar a saúde intestinal e equilibrar sua microbiota, produtos baseados em bactérias, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas incluindo também *Enterococcus* e *Streptococcus*, são altamente consumidos em todo o globo, sejam por produtos fermentados, ou por preparados específicos (DUCATELLE *et al.*, 2015). A partir disso, o crescimento do uso de pré e probióticos combinados com fagos vem ganhando espaço no mundo ocidental, como uma alternativa para controlar o crescimento de bactérias indesejadas e manter o equilíbrio microbiótico em humanos saudáveis (KIANI *et al.*, 2020).

Neste sentido, Febvre e colaboradores (2019) avaliaram o uso de um coquetel de bacteriófagos comercial (PreforPro®) que possui como finalidade a redução no TGI de cepas de *E. coli* patogênicas, bem como seus efeitos na microbiota intestinal e nos marcadores de inflamação intestinal e sistêmica em adultos saudáveis. O estudo foi conduzido no modelo duplo-cego, controlado por placebo, em adultos com e sem sobrepeso, por um período de 28 dias. Para isso, foram selecionados 43 voluntários saudáveis entre 18 e 65 anos que então foram tratados com dois períodos de intervenção resultando nos 28 dias de tratamento, com 2 semanas de intervalo entre as intervenções clínicas.

Os pacientes tiveram suas fezes coletadas pré e pós início do tratamento, para que então fossem avaliadas e comparadas, de maneira a distinguir possíveis efeitos diretos à microbiota intestinal. Na sequência, obteve-se as sequências bacterianas provenientes de cada amostras, resultando na classificação em 7 diferentes filos, comprovando a presença de *E. coli*, bactéria alvo do coquetel, na amostra pré tratamento de pelo menos 21 participantes, dos quais, 15 apresentaram

níveis reduzidos ou indetectáveis após o tratamento com os fagos. Alguns marcadores imunológicos e inflamatórios também foram avaliados, como calprotectina e imunoglobulina A secretora nas fezes, proteína C reativa e um painel de 13 citocinas derivadas de células T humanas, no plasma. Para esses marcadores, não foram observadas mudanças significativas, apenas uma redução de interleucina-4 decorridos 28 dias de tratamento. Os resultados do estudo concluíram que o uso deste coquetel apresentou uma redução importante na comunidade bacteriana de *E. coli*, uma redução de mais de 4 vezes de *Clostridioides perfringens*, bem como aumento de 4 a 5 vezes de duas espécies do gênero *Eubacterium*. Reduções no gênero *Eubacterium* foram associadas a várias condições inflamatórias no TGI, visto que bactérias pertencentes a esse gênero são produtoras de butirato e, como tal, podem ser importantes para estimular a renovação dos enterócitos e manter as junções de barreira firmes, garantindo assim, a integridade da barreira intestinal e proteção contra cepas patogênicas (MATSUOKA, KANAI, 2015).

Em outro estudo, Grubb e colaboradores (2020) aplicaram um ensaio duplo-cego randomizado, controlado por placebo a 68 voluntários adultos saudáveis por um período de 4 semanas, utilizando novamente o coquetel de fagos PreforPro® como opção de melhoria da função intestinal e aumento dos efeitos de probióticos comuns, como o *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis* (*B. lactis*). Para o tratamento, os voluntários foram subdivididos em 3 grupos: o primeiro placebo, o segundo recebendo  $10^9$  UFC de *B. lactis* cepa BL04 (*B. lactis* BL04) e o terceiro recebendo  $10^9$  UFC de *B. lactis* BL04 +  $10^6$  PFU de bacteriófagos através do coquetel PreforPro®. Com os resultados obtidos, foi possível observar melhorias na função gástrica durante o tratamento exclusivo com *B. lactis* BL04, e melhora na inflamação gastrointestinal com redução na gravidade dos sintomas no grupo que recebeu tratamento associado de *B. lactis* BL04 + PreforPro®. Quanto à avaliação da microbiota, o tratamento que apresentou melhores resultados foi através da associação do coquetel PreforPro® com *B. lactis* BL04, sendo possível maior recuperação de bacteriófagos em cerca de 44% das amostras finais avaliadas, bem como maior efeito na diminuição de cepas patogênicas e aumento nos níveis de bactérias com efeitos probióticos.

Finalmente, um ensaio clínico duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, conduzido pela Universidade do Estado de Colorado (EUA) está em andamento, com a finalidade de verificar a efetividade do PreforPro® em associação com o probiótico *Bacillus subtilis* DE111, avaliando sua possível melhora na

regularidade intestinal e nos sintomas físicos de desconfortos gastrointestinais, assim como outros aspectos da saúde gastrointestinal em relação ao uso do probiótico administrado isoladamente. Para isso, espera-se a participação de 120 voluntários saudáveis que terão seus parâmetros fisiológicos avaliados de modo a verificar possíveis benefícios à saúde. Os pacientes serão monitorados por um período de 7 dias anteriormente ao início dos tratamentos e então avaliados por um período de 45 dias, consumindo por 3 dias na semana uma das 3 possibilidades de tratamento: a primeira incluindo PreforPro + *B. subtilis* DE111, a segunda incluindo *B. subtilis* DE111 individualmente e, a terceira consumindo somente placebo. Após o tempo de estudo, serão avaliadas as amostras de fezes coletadas antes e ao final do tratamento, verificando possíveis alterações de colonização, mas também terão seus parâmetros comparados intrapessoalmente e suas taxas de inflamação intestinal e sistêmica verificadas (disponível em [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pelo identificador NCT05750433).

### **5.7.3 Uso de bacteriófagos no tratamento da DII**

Alterações significativas na microbiota intestinal estão diretamente relacionadas à patogênese da DII, colocando como fator discutível o uso antibióticos de amplo espectro, que acaba por produzir muitos efeitos adversos, gerar cepas bacterianas resistentes e se relacionar com a disbiose (YU, CHEON, 2022). Devido a esse fato, buscam-se alternativas para contornar o problema gerado por este tipo de tratamento, de modo que seja mantida a integridade da microbiota saudável, sem que haja o desequilíbrio entre microrganismos simbióticos e o organismo. Neste sentido, houve um aumento no número de estudos avaliando o uso de bacteriófagos como possibilidade terapêutica no controle seletivo de bactérias patogênicas.

A disbiose e patogênese da DII demonstraram estar fortemente associadas com a presença de cepas bacterianas do tipo *E.coli* aderente-invasiva (AIEC), visto que se fazem muito presentes na mucosa intestinal de pacientes com DC. Estudos mostraram que a capacidade desta cepa de se aderir aos receptores de adesão do hospedeiro, presentes no tecido ileal de pacientes com DC, acabam por induzir sintomas de colite (NADALIAN *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2022). A presença de AIEC também está fortemente relacionada com o surgimento de lesões ileais nos estágios iniciais da DC (BUISSON *et al.*, 2023). Uma possibilidade de controle dessa cepa, sem que haja um aumento no desequilíbrio microbiótico desenvolvido pelos

antibióticos de amplo espectro, seria o uso da fagoterapia com foco em bacteriófagos cujo alvo sejam cepas AIEC presentes no intestino humano.

A fagoterapia como potencial alternativa no controle de AIEC intestinal vem sendo abordada por alguns autores, como é o caso do trabalho de Galtier e colaboradores (2017), que por meio de um estudo pré-clínico, utilizaram um coquetel composto por 3 bacteriófagos contra cepas AIEC para avaliar o potencial redutor da colonização da cepa LF82 de AIEC. Para o ensaio, foram utilizados camundongos transgênicos colonizados por LF82, que após receber uma única dose do tratamento, já foi possível observar reduções nos sintomas de colite induzida por dextran sulfato de sódio. Após 1 dia de tratamento, observou-se uma redução significativa, em duas ordens de grandeza, na colonização por AIEC nas fezes e na microbiota aderente das seções intestinais do grupo tratado com o coquetel; já para o grupo controle, uma redução significativa só pôde ser observada após o quarto dia de tratamento. Contudo, mesmo após o quarto dia de tratamento, o grupo tratado com bacteriófagos apresentou números significativamente menores na colonização por AIEC em relação ao controle, demonstrando, dessa forma, que o uso de bacteriófagos no tratamento e controle de cepas AIEC em pacientes com DC se mostra uma possibilidade real de nova terapia.

Em outro estudo avaliando a possibilidade de redução na colonização de cepas AIEC, Titécat e colaboradores (2022) utilizaram como foco de estudo um coquetel composto por 7 fagos líticos [EcoActive™], para verificar a eficácia e especificidade *in vitro* contra 210 cepas clínicas de AIEC e 43 cepas não *E. coli* tipicamente associados a um microbioma humano saudável. O coquetel EcoActive se mostrou eficaz *in vitro* contra 95% das cepas AIEC e, em contraste com os antibióticos convencionais, não apresentou lise em nenhuma das 43 cepas comensais estudadas. De acordo com os estudos metagenômicos apresentados no ensaio, foi possível constatar que a administração a longo prazo do coquetel EcoActive a camundongos saudáveis foi segura e não induziu disbiose. Avaliando os sintomas inflamatórios provenientes de uma colite induzida em camundongos infectados pela cepa LF82 de AIEC, foi possível verificar que uma única administração do coquetel falhou em aliviar os sintomas inflamatórios, enquanto os camundongos que receberam o coquetel duas vezes ao dia durante 15 dias foram protegidos de manifestações clínicas e microscópicas de inflamação. Estes achados validam a abordagem da terapia fágica

direcionada a AIEC como tratamento seguro e eficaz para reduzir os níveis desta cepa no intestino de pacientes com DII.

Em um estudo ainda em fase de recrutamento, iniciado em 2019, os autores visam avaliar se o coquetel EcoActive se mostra seguro e eficaz em pacientes portadores de DC inativa. Para isso, pretende-se avaliar 30 pacientes adultos com DC inativa tratados com doses do coquetel EcoActive e controlados por placebo, de maneira randomizada, por um período de 15 dias. Após isso, pretende-se avaliar a incidência de efeitos adversos e sua gravidade, assim como os efeitos do tratamento na atividade da doença e em seus sintomas associados (disponível em [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pelo identificador NCT03808103).

Além de *E. coli*, alguns estudos também avaliaram a presença de outras bactérias relacionadas à DII. Lee e Kim (2011) verificaram que a infecção por *Klebsiella pneumoniae* administrada oralmente em camundongos com doenças intestinais acaba por aumentar a expressão de mediadores inflamatórios como COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , ativação de NF- $\kappa$ B e peroxidação lipídica no cólon, enquanto reduz proteínas associadas a junções oclusivas, como claudina-1, ZO-1 e ocludina. A bactéria acabou por deteriorar a expressão de marcadores inflamatórios, demonstrando que o distúrbio na composição bacteriana intestinal e, em particular, o aumento irregular de *K. pneumoniae* no cólon podem desencadear quadros de colite.

O estudo de Infecção por *Clostridioides difficile* (CDI) se mostra muito relevante à problemas relacionados ao TGI, visto que essa espécie bacteriana possui relações com progressão e piora clínica da COU, desencadeando o aumento no risco de crises de DII e internações hospitalares (NAVANEETHAN *et al.*, 2012). Entretanto, o tratamento, apesar de eficaz, pode não apresentar efeitos em alguns pacientes, aumentando assim, a taxa de recorrência da infecção (BOERIU *et al.*, 2022). Estratégias para contornar os problemas causados pela infecção de *C. difficile* já se apresentam em estudos pré-clínicos. Alguns autores observaram que a administração de fagos em modelos *in vitro* e *in vivo* reduziu os níveis de *C. difficile* e a produção de toxinas, resultando na sobrevivência dos animais e preservando simultaneamente as bactérias comensais (MEADER *et al.*, 2010; MEADER *et al.*, 2013; RAMESH, FRALICK, ROLFE, 1999;). Apesar dos resultados positivos obtidos nesses estudos, a utilização de um único bacteriófago acabou por não abranger uma gama extensa de cepas infectantes, devido à especificidade de hospedeiros dos fagos. Por este motivo, estudos buscaram desenvolver coquetéis de múltiplos fagos, visando um aumento na

eficácia da terapia pela expansão na gama de hospedeiros de bacteriófagos. Através dos resultados, observou-se que a associação de múltiplos fagos realmente melhora a eficácia do tratamento, reduzindo a colonização por *C. difficile* e produzindo melhores resultados na sobrevivência dos modelos utilizados nos ensaios (NALE *et al.*, 2016; NALE *et al.*, 2018; NALE *et al.*, 2021).

Por fim, faz-se necessário a implementação de estudos clínicos para confirmar se os resultados observados em modelos animais são refletidos em humanos, de modo a introduzir uma nova possível terapia no tratamento de CDI e COU.

#### **5.7.4 Bacteriófagos como opção terapêutica no CCR**

Em razão do aumento na incidência e alta taxa de mortalidade, principalmente em países desenvolvidos, o CCR demonstra uma grande preocupação mundial de saúde (RAWLA, SUNKARA, BARSOUK, 2019). Frente à sua dificuldade terapêutica relacionada ao diagnóstico tardio, o CCR vem recebendo maior visibilidade quanto a possíveis tratamentos (MURGAS *et al.*, 2017). Estudos recentes demonstraram fortes relações entre o desenvolvimento de CCR e infecção por *F. nucleatum* (TILG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2019). Neste sentido, o isolamento de bacteriófagos específicos para *F. nucleatum* demonstram uma estratégia promissora para a prevenção, controle e tratamento de pacientes com a doença. Apesar dos relatos de isolados de fagos específicos de *F. nucleatum* ainda escassos, um estudo pôde demonstrar que o fago FNU1 foi capaz de destruir biofilmes formados pela bactéria, viabilizando o aprofundamento dos estudos com foco em sua eliminação e controle do equilíbrio da microbiota de pacientes com CCR (KABWE *et al.*, 2019).

Os bacteriófagos são considerados carreadores versáteis de substâncias em função de sua seletividade e especificidade, atuando na condução e distribuição de possíveis fármacos e terapia gênica (JU, SUN, 2017). A partir disso, pesquisadores buscaram avaliar a capacidade dos fagos no carreamento de substâncias com o intuito de inviabilizar e/ou eliminar bactérias, como a *F. nucleatum*, uma abordagem com grande relevância para o tratamento de CCR. O estudo, em camundongos, baseou-se na administração intravenosa de nanopartículas de dextrana carregadas com irinotecano (quimioterápico) ligadas covalentemente a fagos modificados por

azida, inibindo o crescimento de *F. nucleatum* e aumentando a taxa de eficiência dos quimioterápicos de primeira linha do CCR (ZHENG *et al.*, 2019).

Em um recente estudo, um fago M13 de ligação específica a espécie *F. nucleatum* foi descoberto por tecnologia de exibição de fagos. Em seguida, os pesquisadores utilizaram nanopartículas de prata montadas eletrostaticamente na superfície de proteína do capsídeo do bacteriófago para obter a depuração específica da bactéria e remodelar o microambiente imune ao tumor. Dessa maneira, o fago, em associação com as nanopartículas de prata, eliminou de forma sinérgica a bactéria intratumoral, de modo a reverter o microambiente tumoral imunossuprimido, resultando no aumento da maturação de células dendríticas, polarização de macrófagos M1 e aumento da eficácia antitumoral das células T, possibilitando o prolongamento da sobrevivência do modelo de camundongo com CCR (DONG *et al.*, 2020).

#### **5.7.5 Uso de bacteriófagos no tratamento da DHA**

Duan e colaboradores (2019) descreveram recentemente que uma cepa de *Enterococcus faecalis* produtora de citolisina presente em pacientes com hepatite alcoólica está associada com uma alta taxa de mortalidade, demonstrando que 89% dos pacientes citolisina positiva acabam falecendo após 180 dias internados, enquanto apenas 3,8% dos pacientes citolisina negativa foram ao óbito no mesmo período. Desta maneira, buscaram avaliar possíveis tratamentos baseados em fagoterapia para inibir o crescimento populacional desta cepa bacteriana.

O estudo pré-clínico, controlado por placebo, foi conduzido utilizando camundongos C57BL/6 tratados com um coquetel de fagos e que foram submetidos a uma dieta crônica de ingestão de etanol e alimentados com dieta Lieber-DeCarli. Para o estudo, foram também selecionados pacientes com hepatite alcoólica participantes de um estudo observacional (NCT02075918), que tiveram suas amostras de fezes coletadas e então utilizadas para a realização de transplantes fecais nos animais do ensaio, por meio de gavagem, começando com 5 a 6 semanas de idade e repetindo o processo após 2 semanas. Quatorze dias após a segunda gavagem, os animais foram introduzidos à dieta de etanol ou controle. Para avaliar os efeitos de citolisina, os animais foram divididos em três grupos: em um deles recebeu por gavagem  $5 \times 10^8$  UFCs de uma cepa citolítica de *E. faecalis*, em outro grupo

recebeu uma cepa não citolítica de *E. faecalis*, e PBS foi utilizado no grupo controle. Tanto no grupo que recebia dieta de etanol quanto placebo, essa aplicação iniciou no sexto dia e decorreu até o dia 15 de alimentação dietética, sendo realizada a cada 3 dias. Ao final desse procedimento, administrou-se, por meio de gavagem,  $10^{10}$  PFUs de fagos específicos para *E. faecalis* citolisina positivo. Após esse tratamento, observou-se uma diminuição nos níveis de *E. faecalis* em amostras de fezes e uma melhora na doença hepática induzida por etanol, assim como, diminuições na taxa de mortalidade associada à cepa citolisina positiva.

Dando continuidade a esse estudo, Mendes, Duan e Schnabl (2022) avaliaram os efeitos do tratamento com bacteriófagos na doença hepática associada ao consumo de álcool. Em um modelo de doença hepática induzida por etanol em camundongos humanizados, a administração oral de fagos induziu uma resposta imune no intestino, com a regulação positiva de Il22, Il17 e Il10, sugerindo efeitos anti-inflamatórios e de reparo tecidual do tratamento com fagos, embora uma leve regulação positiva de Tnfa tenha sido observada no jejuno. Mais importante ainda, a diminuição da expressão de Il1b e o aumento da expressão de Il10 foram detectados no fígado. Além disso, a translocação de fagos observada para o sangue e fígado tem o benefício de permitir o direcionamento de bactérias sistêmicas. Finalmente, os pesquisadores relataram o isolamento de 20 novos fagos que têm como alvo três cepas de *E. faecalis* citolisina positiva isoladas de fezes de pacientes com hepatite alcoólica. Esses novos fagos, além dos 19 fagos líticos previamente descritos (Duan *et al.*, 2019), tiveram sua gama de hospedeiros determinada em 16 cepas citolíticas de *E. faecalis*, cada uma de um paciente com hepatite alcoólica diferente. Alguns fagos demonstraram uma gama de hospedeiros estreita, outros uma gama ampla, mas uma combinação de três fagos infectaria 75% das cepas de *E. faecalis* isoladas e poderia ser testada em um estudo clínico. No entanto, esses estudos foram realizados apenas em animais, necessitando a avaliação em humanos para que os resultados sejam validados, além de estudos que avaliem a segurança da fagoterapia em pacientes portadores de DHA.

#### **5.7.6 Estudos em andamento**

O estudo clínico observacional iniciado pela Assistência Pública de Hospitais de Paris tem como objetivo o de avaliar a associação entre a presença de fagos em

pacientes portadores e não portadores de *E. coli* ou *K. pneumoniae* produtora de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) ou carbapenemase (EPC) (Ec-ESBL/EPC ou Kp-ESBL/EPC) durante sua permanência na unidade de terapia intensiva em dois hospitais de Paris, e verificar se esses fagos poderiam estar associados às possíveis prevenções de enterobactérias multirresistentes. Espera-se uma coorte de 460 pacientes adultos internados em unidade de terapia intensiva (reanimação), sendo a escolha deste tipo de unidade relacionada com fato de que o monitoramento de bactérias resistentes é realizado regularmente durante a internação. Para a realização das análises, amostras de fezes dos pacientes serão coletadas em diferentes momentos da internação, durante a admissão do paciente e ao longo de sua internação. Nessas amostras haverá o monitoramento da presença das bactérias Ec-ESBL/EPC ou Kp-ESBL/EPC e possíveis bacteriófagos capazes de inativá-las. No entanto, a última atualização registrada sobre esse estudo foi em julho de 2019 no portal [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT03231267), não sendo possível verificar os resultados parciais/finais.

Em outro estudo, iniciado em fevereiro de 2023 e que ainda vem sendo delineado pela Intralytix, Inc., empresa de biotecnologia com foco no descobrimento e produção de produtos baseados em bacteriófagos, os pesquisadores visam determinar a segurança e eficácia de um coquetel bacteriofágico (VRELysin) com enfoque em *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). Esse objetivo é traduzido pela capacidade destas bactérias em causar infecções no TGI, mas também pela sua capacidade de disseminação em ambientes hospitalares. O estudo pretende incluir 80 participantes saudáveis em um ensaio duplo-cego, randomizado, controlado por placebo que possuirá, inicialmente, 90 dias de duração. Serão avaliados os parâmetros fisiológicos e os possíveis efeitos adversos que possam surgir durante o tratamento. Além disso, serão avaliadas amostras de fezes anteriores à admissão dos voluntários e ao longo do tempo de estudo, de modo a verificar as alterações de cepas de bactérias colonizadoras nestas amostras, para sejam então identificadas e quantificadas essas colônias, de modo a avaliar a efetividade do VRELysin quanto sua ação sobre bactérias patogênicas, principalmente aquelas classificadas como VRE (NCT05715619).

Por fim, um estudo desenvolvido pelo Hospital Nacional da Dinamarca (Copenhage) busca avaliar a possibilidade de transferência de filtrado fecal em bebês prematuros com a finalidade de maturar a microbiota do TGI e prevenir o

desenvolvimento de enterocolite necrosante (NEC). Essa doença é comum em unidades de terapia intensiva neonatal, afetando mundialmente cerca de 5 a 10% de todos os neonatos internados, e possuindo de 15 a 30% de taxa de mortalidade. Contudo, acredita-se que a maturação adequada da microbiota do neonato possa apresentar melhoras nos quadros de NEC, assim como, a presença de bacteriófagos acaba por desencadear um possível tratamento para diversas doenças, incluindo NEC. O ensaio inicialmente envolverá 20 pacientes, onde 10 receberão transferência de filtrado fecal proveniente de neonatos saudáveis de mesma idade e outros 10 receberão placebo, ambos os tratamentos serão efetuados através de sonda nasogástrica. A primeira fase do estudo será baseada na segurança dos pacientes que receberão o tratamento, avaliando possíveis complicações, somente sendo dada continuidade no estudo, caso não haja aumento da incidência de sepse, NEC e/ou morte no grupo de tratamento. Essa primeira fase ocorrerá em um período de 14 dias e caso não sejam observadas complicações, serão avaliadas as composições de amostras fecais de ambos grupos, com a finalidade de verificar as mudanças relacionadas à maturação microbiótica e possíveis melhoras quanto ao desenvolvimento da doença (NCT05272579).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos estudos clínicos animais e humanos, assim como as informações encontradas na literatura, sugere que pacientes portadores de doenças intestinais e hepáticas desencadeadas por disbiose bacteriana, poderão se beneficiar da terapia fágica como alternativa a antibióticos tradicionais, especialmente em casos onde os principais medicamentos dessa classe apresentam resistência aos mais diversos patobiontes, prejudicando os tratamentos tradicionais, de modo a afetar diretamente a integridade de saúde do paciente que já se encontra debilitado. Isso também se traduz no controle de possíveis colapsos na saúde global, visto que, a resistência bacteriana, principalmente em ambiente hospitalar, é um grave risco à toda população mundial.

Nesse sentido, o que foi exposto nos leva a acreditar que as principais perspectivas para o futuro da fagoterapia se relacionam principalmente às disenterias bacterianas, que apesar de apresentarem uma clínica muitas vezes simples, muito se relaciona com regiões com pouco investimento em saúde, complicando assim, as possibilidades de tratamentos efetivos devido às altas demandas. Outro fator que também apresenta uma boa perspectiva para o tratamento dessa enfermidade, está para o fato dos estudos se mostrarem em estágios mais avançados, já sendo possível encontrar ensaios clínicos em humanos como método de validação da terapia. Também é possível citar a DHA como futuro promissor da fagoterapia, visto que, muitos estudos em modelos animais verificaram que o uso de fagos se mostrou não somente seguro, mas também muito eficaz no controle da disbiose e na redução dos sintomas relacionados à doença e às infecções oportunistas, sendo assim, apresentou grande oportunidade de desenvolvimento de ensaios clínicos humanos para avaliar se a terapia se traduz em benefícios para pacientes humanos, assim como apresentou nos estudos em animais.

A terapia fágica apresenta também certas limitações, como a necessidade de fagos que sejam específicos para cepas bacterianas exatas, visto que, qualquer mutação apresentada pela bactéria, pode acabar inviabilizando a utilização deste fago que anteriormente apresentava efetividade contra essa determinada bactéria, fator que acaba por muitas vezes dificultar o tratamento, principalmente quando relacionado à múltiplos pacientes, pois a colonização de bactérias se apresenta muito individualizada, o que se reflete em estudos sem eficácia

para a fagoterapia, de modo a necessitar novas abordagens pela utilização de cepas fágicas mais variadas, com a finalidade aumentar as possibilidades de um tratamento eficaz contra a cepa bacteriana causadora da infecção.

Em suma, pesquisas ainda são necessárias para validar o uso da fagoterapia em humanos para as mais diversas doenças e bactérias patogênicas, de modo a avaliar de maneira mais precisa as vias de interação entre os bacteriófagos e o sistema imune hospedeiro, fator essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes e seguras e, para o aprofundamento do conhecimento já obtido, sendo possível desvendar novos desafios no que se refere ao uso da fagoterapia, que apesar de presente na literatura a mais de um século, ainda apresenta muitas incógnitas quanto à sua segurança, eficácia e resistência no organismo humano.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, Hans-Wolfgang. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. **Archives of virology**, v. 146, n. 5, p. 843-857, 2001.
- AHMED, Tanvir *et al.* Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhoea. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2013.
- ALBHAISI, Somaya; BAJAJ, Jasmohan; SANYAL, Arun. Role of gut microbiota in liver disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 318, n. 1, p. G84-G98, 2020.
- ALLEN, Alina *et al.* Time trends in the health care burden and mortality of acute on chronic liver failure in the United States. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 2165-2172, 2016.
- ALMEIDA, Gabriel *et al.* Bacteriophage adherence to mucus mediates preventive protection against pathogenic bacteria. **MBio**, v. 10, n. 6, p. e01984-19, 2019.
- ARUMUGAM, Manimozhiyan *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.
- ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS. Existence in the Human Digestive Flora of Phages Able to Prevent the Acquisition of Multiresistant Enterobacteria: PHAGO- BMR. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03231267?term=phage&draw=3&rank=17>>. Acesso em: 6 maio. 2023.
- BAJAJ, Jasmohan *et al.* Impact of bacterial infections and spontaneous bacterial peritonitis prophylaxis on phage-bacterial dynamics in cirrhosis. **Hepatology**, v. 76, n. 6, p. 1723-1734, 2022.
- BAJAJ, Jasmohan *et al.* Long-term outcomes of fecal microbiota transplantation in patients with cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 156, n. 6, p. 1921-1923. e3, 2019.
- BAJAJ, Jasmohan; NG, Siew; SCHNABL, Bernd. Promises of microbiome-based therapies. **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 6, p. 1379-1391, 2022.
- BAKSHINEJAD, Babak; GHASVAND, Saeedeh. Bacteriophages in the human gut: Our fellow travelers throughout life and potential biomarkers of health or disease. **Virus research**, v. 240, p. 47-55, 2017.
- BARROW, Fanta *et al.* Microbiota-driven activation of intrahepatic B cells aggravates NASH through innate and adaptive signaling. **Hepatology**, v. 74, n. 2, p. 704-722, 2021.
- BARR, Jeremy *et al.* Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. 10771-10776, 2013.

BARR, Jeremy; YOULE, Merry; ROHWER, Forest. Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity. **Bacteriophage**, v. 3, n. 3, p. 10771-6, 2013.

BEHARY, Jason *et al.* Gut microbiota impact on the peripheral immune response in non-alcoholic fatty liver disease related hepatocellular carcinoma. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 187, 2021.

BERZIGOTTI, Annalisa *et al.* Effects of an intensive lifestyle intervention program on portal hypertension in patients with cirrhosis and obesity: the SportDiet study. **Hepatology**, v. 65, n. 4, p. 1293-1305, 2017.

BISWAS, Biswajit *et al.* Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 204-210, 2002.

BOERIU, Alina *et al.* The current knowledge on clostridioides difficile infection in patients with inflammatory bowel diseases. **Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 819, 2022.

BODE, Christiane *et al.* Effect of treatment with paromomycin on endotoxemia in patients with alcoholic liver disease—a double-blind, placebo-controlled trial. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 21, n. 8, p. 1367-1373, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde e Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Retocolite Ulcerativa. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Crohn. Brasília, 2017.

BREITBART, Mya *et al.* Viral diversity and dynamics in an infant gut. **Research in microbiology**, v. 159, n. 5, p. 367-373, 2008.

BRUTTIN, Anne; BRÜSSOW, Harald. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2874-2878, 2005.

BUISSON, Anthony *et al.* Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. **Gut**, v. 72, n. 1, p. 39-48, 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. **Department of Health and Human Services, CDC**. Atlanta, GA, 2019.

CERVENY, Karen *et al.* Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6251-6262, 2002.

COLUMPSI, Paola *et al.* Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. **Journal of medical virology**, v. 88, n. 9, p. 1467-1472, 2016.

CRABB, David *et al.* Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver diseases: 2019 practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 71, n. 1, p. 306-333, 2020.

D'AMICO, Gennaro; GARCIA-TSAO, Guadalupe; PAGLIARO, Luigi. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. **Journal of hepatology**, v. 44, n. 1, p. 217-231, 2006.

DAILLÈRE, Romain *et al.* *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 931-943, 2016.

DALMASSO, Marion; HILL, Colin; ROSS, R. Paul. Exploiting gut bacteriophages for human health. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 7, p. 399-405, 2014.

DENOU, Emmanuel *et al.* T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: potential and problems. **Virology**, v. 388, n. 1, p. 21-30, 2009.

DONG, Xue *et al.* Bioinorganic hybrid bacteriophage for modulation of intestinal microbiota to remodel tumor-immune microenvironment against colorectal cancer. **Science Advances**, v. 6, n. 20, p. eaba1590, 2020.

DUAN, Yi *et al.* Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. **Nature**, v. 575, n. 7783, p. 505-511, 2019.

DUAN, Yi; YOUNG, Ry; SCHNABL, Bernd. Bacteriophages and their potential for treatment of gastrointestinal diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 135-144, 2022.

DUBLANCHET, Alain; BOURNE, Shawna. The epic of phage therapy. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 15-18, 2007.

DUCATELLE, Richard *et al.* A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. **Animal**, v. 9, n. 1, p. 43-48, 2015.

ECHOLS, Harrison. Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. **Annual review of genetics**, v. 6, n. 1, p. 157-190, 1972.

ESLAM, Mohammed *et al.* MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 158, n. 7, p. 1999-2014. e1, 2020.

FATHIMA, Bibi; ARCHER, Ann Catherine. Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissance weapon. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 6, p. 103863, 2021.

FEBVRE, Hallie *et al.* PHAGE study: effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 666, 2019.

FERNÁNDEZ, Javier *et al.* Antibiotic prophylaxis in cirrhosis: good and bad. **Hepatology**, v. 63, n. 6, p. 2019-2031, 2016.

FUJIMURA, Kei *et al.* Role of the gut microbiota in defining human health. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 435-454, 2010.

FURUYA-KANAMORI, Luis *et al.* Comorbidities, exposure to medications, and the risk of community-acquired *Clostridioides difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. **infection control & hospital epidemiology**, v. 36, n. 2, p. 132-141, 2015.

GALTIER, Matthieu *et al.* Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 7, p. 840-847, 2017.

GARCIA-TSAO, Guadalupe. Prophylactic antibiotics in cirrhosis: are they promoting or preventing infections?. **Clinical liver disease**, v. 14, n. 3, p. 98, 2019.

GEIER, Andreas *et al.* From the origin of NASH to the future of metabolic fatty liver disease. **Gut**, v. 70, n. 8, p. 1570-1579, 2021.

GEROSA, Clara *et al.* Liver pathology in Wilson's disease: From copper overload to cirrhosis. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 193, p. 106-111, 2019.

GINÈS, Pere *et al.* Liver cirrhosis. **The Lancet**, v. 398, n. 10308, p. 1359-1376, 2021.

GOGOKHIA, Lasha *et al.* Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 2, p. 285-299. e8, 2019.

GOPALAKRISHNAN, Vancheswaran *et al.* The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. **Cancer cell**, v. 33, n. 4, p. 570-580, 2018.

GRUBB, Diana *et al.* PHAGE-2 study: Supplemental bacteriophages extend *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04 benefits on gut health and microbiota in healthy adults. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2474, 2020.

GU LIU, Carmen *et al.* Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. **MBio**, v. 11, n. 4, p. e01462-20, 2020.

GUSLANDI, Mario. Rifaximin in the treatment of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 42, p. 4643, 2011.

HAN, Hui *et al.* Intestinal dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Focusing on the gut–liver axis. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 12, p. 1689-1706, 2023.

HEO, Yun-Jeong *et al.* Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2469-2474, 2009.

HORVATH, Angela *et al.* Changes in the intestinal microbiome during a multispecies probiotic intervention in compensated cirrhosis. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1874, 2020.

HSU, Cynthia. *et al.* Intestinal virome and therapeutic potential of bacteriophages in liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 75, n. 6, p. 1465-1475, 2021.

INTRALYTIX, INC. A Phase 1/2a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial to Assess the Safety and Efficacy of Oral Administration of the Phage Cocktail, VRElysIn™, In Healthy And VRE-Colonized Subjects. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05715619?term=phage&draw=4&rank=30>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

INTRALYTIX, INC.; MOUNT SINAI HOSPITAL. A Phase 1/2a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial to Assess the Safety and Efficacy of Oral Administration of EcoActive on Intestinal Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) in Patients With Inactive Crohn's Disease (CD). Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03808103?term=phage&cond=Crohn+Disease&draw=2&rank=1>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

IQBAL, Syma; STOEHLMACHER, Jan; LENZ, Heinz-Josef. Tailored chemotherapy for colorectal cancer: a new approach to therapy. **Cancer investigation**, v. 22, n. 5, p. 762-773, 2004.

JAKOBSEN, G. R.; RIGSHOSPITALET, DENMARK; LISE AUNSHOLT, NEONATOLOGIST, CLINICAL PROFESSOR. PrePhage - Faecal Bacteriophage Transfer for Enhanced Gastrointestinal Tract Maturation in Preterm Infants - Clinical Trial. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05272579?term=phage&draw=5&rank=40>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

JAMALLUDEEN, Nidham *et al.* Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs. **Veterinary microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 135-141, 2009.

JIANG, Zhi-Dong *et al.* Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 4, p. 497-502, 2002.

JU, Zhigang; SUN, Wei. Drug delivery vectors based on filamentous bacteriophages and phage-mimetic nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1898-1908, 2017.

- KABWE, Mwila *et al.* Genomic, morphological and functional characterisation of novel bacteriophage FNU1 capable of disrupting *Fusobacterium nucleatum* biofilms. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 9107, 2019.
- KAUR, Nirmal *et al.* Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Gut microbes**, v. 2, n. 4, p. 211-216, 2011.
- KIANI, Aysha *et al.* Bacteriophages in food supplements obtained from natural sources. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 91, n. Suppl 13, 2020.
- KORTRIGHT, Kaitlyn E. *et al.* Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 2, p. 219-232, 2019.
- KRUT, Oleg; BEKEREDJIAN-DING, Isabelle. Contribution of the immune response to phage therapy. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 9, p. 3037-3044, 2018.
- KUTTER, Elizabeth *et al.* Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 69-86, 2010.
- LANG, Sonja *et al.* Cytolysin-positive *Enterococcus faecalis* is not increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Liver International**, v. 40, n. 4, p. 860-865, 2020.
- LEPAGE, P. *et al.* Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages?. **Gut**, v. 57, n. 3, p. 424-425, 2008.
- LOC-CARRILLO, Catherine; ABEDON, Stephen. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111-114, 2011.
- MACHUCA, Pamela *et al.* Isolation of a novel bacteriophage specific for the periodontal pathogen *Fusobacterium nucleatum* . **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7243-7250, 2010.
- MEADER, Emma *et al.* Bacteriophage treatment significantly reduces viable *Clostridioides difficile* and prevents toxin production in an *in vitro* model system. **Anaerobe**, v. 16, n. 6, p. 549-554, 2010.
- MEADER, Emma *et al.* Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridioides difficile* and toxin production in an *in vitro* human colon model system. **Anaerobe**, v. 22, p. 25-30, 2013.
- MALIK, Danish *et al.* Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. **Advances in colloid and interface science**, v. 249, p. 100-133, 2017.
- MANTOVANI, Alessandro *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of incident extrahepatic cancers: a meta-analysis of observational cohort studies. **Gut**, v. 71, n. 4, p. 778-788, 2022.

MARANHÃO, Débora; VIEIRA, Andrea; CAMPOS, Tércio. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **J. bras. med**, 2015.

MATSUOKA, Katsuyoshi; KANAI, Takanori. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 47-55., 2015.

MCCALLIN, Shawna *et al.* Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. **Virology**, v. 443, n. 2, p. 187-196, 2013.

MENDES, Beatriz; DUAN, Yi; SCHNABL, Bernd. Immune Response of an Oral *Enterococcus faecalis* Phage Cocktail in a Mouse Model of Ethanol-Induced Liver Disease. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 490, 2022.

MENDES, Beatriz; SCHNABL, Bernd. From intestinal dysbiosis to alcohol-associated liver disease. **Clinical and molecular hepatology**, v. 26, n. 4, p. 595, 2020.

MICHODIGNI, Noutin *et al.* Formulation of phage cocktails and evaluation of their interaction with antibiotics in inhibiting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae in vitro* in Kenya. **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 11, n. 1, 2022.

MINOT, Samuel *et al.* The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. **Genome research**, v. 21, n. 10, p. 1616-1625, 2011.

MIRZAEI, Mohammadali Khan; MAURICE, Corinne. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 397-408, 2017.

MONK, Alastair *et al.* Bacteriophage applications: where are we now?. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 4, p. 363-369, 2010.

MURGAS, Paola *et al.* A filamentous bacteriophage targeted to carcinoembryonic antigen induces tumor regression in mouse models of colorectal cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 2, p. 183-193, 2018.

MYELNIKOV, Dmitriy. An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922–1955. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 73, n. 4, p. 385-411, 2018.

NADALIAN, Banafsheh *et al.* Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *Escherichia coli* and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 36, n. 4, p. 852-863, 2021.

NALE, Janet *et al.* Bacteriophage combinations significantly reduce *Clostridioides difficile* growth *in vitro* and proliferation *in vivo*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 968-981, 2016.

NALE, Janet *et al.* Efficacy of an optimised bacteriophage cocktail to clear *Clostridioides difficile* in a batch fermentation model. **Antibiotics**, v. 7, n. 1, p. 13, 2018.

NALE, Janet *et al.* Impact of phage CDHS-1 on the transcription, physiology and pathogenicity of a *Clostridioides difficile* ribotype 027 strain, R20291. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2262, 2021.

NAVANEETHAN, Udayakumar *et al.* *Clostridioides difficile* infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 3, p. 330-336, 2012.

PCHELIN, Ivan. The SSsP-1 bacteriophage. **Wikimedia Commons**, 2021.  
Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:The\\_SSsP-1\\_bacteriophage.jpg&oldid=622589667](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:The_SSsP-1_bacteriophage.jpg&oldid=622589667)>. Acesso em: 27 de abril de 2023.

PELLICORO, Antonella *et al.* Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 181-194, 2014.

PHILIPS, Cyriac; SCHNABL, Bernd; BAJAJ, Jasmohan. Gut microbiome and alcohol-associated liver disease. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1349-1359, 2022.

PIANO, Salvatore *et al.* Infections complicating cirrhosis. **Liver International**, v. 38, p. 126-133, 2018.

PIMENTEL, Mark *et al.* Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. **New england journal of medicine**, v. 364, n. 1, p. 22-32, 2011.

POPESCU, Medeea *et al.* Bacteriophages and the immune system. **Annu. Rev. Virol**, v. 8, p. 415-435, 2021.

QADRI, Firdausi *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 3, p. 465-483, 2005.

RAMESH, Vijayashree; FRALICK, Joe; ROLFE, Rial. Prevention of *Clostridioides difficile*-induced ileocectitis with bacteriophage. **Anaerobe**, v. 5, n. 2, p. 69-78, 1999.

RAWLA, Prashanth; SUNKARA, Tagore; BARSOUK, Adam. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 14, n. 2, p. 89-103, 2019.

REYES, Alejandro *et al.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607-617, 2012.

- ROBERTS, Stuart; THERNEAU, Terry; CZAJA, Albert. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 848-857, 1996.
- ROSS, Alexa; WARD, Samantha; HYMAN, Paul. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1352, 2016.
- RUSTGI, Vinod *et al.* Bariatric surgery reduces cancer risk in adults with nonalcoholic fatty liver disease and severe obesity. **Gastroenterology**, v. 161, n. 1, p. 171-184. e10, 2021.
- SAHA, Dibya; MUKHERJEE, Raju. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy. **IUBMB life**, v. 71, n. 7, p. 781-790, 2019.
- SALUNKHE, Shubham *et al.* Lipid based nanocarriers for effective drug delivery and treatment of diabetes associated liver fibrosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 173, p. 394-415, 2021.
- SARKER, Shafiqul *et al.* Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 1, p. 237-250, 2017.
- SARKER, Shafiqul *et al.* Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. **EBioMedicine**, v. 4, p. 124-137, 2016.
- SARKER, Shafiqul *et al.* Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 222-232, 2012.
- SAVE, Jonathan *et al.* Bacteriophages combined with subtherapeutic doses of flucloxacillin act synergistically against *Staphylococcus aureus* experimental infective endocarditis. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, n. 3, p. e023080, 2022.
- SAWAS, Tarek *et al.* Patients receiving prebiotics and probiotics before liver transplantation develop fewer infections than controls: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 9, p. 1567-1574. e3, 2015.
- SCHMERER, Matthew; MOLINEUX, Ian; BULL, James. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. **PeerJ**, v. 2, p. e590, 2014.
- SEPANLOU, Sadaf *et al.* The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet gastroenterology & hepatology**, v. 5, n. 3, p. 245-266, 2020.
- SHARPTON, Suzanne *et al.* Current concepts, opportunities, and challenges of gut microbiome-based personalized medicine in nonalcoholic fatty liver disease. **Cell metabolism**, v. 33, n. 1, p. 21-32, 2021.

SILVA, Raphael da *et al.* Isolamento e caracterização de bacteriófagos da pecuária brasileira-ênfase em Santa Catarina. 2022.

SKURNIK, Mikael; PAJUNEN, Maria; KILJUNEN, Saija. Biotechnological challenges of phage therapy. **Biotechnology letters**, v. 29, p. 995-1003, 2007.

SMITH, Herbert; HUGGINS, Michael. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. **Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 307-318, 1982.

SONI, Hariom *et al.* Antibiotics for prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: systematic review & Bayesian network meta-analysis. **Hepatology international**, v. 14, p. 399-413, 2020.

SULAKVELIDZE, Alexander; ALAVIDZE, Zemphira; MORRIS JR, J. Glenn. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-659, 2001.

SUMMERS, William. Felix dHerelle and the origins of molecular biology. **Yale University Press**, 1999.

TAGLIAFERRI, Thaysa; JANSEN, Mathias; HORZ, Hans-Peter. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 22, 2019.

THACKERAY, Erin *et al.* Hepatic iron overload or cirrhosis may occur in acquired copper deficiency and is likely mediated by hypoceruloplasminemia. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, n. 2, p. 153-158, 2011.

TILG, Herbert *et al.* The intestinal microbiota in colorectal cancer. **Cancer cell**, v. 33, n. 6, p. 954-964, 2018.

TITÉCAT, Marie *et al.* Safety and Efficacy of an AIEC-targeted Bacteriophage Cocktail in a Mice Colitis Model. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 16, n. 10, p. 1617-1627, 2022.

TURNER, Dann; KROPINSKI, Andrew; ADRIAENSSENS, Evelien. A roadmap for genome-based phage taxonomy. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 506, 2021.

VÉTIZOU, Marie *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. **Science**, v. 350, n. 6264, p. 1079-1084, 2015.

VITETTA, Luis; VITETTA, Gemma; HALL, Sean. Immunological tolerance and function: associations between intestinal bacteria, probiotics, prebiotics, and phages. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2240, 2018.

VOS, Theo *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, 2020.

WAGNER, Josef *et al.* Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. **Inflammatory bowel diseases**, v. 19, n. 8, p. 1598-1608, 2013.

WEIR, T.; COLORADO STATE UNIVERSITY; ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY. PHAGE 3: Determination of Phage and Probiotic Synergistic Effects on Gastrointestinal Health. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05750433?term=phage&draw=5&rank=33>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

WEISS, G. Adrienne; HENNET, Thierry. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2959-2977, 2017.

WILLS, Quintin; KERRIGAN, Claire; SOOTHILL, James. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1220-1221, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibiotic Resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 14 de abril de 2023.

WU, Shaoguang *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1016-1022, 2009.

YAN, Kathleen; GARCIA-TSAO, Guadalupe. Novel prevention strategies for bacterial infections in cirrhosis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 17, n. 5, p. 689-701, 2016.

YU, Jongwook; CHEON, Jae Hee. Microbial Modulation in Inflammatory Bowel Diseases. **Immune Network**, v. 22, n. 6, 2022.

YU, Xiao *et al.* Rifaximin modulates the gut microbiota to prevent hepatic encephalopathy in liver cirrhosis without impacting the Resistome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1427, 2022.

YUAN, Jing *et al.* Fatty liver disease caused by high-alcohol-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Cell metabolism**, v. 30, n. 4, p. 675-688. e7, 2019.

ZAPATER, Pedro *et al.* Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1669-1679. e1, 2009.

ZEIN, Nizar *et al.* Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. **Journal of hepatology**, v. 32, n. 2, p. 209-217, 2000.

ZHENG, Di-Wei *et al.* Phage-guided modulation of the gut microbiota of mouse models of colorectal cancer augments their responses to chemotherapy. **Nature biomedical engineering**, v. 3, n. 9, p. 717-728, 2019.

ZHENG, Lie *et al.* Role of adherent invasive *Escherichia coli* in pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 32, p. 11671, 2022.

ZITVOGEL, Laurence *et al.* Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. **Science translational medicine**, v. 7, n. 271, p. 271ps1-271ps1, 2015.