

O potencial biotecnológico dos bacteriófagos na deteção e controlo de bactérias patogénicas

Joana Azeredo

IBB- Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

E-mail: jazeredo@deb.uminho.pt

Os bacteriófagos (fagos) apresentam um imenso potencial biotecnológico com aplicação na saúde devido às suas características intrínsecas de reconhecimento e morte do hospedeiro que infetam (bactérias). A exploração destas características no desenvolvimento de métodos de **deteção** e de **controlo** de bactérias patogénicas é relativamente recente, embora a utilização de fagos como ferramentas de biologia molecular seja bastante antiga e a **terapia fágica** uma prática secular, actualmente limitada a alguns países.

Classificação e características estruturais e funcionais dos fagos

A classificação dos fagos segundo o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) é baseada na morfologia e no tipo de ácido nucleico que os constituem (ADN ou ARN de cadeia simples ou dupla). Apesar de se ter tentado adequar a classificação dos fagos a métodos mais recentes, baseados no genoma ou no proteoma [1], os critérios morfológicos prevalecem.

A grande maioria dos fagos (cerca de 96%) até agora isolados pertence à ordem *Caudovirales* [2]. Estes fagos são caracterizados por possuírem uma cápside onde se encontra o material genético empacotado, que neste caso é ADN de cadeia dupla, cauda e fibras da cauda. A cápside é a estrutura que protege a informação genética e a cauda possui fibras ou outras estruturas que estão envolvidas no reconhecimento e ligação do fago à bactéria hospedeira.

Os fagos pertencentes à ordem *Caudovirales* são divididos em três famílias: *Myoviridae*, caracterizada por fagos com cauda longa contráctil (ex. fago T4); *Siphoviridae*, onde se incluem fagos com cauda longa não contráctil (ex. fago lambda); e *Podoviridae*, que engloba fagos com cauda curta (ex. fago T7) (Figura 1). No genoma dos fagos encontram-se genes que codificam proteínas responsáveis pelo empacotamento e replicação de DNA, regulação da transcrição, lise do hospedeiro, bem como proteínas estruturais [2].

Interação fago-hospedeiro

A interacção fago-hospedeiro é muito específica e o reconhecimento é habitualmente feito por intermédio de proteínas situadas nas extremidades da cauda ou nas fibras da

cauda. Após o reconhecimento (caracterizado por uma ligação reversível) dá-se o posicionamento correto da base da cauda, seguido da ligação irreversível de uma outra proteína do fago a um recetor secundário da bactéria [3]. Os recetores bacterianos mais comuns são lipopolissacarídeos ou proteínas superficiais (porinas ou proteínas de transporte) no caso de bactérias Gram-negativas, enquanto em bactérias Gram-positivas são elementos do peptidoglicano, ácidos teicóicos e lipoteicóicos e proteínas associadas.

A especificidade dos fagos limita a sua interação com um número reduzido de estirpes. Existem contudo fagos com espectros de ação mais alargada que podem abranger diferentes estirpes da mesma espécie ou até diferentes espécies (sendo estes designados por fagos multivalentes). Exemplo disto são os fagos Felix O1 ou o fago PVP-SE1 que infetam um conjunto muito alargado de estirpes de *Salmonella enterica* e conseguem também infetar algumas estirpes de *E. coli*.

Um fago virulento apresenta um ciclo de vida estritamente lítico no qual após ligação irreversível, injeção do ADN e síntese de novas partículas virais, o hospedeiro é lisado a partir do seu interior, para ser possível a libertação de novas partículas virais para o meio extracelular.

O papel das endolisinas na lise de bactérias

Os fagos lisam a célula hospedeira a partir do seu interior, geralmente usando o sistema holina-endolisina (existindo contudo outros mecanismos de lise celular), onde as holiinas causam poros na membrana celular, permitindo que as endolisinas tenham acesso ao peptidoglicano, sobre o qual exercem a sua atividade catalítica. A maioria das endolisinas que atua em bactérias Gram-positivas possui uma estrutura modular. Estas endolisinas são compostas por dois tipos de domínios com diferentes funcionalidades: um domínio de ligação no terminal C e um domínio catalítico no terminal N. Normalmente estes dois domínios encontram-se separados por um pequeno espaçador. Dada a presença de um domínio de ligação nas endolisinas de fagos que infectam bactérias Gram-positivas, estas enzimas apresentam, na sua generalidade, um espectro lítico restrito. Esta especificidade permite a sua adição exógena a um hospedeiro sensível, na ausência de fago, provocando a sua lise num processo denominado por “lise a partir do exterior”. As endolisinas de fagos que atuam em bactérias Gram-negativas apresentam

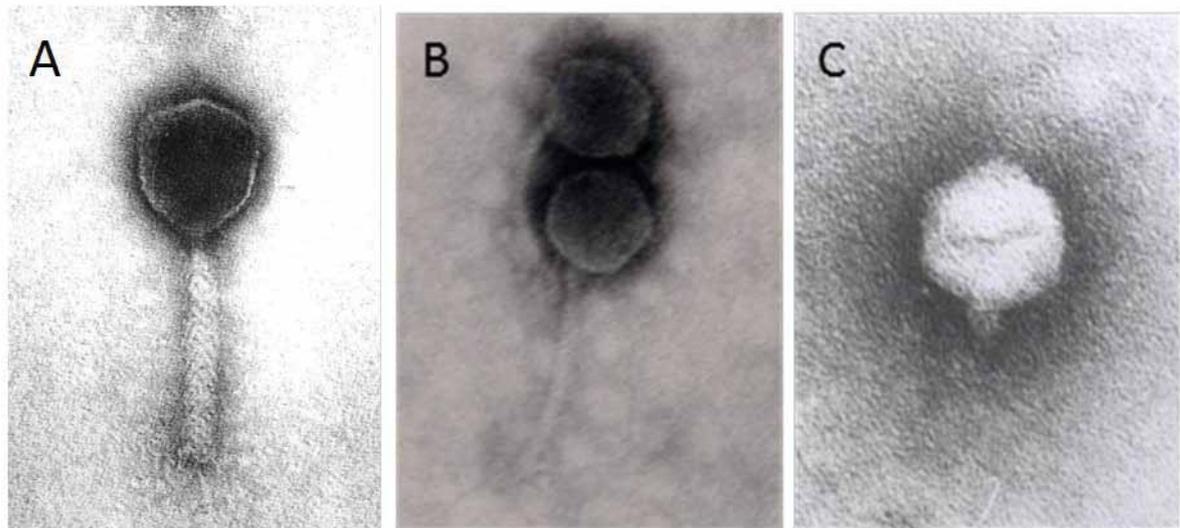


Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de fagos com cauda; a) Fago *Myoviridae* tipo-rV5 de *Salmonella enterica* Enteritidis; b) Fago *Siphoviridae* tipo-Jersey de *Salmonella enterica* Enteritidis; c) Fago *Podoviridae* tipo-T7 de *Pseudomonas fluorescens* (fagos pertencentes à coleção de bacteriófagos do Centro de Engenharia Biológica)

na sua maioria uma estrutura globular, apenas com um domínio catalítico, e portanto têm um espectro de ação mais alargado. Contudo foram recentemente descritas endolisinas de Gram-negativas modulares, constituídas por um domínio de ligação e domínio catalítico [4].

Terapia fágica

Presentemente, a terapia fágica é baseada no uso de fagos líticos para o tratamento de infeções bacterianas, nomeadamente as resistentes a antibióticos. A maioria dos testes clínicos relacionados com o uso de fagos tem sido principalmente desenvolvida em países da Europa de Leste como a Polónia, Geórgia e Rússia. Os resultados destes estudos têm-se revelado encorajadores uma vez que os fagos têm apresentado grande eficácia para um largo espectro de infeções [5].

O crescente e actual interesse dos fagos como agentes terapêuticos contra doenças infecciosas deve-se fundamentalmente ao aparecimento de bactérias com múltiplas resistências aos antibióticos. Os fagos apresentam a capacidade de lisar os hospedeiros (bactérias) utilizando mecanismos de controlo bacteriano diferente dos antibióticos e por isso são capazes de matar bactérias resistentes a antibióticos. Para além disso, apresentam características únicas que incentivam a sua utilização como alternativa ou complemento aos antibióticos. A ubiquidade no ambiente, facilidade de isolamento, elevada especificidade (não interferindo com a flora natural do paciente), ausência de toxicidade e baixo custo de produção são algumas das características que tornam a terapia fágica apelativa. Adicionalmente, os fagos promovem evoluções adaptativas através da dinâmica de interações com os seus hospedeiros pelo que o problema de resistência poderá ser facilmente ultrapassado [6].

Não obstante as evidências clínicas da eficácia dos bacteriófagos no controlo de infeções, os produtos à base de fagos encontram barreiras regulatórias que dificultam a sua transferência para o mercado [7]. O setor farmacêutico, a nível mundial, tem-se mantido resistente à mudança. Continua a

observar-se a tendência para o aumento dos custos de desenvolvimento de biofármacos, juntamente com o conseqüente declínio da taxa de aparecimento de novos produtos aprovados. Esta situação é reforçada pelos obstáculos regulatórios impostos pela União Europeia na validação de terapias não tradicionais como é o caso da terapia fágica. Existe uma clara consciência global por parte da comunidade científica, e não só, de que é urgente repensar os mecanismos reguladores para se conseguir dar uma segunda oportunidade à terapia fágica no mundo ocidental e em particular nos países da União Europeia.

Utilização de fagos na deteção e controlo de patogénicos: Exemplo do fago PVP-SE1

O fago PVP-SE1 é um fago pertencente à família *Myoviridae* (tipo -rV5) (Figura 1A). Este fago apresenta um espectro de ação muito alargado (multivalente) sendo capaz de infetar todos os serotipos de *Salmonella enterica* [8], pelo que se torna uma ferramenta robusta de deteção de *Salmonella*, em oposição aos anticorpos que apresentam elevada especificidade e baixa estabilidade para além do custo associado à sua produção ser elevado. Com efeito, a capacidade de reconhecimento dos fagos é uma das características exploradas no desenvolvimento de métodos de deteção de patogénicos, alguns deles baseados na utilização de sensores magnéticos. Os primeiros trabalhos neste domínio utilizaram fagos filamentosos, contudo o espectro de ação destes fagos é reduzido (são muito específicos, reconhecendo uma gama pequena de estirpes) o que torna limitada a aplicação desta tecnologia [9]. A utilização de fagos com espectro de ação mais alargada poderia obviar esta limitação. O fago PVP-SE1 é um excelente candidato, contudo é um fago virulento que lisa as células que reconhece, pelo que a sua utilização como bioelemento em biossensores pode ser comprometida [8]. Uma outra limitação deste fago é a sua morfologia. Neste tipo de fagos, para que haja reconhecimento, as fibras da cauda têm que estar expostas; pelo que o processo de imobilização terá que permitir que essas fibras não fiquem ocultadas. Recente-

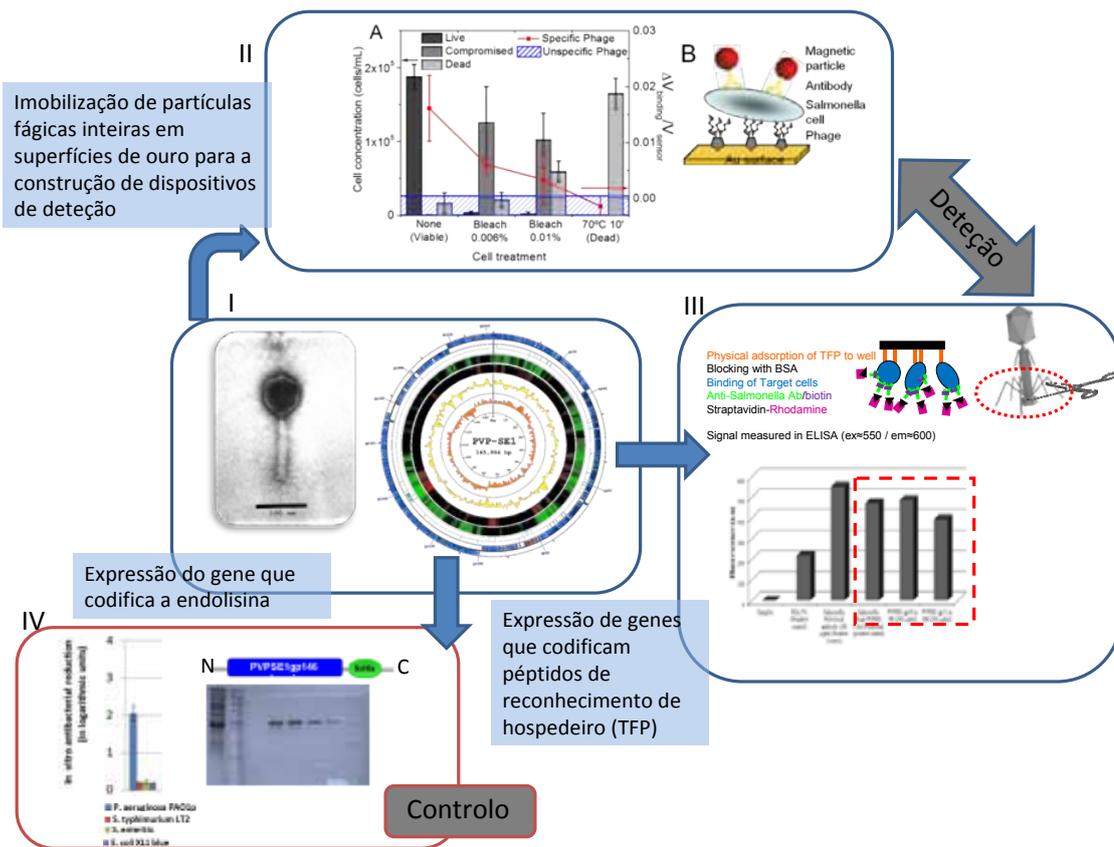


Figura 2 – Utilização de fagos no **controlo** e **deteção** de patogénicos – *Case study* fago PVP-SE1: I) Imagem TEM do fago PVP-SE1 pertencente à família Myoviridae e genoma anotado do fago com 145964 bp. II) Deteção de *Salmonella enterica* Enteritidis num biosensor MR utilizando fagos inteiros: A) Voltagem normalizada (obtida no sensor MR) de amostras de *Salmonella enterica* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos com hipoclorito e apresentando diferentes formas de viabilidade (a viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo); B) Representação esquemática do reconhecimento biomolecular utilizando uma estratégia do tipo “sandwich”, no qual o fago captura a bactéria através das fibras da cauda III) Representação esquemática do método utilizado para a deteção de *Salmonella enterica* Enteritidis utilizando um leitor de microplacas e uma estratégia ELISA, no qual são utilizadas as fibras da cauda – TFP (gp40 e gp 51) expressas em *E. coli* e imobilizadas no fundo do poço da placa. A intensidade do sinal gerado quando são utilizadas as TFP é equivalente à intensidade do sinal quando é utilizado o fago inteiro ou um anticorpo contra *Salmonella enterica* Enteritidis. IV) Resultados da atividade da endolisina do fago PVP-SE1 expressa em *E. coli* e que apresenta um peso molecular aproximado de 25 kDa.

mente o grupo de Biotecnologia de Bacteriófagos do Centro de Engenharia Biológica em colaboração com o Laboratório Ibérico de Nanotecnologia, desenvolveu uma interface de deteção de *Salmonella* utilizando o fago PVP-SE1 num biosensor magnetoresistivo (MR). O método de imobilização, assim como as condições de reconhecimento, foram optimizados de forma a que o fago tenha uma elevada eficiência de deteção sem actividade lítica. Os resultados apresentados na Figura 2.II mostram a capacidade do fago PVP-SE1 em reconhecer células viáveis não cultiváveis obtidas após tratamento com várias concentrações de hipoclorito. A intensidade do sinal de interação do fago com a bactéria é proporcional à quantidade de células viáveis. Estes resultados permitiram por um lado provar que fagos virulentos são excelentes bioelementos no reconhecimento de bactérias e por outro lado que os fagos têm a capacidade de discriminar estados de viabilidade, o que constitui uma outra mais-valia dos fagos em relação aos anticorpos na deteção de patogénicos [10].

A análise do genoma do fago PVP-SE1 (Figura 2.I) permitiu a identificação dos genes que expressam as proteínas das fibras das caudas que contêm os péptidos envolvidos no reconhecimento do hospedeiro. A caracterização funcional dos genes foi feita seguindo uma estratégia ELISA na qual gp40 e gp51 expressos heterologicamente foram imobilizados na superfície

de poços de microplacas de poliestireno (Figura 2.III). Os resultados obtidos demonstraram que gp40 e gp51 têm capacidade de se ligar a *Salmonella enterica* Enteritidis e que o sinal gerado é semelhante ao sinal gerado quando são utilizados anticorpos específicos. Por conseguinte, as proteínas fágicas envolvidas no reconhecimento dos hospedeiros podem igualmente ser utilizadas na deteção de patogénicos [11].

O fago PVP-SE1, tal como todos os fagos virulentos da família Myoviridae, codifica um mecanismo de lise do hospedeiro baseado num sistema holina-endolisina. A endolisina deste fago, ao contrário da generalidade das endolisinas de fagos que atuam em bactérias Gram-negativas, tem uma estrutura modular [12]. Com efeito, a endolisina PVP-SE1gp146 apresenta no terminal N um domínio de ligação à parede celular e no terminal C um domínio catalítico. As endolisinas, como foi referido acima, hidrolisam o peptidoglicano e por isso têm uma aplicação óbvia e direta no controlo de bactérias Gram-positivas. Já existe um conjunto alargado de endolisinas para o controlo de várias espécies de bactérias Gram-negativas [13]. Nestas bactérias o fenómeno de “lise a partir do exterior” por endolisinas é impedido pela membrana externa pelo que o estudo destas enzimas em bactérias Gram-negativas é limitado. Contudo a associação de endolisinas com permeabilizantes de membrana celular permite

uma eficiente lise celular. No caso particular da Lys-PVP-SE1gp146 consegue-se obter 2 ciclos de redução logarítmica de *P. aeruginosa* após 10 minutos de ação da endolisina em associação com EDTA.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Os fagos, em consequência das suas propriedades, constituem uma alternativa promissora à antibioterapia. A terapia fágica praticada nalguns países tem revelado resultados auspiciosos e a necessidade de se desenvolver mecanismos eficientes de controlo de doenças infecciosas resistentes a antibióticos tem impulsionado e estimulado a investigação dos fagos como agentes antibacterianos. Existem no entanto preocupações ao nível da segurança dos fagos que têm sido aproveitadas pelas entidades reguladoras para protelar a regulamentação desta prática terapêutica. As preocupações assentam no rápido desenvolvimento de resistência aos fagos por parte das bactérias (por exemplo *P. aeruginosa* desenvolve fenótipos resistentes após 24h de interação com fagos [14]) e na possibilidade do genoma dos fagos codificar toxinas. Embora as sequências genéticas dos fagos atualmente usados em terapia sejam conhecidas, a verdade é que se desconhece a função de mais de 30% dos genes presentes em cada genoma. Acredita-se que a terapia fágica é segura e os defensores dessa prática justificam essa segurança pela ubiquidade dos fagos no organismo humano saudável. Foi recentemente publicado um artigo na *Nature News* que refere que a mucosa humana está colonizada por fagos que a protegem contra a invasão bacteriana [15].

Enquanto se assiste à “discussão” entre os defensores e opositores da terapia fágica e à inércia das entidades reguladoras, a comunidade científica tem procurado nos fagos outras soluções alternativas para o controlo de infeções. São exemplo disso a expressão heteróloga de endolisinas quiméricas com actividade catalítica melhorada, maior estabilidade e capazes de atuar em bactérias Gram-negativas sem ação de agentes permeabilizantes e também o desenvolvimento de fagos quiméricos que expressem múltiplos péptidos de reconhecimento, evitando assim o rápido desenvolvimento de resistências, e cujo genoma contenha apenas proteínas estruturais e essenciais para a replicação do fago e lise do hospedeiro. Paralelamente, o potencial de reconhecimento dos fagos é imenso e a sua utilização nas mais variadas plataformas de deteção de patogénicos já validadas com a utilização de anticorpos, enzimas ou ADN como bioelementos apresenta um excelente potencial tecnológico. Dada a elevada especificidade dos fagos, todas estas aplicações visam o desenvolvimento de soluções de diagnóstico e terapêuticas dirigidas ao agente patogénico que causa infecção e por isso preconizam terapias personalizadas. Estima-se que existam 10^{31} [16] partículas fágicas no planeta o que faz dos fagos as entidades mais abundantes na Natureza, constituindo por isso uma fonte inesgotável de material biológico que pode ser explorada para o desenvolvimento de produtos com aplicação na saúde e em particular na prestação de cuidados de saúde personalizados, um dos desafios sociais preconizados na agenda do Horizonte 2020.

Agradecimentos

Este artigo apresenta trabalho científico desenvolvido nos últimos dois anos pelo Grupo de Biotecnologia de Bacteriófagos (BBiG; www.ceb.uminho.pt/bbig/) do Centro de Engenharia Biológica em colaboração com o Laboratório Ibérico de Nanotecnologia (INL) e a Universidade Católica de Leuven (KUL). Agradeço ao Prof. Paulo Freitas e à Dra. Verónica Romão do INL que tiveram um papel determinante na construção das ferramentas de deteção e ao Dr. Rob Lavigne da KUL que apoiou os estudos relacionados com as endolisinas. Por fim, agradeço à minha equipa, constituída por excelentes investigadores extremamente motivados e criativos a quem devo o reconhecimento internacional que o grupo tem atualmente.

Referências

- [1] Rohwer, F., Edwards, R. (2002) The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *J Bacteriology*. 184, 4529-4535.
- [2] H.-W. Ackermann, (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*. 152 (2), 227-243.
- [3] Leiman, P.G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Rossmann, M.G. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 60(11), 2356-2370.
- [4] Oliveira, H., Melo, L.D.R., Santos, S.B., Nóbrega, F.L., Ferreira, E.C., Cerca, N., Azeredo, J., Kluskens, L.D. (2013) Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of Virology*, 87(8), 4558-70.
- [5] Abedon, S., Kuhl, S., Blasdel, B., Kutter, E. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1, 66-85.
- [6] Kropinski, A. (2006). Phage therapy – everything old is new again. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 297-306.
- [7] Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vanechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., Van den Mooter, G., Buckling, A., Debarbieux, L., Pouillot, F., Azeredo, J., Kutter, E., Dublanche, A., Górski, A., Adamia, R. (2011) The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharmaceutical Research*. 28(4), 937-937.
- [8] Santos, S., Kropinski, A.M., Ceysens, P.-J., Ackermann, H.W., Villegas, A., Carvalho, C.M., Lavigne, R., Krylov, V.N., Ferreira, E.C., Azeredo, J. (2011) Genomic and proteomic characterization of the broad host range *Salmonella* phage PVP-SE1 - The creation of a new phage genus. *Journal of Virology*, 85(21), 11265-11273.
- [9] Singh, A., Somayyeh, P., Evoy, S. (2013) Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection. *Sensors (Basel)*, 13(2), 1763-1786.
- [10] Fernandes, E., Martins V.C. Nóbrega, C., Carvalho, C.M., Cardoso, F.A., Cardoso, S., Dias, J., Deng, D., Kluskens, L.K., Freitas, P.P., Azeredo, J. (2014) A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 239-246, 2014.
- [11] Azeredo, J., Fernandes, E., Santos, S., Kluskens, L., Silva, S., Lavigne, R., Cornelissen, A., Vandersteegen, L. “Peptides and derivatives thereof for detection and control of *Salmonella*. WO 2013/02442159545, 2013
- [12] Walmagh, M., Briers, Y., Santos, S. B., Azeredo, J., Lavigne, R. (2012) Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP_201φ2-1 and PVP-SE1. *PlosOne*, 7, 1-10.
- [13] Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., & Fischetti, V. A. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 111-117.
- [14] Pires, D.P., Silva, S., Almeida, C., Henriques, M., Andeson, E.M., Lam, J.S., Silankorva, S., Azeredo, J. (2013) Evaluation of the ability of *C. albicans* to form biofilm in the presence of phage-resistant phenotypes of *P. aeruginosa*. *Biofouling*, 29 (10), 1169-1180.
- [15] Ed Yong. (2013) Viruses in the gut protect from infection Phages in mucus aid immune system by killing invading bacteria. *Nature News*, 20 May, 2013.
- [16] Wommack, K.E., Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 69-114.