



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENDODONTIA

BACTERIÓFAGOS EM ODONTOLOGIA – UMA REVISÃO DA LITERATURA

ALUNO: MATEUS TEIXEIRA TORRES
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENDODONTIA**

BACTERIÓFAGOS EM ODONTOLOGIA – UMA REVISÃO DA LITERATURA

Trabalho de Conclusão de Curso
do Programa de Pós-Graduação
em Endodontia da Faculdade de
ODONTOLOGIA da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como requisito para a obtenção
do grau **Especialista em
endodontia.**

**ALUNO: MATEUS TEIXEIRA TORRES
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de complementar minha formação com esta especialização que muito agregou no meu crescimento pessoal.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor José Antônio Poli de Figueiredo pelos ensinamentos que vou com toda certeza levar para toda vida, seguindo seus passos neste ofício da odontologia.

Agradeço a todos os membros da equipe do Programa de Pós-Graduação em Endodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que são exemplares em suas condutas éticas e profissionais com todo o grupo de alunos sempre nos tratando com respeito e espírito de coleguismo.

Índice

	Lista de abreviaturas	5
	Lista de figuras	6
	Resumo e Palavras-chave	7
	Abstract and Keywords	9
1	Histórico	10
2	Cárie dentária e tratamento endodôntico	10
3	Biofilme	11
4	Tratamento do biofilme	12
5	Enterococcus faecalis	13
6	Bacteriófagos	14
7	População de fagos na cavidade oral	16
8	Biologia dos bacteriófagos	16
9	Mecanismos de ação	19
10	Vantagens e desvantagens dos bacteriófagos	21
11	Lisinas	22
12	Uso terapêutico dos fagos	23
13	Exemplos específicos de bacteriófagos	23
14	Conclusões e perspectivas futuras	26
15	Bibliografia	27

LISTA DE ABREVEATURAS

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fagos – bacteriófagos

Fig - figura

mL – mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

SPEC - substância polimérica extra-celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alternativas de tratamento do biofilme

Figura 2 – Estrutura e composição dos bacteriófagos

Figura 3 – Ciclos de reprodução dos bacteriófagos

Figura 4 – Fago infectando uma célula hospedeira de *E. coli*

RESUMO

INTRODUÇÃO: Um dos principais objetivos da terapêutica endodôntica é representado pela desinfecção do sistema radicular visando a eliminação de microrganismos, em especial as bactérias, que encontram no sistema de canais radiculares e de túbulos dentinários um ambiente propício para proliferação e estabelecimento sob a forma de biofilme. Constitui preocupação constante a crescente resistência bacteriana pela prescrição indiscriminada de antibióticos, prática comum entre dentistas e médicos. Alternativas para esse problema tem sido estudadas, entre as quais antigas opções, como os bacteriófagos.

BACTERIÓFAGOS: Os bacteriófagos são um grupo de vírus com a capacidade de destruição de bactérias específicas, também conhecidos como “comedores de bactérias”. A utilização dos bacteriófagos, de forma aditiva aos tratamentos convencionais (como o uso de antibióticos) ou até mesmo substitutiva, vem sendo estudada na odontologia, ainda de maneira incipiente. Apesar do grande interesse, ainda hoje a prática dos bacteriófagos carece de apoio científico mais contundente pois ainda há falta de dados que comprovem sua eficácia e segurança. Entre suas características peculiares, em 96% dos casos, são caudados e possuem uma dupla fita de DNA e o número de genes pode variar de 4 a várias centenas. Os fagos multiplicam-se através de dois mecanismos alternativos: o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico. Estes vírus agem através do reconhecimento de receptores específicos nas paredes celulares de bactérias e injetando seu DNA através de uma ligação nestes sítios. A terapia de *fagos* (também chamada de terapia lítica) objetiva a utilização de um tratamento considerado “personalizado” com a administração de um bacteriófago específico, adaptado após isolamento e identificação do patógeno o qual se deseja combater ou ainda como um *cocktail* composto por várias cepas diferentes de *fagos* visando uma ou mais espécies bacterianas patogênicas. Para a Endodontia, o isolamento de bacteriófagos líticos específicos para cepas anaeróbicas pode constituir potente modalidade terapêutica. **CONCLUSÕES:** Pesquisas direcionadas ao seu espectro de ação, farmacodinâmica e citotoxicidade são necessárias. Impulsionados pela crescente resistência bacteriana ao uso disseminado de antibióticos há cerca de um século, os fagos constituem uma alternativa a ser

valorizada pelos estudos para que o uso clínico consciente possa ser um dia alcançado.

PALAVRAS-CHAVE: endodontia; bacteriófagos; Enterococcus.

ABSTRACT

INTRODUCTION: One of the main purposes of endodontics therapy is to provide root canal disinfection with elimination of every microorganism, mainly bacteria, which find both in root canal system and dentinal tubules a good proliferation environment and biofilm setting. Bacteria resistance is a sustained concern by dentistry, growing up by indiscriminate antibiotics prescription all over the world by dentists and medical doctors. Alternatives to this issue have been studied, among which rise old options, like bacteriophage, or simply phage, use.

BACTERIOPHAGE: It is constituted by a group of viruses with the capacity of specific bacteria elimination, for which they are also called “bacteria eaters”. The use of bacteriophage, in addition to conventional treatment (like antibiotics use), or even substitutivity, is being studied in odontology. Bacteriophage practice, despite rising interest, lacks solid scientific support yet because it still needs strong data supporting its efficacy and safety. Among its features, in 96% of cases, they are tailed and have double DNA strand. Their number of genes may vary from 4 to several hundreds. They multiply through two alternative mechanisms: lytic cycle or a lysogenic cycle. These viruses act by specific bacteria cell wall recognition and by injecting their DNA through attachment to these walls. Phage therapy (also known as lytic therapy) aims to use a customized treatment with administration of specific phage, adjusted after pathogen isolation and identification or even with a “cocktail” formed by numerous different phage strains towards one or more than one pathogenic bacteria. To endodontics, specific anaerobic strain lytic bacteriophage isolation may represent a strong therapeutic method. **CONCLUSIONS:** Research towards its action range, pharmacodynamics and cytotoxicity are required. Driven by a growing bacterial resistance reality caused by indiscriminate antibiotics use throughout one century of experience, bacteriophage is a valuable alternative to be considered by new studies so that its use may be one day reached.

KEYWORDS: endodontics; bacteriophage; enterococci.

1. HISTÓRICO

A descoberta da utilização dos bacteriófagos (também chamados de *fagos*) na medicina data de 1919, ano no qual foi descrita por Twort e D'Herelle, logo após a Primeira Guerra Mundial. [1,13,18] Esta descoberta precede em cerca de uma década o desenvolvimento dos próprios antibióticos.[1] A descoberta dos antibióticos, logo se difundiu mundialmente, o que provocou uma interrupção das pesquisas com os *fagos*. [13] Mesmo assim a utilização dos *fagos* ainda foi mantida durante o século XX na Polônia e na antiga União Soviética. [1,5,18] A primeira publicação científica data de 1933. [13] Os pesquisadores conhecidos pelos estudos no campo dos *fagos* que mais se destacaram foram Max Delbrück (vencedor do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1969), James Watson e Francis Crick. [18]

No Brasil, a prática do uso de bacteriófagos foi registrada no ano de 1924, pelo Instituto Oswaldo Cruz, com a produção de 10.000 frascos de *fagos* contra a disenteria enviados para todo nosso país. [19]

Em 1977 Brady e colaboradores observaram partículas semelhantes a vírus utilizando a microscopia eletrônica na placa dentária, demonstrando a possibilidade de isolar estes micro-organismos e sua possível ação na cavidade oral.[9] Em 2003 foram identificados fagos na saliva contra o *Enterococcus faecalis* [10] seguidos pela identificação de fagos contra a *Fusobacterium nucleatum*. [11]

2. CÁRIE DENTÁRIA E TRATAMENTO ENDODÔNTICO

As cáries dentárias afetam 91% da população mundial. A doença periodontal, por sua vez, conta com a prevalência de 46% no mundo.[5] Quando não devidamente identificada e corretamente tratada a lesão cariosa pode evoluir para o acometimento do sistema de canais radiculares. O tratamento desta evolução constitui o escopo da atividade endodôntica odontológica. Um dos principais objetivos da terapêutica endodôntica é representado pela desinfecção deste sistema radicular. [13] Estudos recentes evidenciaram que os micro-organismos e seus subprodutos são os agentes causadores primários da necrose pulpar e da lesão periapical. Nestas infecções, muitas vezes são observados mais de um microrganismo, característica das infecções

polimicrobianas. [13] Um dos passos do tratamento endodôntico visa a eliminação deste ou destes microrganismos, denominada etapa da desinfecção radicular. O uso frequente, mas não exclusivo, dos antibióticos representa papel adjuvante nesta etapa [13]. A resistência a estes antimicrobianos representa um desafio moderno, tendo em vista a crescente resistência bacteriana aos mesmos observada em diversos estudos e na prática clínica. [13] Uma possível causa desta complicação é aventada pela prescrição indiscriminada de antibióticos, prática comum entre dentistas e médicos. [13]

No tratamento endodôntico, algumas vezes o uso dos antibióticos, principalmente em casos onde há esta resistência bacteriana aos mesmos, encontramos algumas bactérias em especial, como os *Enterococcus* (resistentes a Clindamicina, Penicilina Estreptomicina e Sulfa tripla) [14], *Klebsiella pneumoniae* (resistentes a Penicilina e Penicilina com Eritromicina) [15] e ainda bacilos entéricos Gram-negativos. [13]

A dificuldade de eliminar estes germes nestes quadros de resistência bacteriana aos antibióticos, favorece a colonização do ápice e periápice dentário, o que interfere indubitavelmente no processo de reparação óssea. [13]

Outro fator a ser considerado associado à dificuldade da desinfecção radicular no tratamento endodôntico, refere-se ao tamanho inicial da lesão. Lesões maiores apresentam uma taxa mais baixa de cura. [13]

3. BIOFILME

Os micro-organismos habitam no corpo humano, de maneira semelhante à qual na maioria dos outros habitats na natureza, na forma dos chamados *biofilmes*. O biofilme é constituído por agregados de ligações de superfície embebidos em uma matriz de substância polimerizada extracelular. Por sua vez, esta matriz é constituída por polissacarídeos, proteínas estruturais, enzimas, DNA, lipídeos e água.[5] A função do biofilme para seus componentes constitucionais é a de promover uma espécie de proteção contra as adversidades do meio externo, permitindo aos mesmos uma colonização mais duradoura. Neste sentido, o biofilme serve como um escudo para estes micro-organismos que também atuam de forma sinérgica por interações como

o compartilhamento de enzimas extracelulares, alimentação cruzada e proteção cruzada.[5] Existe em geral uma homeostase entre o biofilme e o hospedeiro associado, como encontrado na cavidade oral, trato gastrointestinal ou vagina, já que a flora comensal, representada nesta situação pelos micro-organismos organizados no biofilme, impede a colonização por outros germes patógenos, promovendo nutrientes ao hospedeiro e influenciando positivamente o sistema imune.[5,6]

Algumas situações, como influências de fatores genéticos ou em mudanças ambientais no hospedeiro, podem modificar este funcionamento simbiótico entre ambos, promovendo infecções associadas causalmente ao próprio biofilme, sendo assim denominado de *Biofilme Disbiótico*. Elas costumam ser persistentes e, portanto, difíceis de serem prevenidas e tratadas.[5] A matriz do biofilme promove a capacidade de diminuir nesta modalidade de coexistência, a penetração dos agentes antibacterianos, reforçando desta forma a manutenção da ação patogênica do biofilme.[5] Os biofilmes patogênicos podem colonizar partes do corpo ou até mesmo dispositivos protéticos, normalmente estéreis, como válvulas cardíacas.[5]

O biofilme oral é o mais frequente responsável por infecções polimicrobianas no corpo humano. As bactérias orais, *archaea*, vírus, fungos e protozoários, geralmente controlados pelo fluxo salivar, pelas defesas imunológicas do hospedeiro e pelas medidas de higiene oral cotidianas, podem prosperar dentro dos biofilmes orais.[5] Alguns fatores envolvidos na progressão do biofilme oral em homeostase na direção da disbiose, ou seja, da patologia oral, são fatores ambientais como dietas ricas em carboidratos, tabagismo, quimio ou radioterapia e ainda fatores genéticos específicos.[5] As cáries dentárias, doenças periodontais, e periimplantites são exemplos finais desta disbiose.

4. TRATAMENTO DO BIOFILME

Os biofilmes disbióticos podem ser removidos de forma mecânica pela utilização de escovas dentárias, ultrassom, curetas ou fio dental. Podem ser também combatidos pelo uso de antissépticos orais e algumas vezes, pelo uso de antibióticos.[5]

Além disto a proposta da utilização dos fagos representa uma alternativa viável no tratamento do biofilme conforme demonstrado na figura 1.

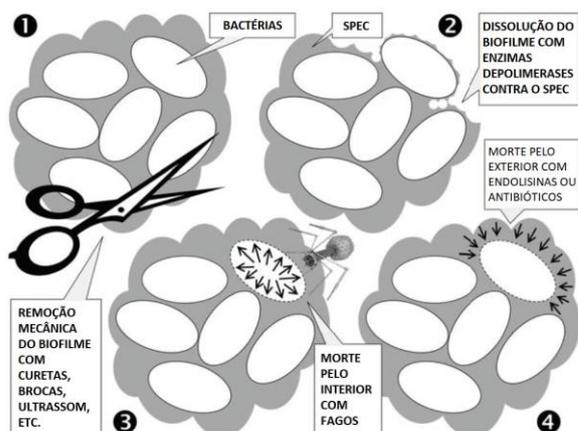


Figura 1 - Alternativas de tratamento do biofilme. SPEC: substância polimérica extra-celular. [12]

5. ENTEROCOCCUS FAECALIS

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria GRAM-positiva que compõe a flora normal da cavidade oral, do intestino e do trato vaginal dos seres humanos e de alguns animais. Por ser um achado frequente nas patologias endodônticas a terapêutica medicamentosa deve ser direcionada à sua eliminação. Na maioria das vezes, entretanto, o *E. faecalis* pode sobreviver no biofilme da superfície do túbulo dentinário ou em grânulos combinados com outras bactérias anaeróbias ou facultativas, o que dificulta o êxito deste tratamento. Esta dificuldade é bem observada no crescente número de achados de resistência aos antibióticos previamente utilizados assumindo assim importância global em saúde pública.[4]

Além disto, ele também está relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas, relacionados aos tratamentos endodônticos malsucedidos. [13] Esta bactéria tem uma especial característica de conseguir sobreviver em forma de monoinfecção no interior dos túbulos dentinários, o que pode por sua vez, estar relacionado a reinfecções de um canal radicular previamente obturado [13,16].

6. BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos são um grupo de vírus com a capacidade de destruição de bactérias específicas. Também são conhecidos como “comedores de bactérias”. [18] Pesquisas recentes apontam para uma virulência associada aos bacteriófagos maior quando em ação contra células *in vivo* que *in vitro*. [18]

Os bacteriófagos são encontrados na cavidade oral a exemplo dos fagos para *Lactobacillus*, que são bactérias conhecidas pelo seu envolvimento da gênese das cáries dentárias, mas que podem também apresentar uma relação no desenvolvimento de infecções orofaríngeas. [13] Na verdade, a cavidade oral é considerada como um dos melhores locais para a propagação dos fagos, devido à complexidade de sua microflora, temperatura em torno de 37^o *celsius* e consistência semi-sólida da placa bacteriana na superfície dentária. [13]

Em pesquisas médicas, os fagos foram atribuídos, por exemplo ao tratamento de infecções por *Escherichia coli* em estudos experimentais com bezerros. Fagos obtidos em água de esgoto foram altamente capazes na eliminação de diferentes cepas desta bactéria, tanto *in vivo* como *in vitro*. [17] Outro exemplo do uso na terapêutica médica foi descrito por Cislo e colaboradores [18] no qual o uso dos fagos contra *Pseudomona sp*, *Staphylococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp* e *Escherichia sp* de infecções dermatológicas obteve excelente efeito terapêutico [13]. Finalmente também foi descrito o uso dos fagos em infecções do trato urinário, sendo estas infecções extremamente prevalentes. A efetividade do uso de fagos nestes casos foi de 92% na prática clínica. [13]

A utilização dos bacteriófagos, de forma aditiva aos tratamentos convencionais (como o uso de antibióticos) ou até mesmo substitutiva, vem sendo estudada e advogada cada vez mais na odontologia.[1] Um dos fundamentos que justifica a necessidade deste tipo de tratamento alternativo, do ponto de vista farmacológico e clínico, se traduz pela crescente observação da resistência bacteriana no mundo, atribuindo um alto valor para pesquisas como estas. [1,2,5]

De uma forma geral, a utilização dos bacteriófagos pode ser associada a três principais indicações: (1) combater infecções por bactérias já resistentes aos antibióticos comuns; (2) na tentativa de combater infecções resistentes a antibióticos, apesar de sensibilidade positiva em testes culturais, pela dificuldade de acesso destes

antibióticos aos sítios infecciosos com má vascularização, como nos casos de osteomielite, úlceras diabéticas ou no caso da formação do biofilme; e (3) em casos de contraindicações ao uso de antibióticos, como nos casos de hipersensibilidade do paciente, problemas do trato gastrointestinal ou risco de infecções por *Clostridium difficile*. [18]

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a resistência bacteriana constitui um processo natural de evolução que não pode ser parado, mas desacelerado pelo desenvolvimento de novos antibióticos ou técnicas alternativas mais específicas.[3] Atribui-se cerca de metade dos esforços científicos de pesquisa direcionada a alternativas ao uso dos antibióticos aos bacteriófagos, incluindo tipos selvagens, desenvolvidos por técnicas de engenharia genética ou ainda os *fagos* de enzimas líticas, conhecidos como *Lisinas*. [5]

Um estudo realizado por Ly e colaboradores, em 2014, demonstrou que existem diferenças de prevalência dos fagos na cavidade oral de um indivíduo sadio e de um com patologia periodontal. Em geral, na cavidade oral sadia predominam os fagos da família *Syphoviridae*, com atividade predominantemente lítica, o que é atribuído ao equilíbrio da flora saudável pela eliminação das bactérias responsáveis pela formação da placa bacteriana. Já nos indivíduos onde esta placa é encontrada mais facilmente, os fagos da família *Myoviridae*, são os mais encontrados. Interessante e desconcertante, é o fato de que eles também têm ação lítica predominante.[8]

Apesar do grande interesse, ainda hoje a prática dos bacteriófagos carece de apoio científico mais contundente, uma vez que, mesmo com ensaios clínicos em humanos tendo sido publicados, ainda há falta de dados que comprovem sua eficácia e segurança.[1] Exemplos de indicação do uso, entretanto, são as infecções de úlceras de pele, infecções purulentas, *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), profilaxia em feridas, queimaduras, infecções de difícil acesso, infecções do trato respiratório, infecções do trato urogenital e sepse. [18]

7. POPULAÇÃO DE FAGOS NA CAVIDADE ORAL

Os fagos estão presentes naturalmente em alimentos consumidos, água potável, água de oceanos, rios e no trato gastrointestinal de seres humanos. [13] Na biosfera de nosso planeta estima-se que existam em torno de 10³¹ bacteriófagos. [18]

Podemos encontrar aproximadamente 10⁸ partículas semelhantes a vírus em cada mL de saliva no homem e 10¹⁰ em cada grama de placa dentária.[5] A maioria dos bacteriófagos neste ambiente são do tipo *Temperados* e coexistem com as bactérias nas quais habitam.[5]

Existem, entretanto, na literatura um número pequeno de trabalhos sobre o isolamento de fagos na cavidade oral. [13]

8. BIOLOGIA DOS BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos são vírus com a capacidade de se tornarem predatórios a organismos procariontes. Em 96% dos casos, são caudados e possuem uma dupla fita de DNA e o número de genes pode variar de 4 a várias centenas.[5, 18,20] São formados por **cabeça** (também denominada *capsídeo* ou *casca de proteína*, que abriga o conteúdo genético viral), **pescoço** (conector entre a cabeça e a cauda), **cauda** (estrutura tubular que permite a passagem do DNA quando em contato com a superfície da bactéria alvo), **fibras da cauda** (proteínas com a capacidade de ligação com a superfície das bactérias alvo) e **placa final** (contendo pinos para penetrar na membrana e liberação do material genético do fago dentro da bactéria alvo) (Fig. 2). [18]

São divididos em 3 famílias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*. [5]

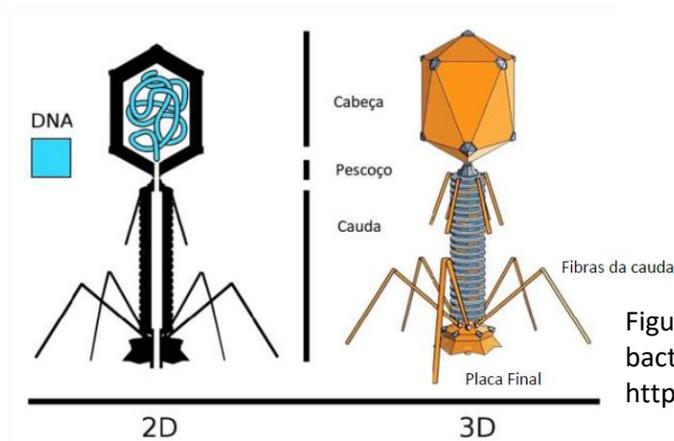


Figura 2 – Estrutura e composição dos bacteriófagos (modificado de Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage>)

Os bacteriófagos possuem uma propriedade biológica característica de não infectarem células eucarióticas por causa de grandes diferenças moleculares externa e internamente. [13]

Sua principal vantagem, quando comparados aos agentes quimioterápicos consiste na grande capacidade de replicação. [13]

Os fagos multiplicam-se através de dois mecanismos alternativos: o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico. O primeiro termina com a ruptura bacteriana (lise) e consequente morte desta célula hospedeira. Já no segundo os fagos se replicam, mas não rompem a parede celular da bactéria e permanecem por um tempo indeterminado dentro da mesma. [13,18,21] Os bacteriófagos de interesse no uso odontológico são os que se replicam com ciclo lítico. [18]

O ciclo lítico pode ser descrito em 5 fases (Fig. 3). São elas:

- fase 1: **fase de fixação** – ligação das proteínas da cauda com receptores de superfície na bactéria alvo.
- fase 2: **fase de injeção do material genético** – injeção do DNA do bacteriófago pela cauda dentro da bactéria.
- fase 3: **fase de replicação do DNA do fago** – replicação do DNA, síntese de proteínas e formação de novos capsídeos.
- fase 4: **fase de reunião e montagem** – preenchimento dos capsídeos com material genético e partículas fágicas
- fase 5: **fase de lise bacteriana** – ruptura da membrana plasmática da bactéria e de sua parede celular pelo aumento da permeabilidade com resultante

passagem excessiva de líquidos e expansão até a explosão dela, liberando os novos neoformados bacteriófagos, capazes de infectar as bactérias próximas. [18]

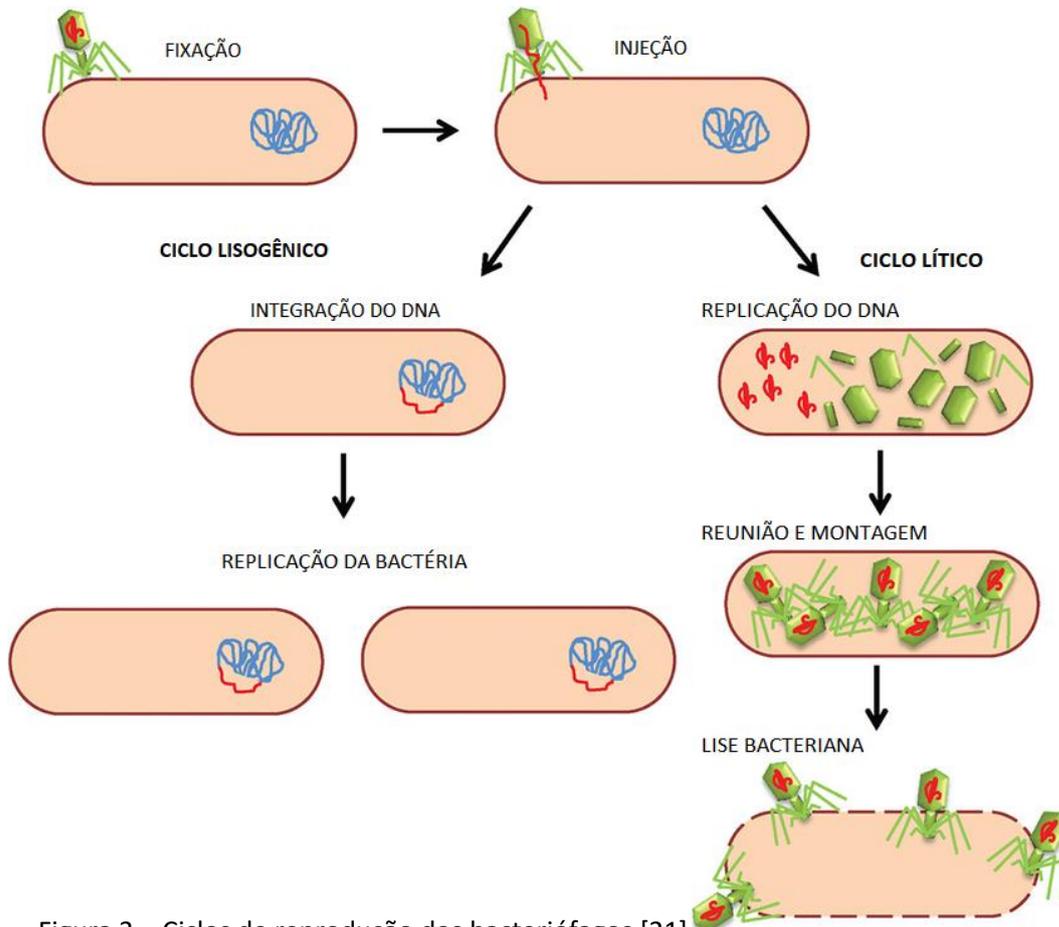


Figura 3 – Ciclos de reprodução dos bacteriófagos [21]

Outra propriedade biológica especial dos fagos está relacionada ao seu tamanho. Eles possuem dimensões bem menores que as bactérias. Por este motivo, podem penetrar facilmente os túbulos dentinários em casos de infecções endodônticas. [13]

9. MECANISMOS DE AÇÃO

Estes vírus agem através do reconhecimento de receptores específicos nas paredes celulares de bactérias e injetando seu DNA através de uma ligação nestes sítios (Fig. 4). Uma vez dentro do citoplasma da bactéria, eles utilizam as organelas e compostos da célula na replicação de seu material genético. Após a replicação cada dupla fita resultante se organiza novamente em uma estrutura *fagos* e rompem a célula liberando estes recém-formados e destruindo a célula hospedeira. São formadas cerca de 100 novas cópias de um *fago* a cada ciclo. Quando este mecanismo ocorre, são denominados de *Fagos Estritamente Líticos* ou *Fagos Virulentos*.

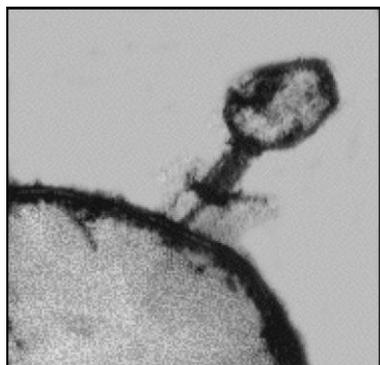


Figura 4 – Fago infectando uma célula hospedeira de *E. coli*
(<http://www.dform.com/projects/t4/virus.html>)

Outro comportamento descrito também ocorre quando o *fago* integra seu DNA, uma vez dentro da célula bacteriana hospedeira, em um dos cromossomos desta, permanecendo de forma “dormente”, chamada de *profago* por um tempo indeterminado. Reproduzem-se neste estado, através do ciclo lisogênico. Quando isto ocorre, são chamados de ***Fagos Temperados***. Estímulos como dano no DNA podem, entretanto, induzir um *Fago Temperado* a comportar-se como um *Fago Lítico* destruindo a célula na qual está incorporado.[5]

A terapia de *fagos* (também chamada de terapia lítica) objetiva a utilização de um tratamento considerado “personalizado” com a administração de um bacteriófago específico, adaptado após isolamento e identificação do patógeno o qual se deseja combater ou ainda como um *cocktail* composto por várias cepas diferentes de *fagos* visando uma ou mais espécies bacterianas patogênicas.[1]

Esta terapia lítica tem chamado bastante a atenção da comunidade odontológica pela alta eficiência encontrada em pesquisas *in vitro* e em modelos animais. As lisinas podem ser codificadas em bacteriófagos e produzem efeito de lise celular nas bactérias patogênicas através de uma rápida degradação da parede celular de GRAM-positivos susceptíveis selecionados.[4] Alguns exemplos já testados são as lisinas PlyC, altamente ativas contra o biofilme formado pelo *Streptococcus pyogenes*. Ainda contra o *Staphylococcus aureus*, diversas outras lisinas já foram descritas, como CF-301, ClyH, ClyF, phi11 endolysin, SAL-2, Ply187AN-KSH3b e P128.[4] Contra o biofilme composto pelo *Streptococcus suis* existe a lisina LySMP. Contra *Streptococcus pneumoniae* as lisinas Cpl-1 e Cpl-7 se mostraram eficientes. Contra o *Streptococcus mutans* a lisina ClyR. Na busca de uma lisina capaz de demonstrar a mesma eficácia contra o *E. Faecalis* poucas lisinas demonstraram boa atividade. Entre elas ClyR e a PlySs2 são alguns exemplos. Poucos estudos, entretanto, foram executados ainda na tentativa de demonstrar a eficácia destas lisinas em modelos dentários contra o *E. Faecalis*. [4] Um estudo de 2018 publicado na revista *Viruses* tentou testar esta atividade e concluiu que a ClyR possui uma ótima atividade bactericida contra este último germe, removendo com eficácia biofilmes *in vitro* e provando ser uma boa alternativa ao tratamento com agentes antimicrobianos comuns, incluindo até mesmo ótimos resultados em cepas resistentes a antibióticos de amplo espectro como a vancomicina.[4] O *E. faecalis* também representa uma das principais causas de lesões endodônticas periapicais, devido à sua forte tolerância e capacidade de formação do biofilme que pode sobreviver a mudanças de pH, temperatura e pressão osmótica na cavidade oral. O Hidróxido de Cálcio tem sido amplamente utilizado como medicamento intracanal de rotina na tentativa de desinfecção radicular no tratamento endodôntico. A comparação entre o Hidróxido de Cálcio, a Ampicilina e a ClyR foi testada neste estudo. O ClyR obteve êxito na remoção de mais de 90% de bactérias viáveis no biofilme com uma dose de 50 microgramas/mL, resultado este que superou o da Ampicilina e equiparou-se ao Hidróxido de Cálcio. [4]

10. VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS BACTERIÓFAGOS

Os *fagos* possuem uma variedade estreita de hospedeiros-alvo. São geralmente específicos a pequenos grupos de bactérias de uma espécie. [5,13,18] Em contraste com a ampla gama de espectro dos antibióticos, não afetando a flora normal de uma parte específica do corpo, como a cavidade oral. Quando há uma necessidade de maior alcance, a alternativa precisa ser uma mistura de diferentes tipos de *Fagos*, chamada de Cocktail.[5]

De maneira sucinta são aceitas no meio científico as seguintes vantagens atribuídas aos fagos: (a) sua administração pode ser feita em dose única, uma vez que seu ciclo reprodutivo utiliza a própria bactéria hospedeira e permanecem na região enquanto existir infecção por esta (contrastando com as múltiplas tomadas posológicas dos antibióticos); (b) não produzem efeitos adversos paralelos indesejáveis como a eliminação das bactérias comensais à cavidade oral, não gerando desequilíbrio do ecossistema como um todo (também em contraste com o uso de antibióticos, especialmente os de amplo espectro, que eliminam tanto as bactérias nocivas, alvo do tratamento, quanto diversas outras, que em algumas vezes competem com as nocivas); (c) possuem a capacidade de atenuar a virulência das bactérias após seu uso; e (d) baixo custo. [13,18]

Por outro lado, os fagos também possuem desvantagens conhecidas e que podem gerar incertezas quanto à sua utilização. Exemplo disto é o fato não se saber com certeza o quão efetiva é sua ação mesmo quando determinado contra qual organismo ela age, exemplo bem caracterizado nos casos dos fagos temperados, onde a penetração na bactéria-alvo não necessariamente está ligada à ruptura e destruição dela. [13] Também desvantajoso é o fato da necessidade de identificação prévia das bactérias as quais se deseja atingir para o isolamento de fagos específicos, fato este que não é essencial quando do uso de antibióticos. [13,18]

Algumas dificuldades também são atribuídas à terapia bacteriófágica. Entre elas podemos citar o espectro de hospedeiros bacterianos conhecidos relativamente estritos, a presença de toxinas nos lisados brutos e a eliminação rápida de partículas fágicas do sangue através do sistema reticulo endotelial pelo reconhecimento de proteínas na superfície viral pelo sistema de defesa do hospedeiro. [13]

Alguns autores enfatizam a preocupação do uso dos fagos por serem formados por uma medicação viva. Estes ressaltam, entretanto, que esta preocupação talvez possa ser atenuada quando confrontada com a realidade, por exemplo, de algumas vacinas. Estas são amplamente aceitas na comunidade científica e clínica e constituídas também por organismos vivos, alguns atenuados ou ainda partículas isoladas. [13]

11. LISINAS

As Lisinas são enzimas dos fagos capazes de digerir a parede celular bacteriana. O objetivo da ação destas enzimas é o de romper a célula hospedeira e liberar os fagos replicados internamente.[5] Elas podem ser encontradas em sua forma natural ou ainda sintetizadas por engenharia genética para aumentar a ação contra algumas bactérias potencialmente resistentes à ação destas enzimas, o que ocorre em geral, de forma rara. Sua ação costuma ser eficiente mesmo em pequenas concentrações na cavidade oral. São seguras, estáveis e relativamente fáceis de serem produzidas.[5]

Alguns estudos evidenciam ação das lisinas com potência superior à dos antibióticos em modelos experimentais de pneumonias e infecções dermatológicas.[5] Outros demonstram que podem atuar em conjunto com os mesmos, potencializando sua ação.

Algumas Lisinas não podem ser utilizadas de forma terapêutica por possuírem ação potencialmente lesiva ao organismo humano, como aumento excessivo de agregação plaquetária [5].

Entre as vantagens do uso das lisinas de bacteriófagos encontramos a capacidade de eliminação somente das bactérias susceptíveis sem alterar outros micro-organismos envolvidos na microbiota oral além da baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência [4].

12. USO TERAPÊUTICO DOS FAGOS

Os *fagos* utilizados na prática terapêutica, objetivando um tratamento específico direcionado a um germe causador de uma infecção, por exemplo, devem possuir características associadas ao êxito. São elas: possuir uma expectativa de vida longa, amplo tamanho de ruptura (número de *vírions* liberados a cada ciclo lítico) e curtos períodos eclíptico e latente (tempo decorrido entre a injeção intracelular hospedeira do material genético do *fagos* e a ruptura com a liberação dos novos *fagos*).[5]

Na odontologia, os *fagos* já foram demonstrados serem úteis na terapêutica contra as bactérias do biofilme dentário, embora esta utilização seja relativamente recente. [18] Por sua vez, as bactérias do biofilme podem, em alguns casos, formarem refúgios chamados anti-fágicos, o que permite uma coexistência de ambos, mecanismo este comparável ao da resistência bacteriana aos antibióticos e dificultando a ação terapêutica dos *fagos*. [5] A ação no biofilme dos *fagos* pode ser observada, mesmo com as adversidades, pelo enfraquecimento da estrutura deste. Quando enfrentam estratégias como os refúgios anti-fágicos, a engenharia genética lança mão de modificações estruturais capazes de penetrar nestes refúgios em alguns casos e atingir as bactérias abrigadas nele. [5]

O sistema imunológico do ser humano parece não ser afetado negativamente pelos *fagos*, graças a uma evolução adaptativa. Esta capacidade de homeostase já foi estudada em diversos ensaios clínicos. [5]

Durante o tratamento endodôntico convencional, algumas manobras rotineiras como a instrumentação dos canais radiculares e a aplicação de medicação tópica intracanal podem ser complementadas positivamente pela fagoterapia. [13]

13. EXEMPLOS ESPECÍFICOS DE BACTERIÓFAGOS

13.1 - BACTERIÓFAGOS CONTRA *ACTINOMYCES*

Actinomyces são bactérias que atuam junto aos estreptococos na formação da placa dentária. Eles podem também gerar abscessos na cavidade oral e, em alguns casos raros, formar a actinomicose, uma infecção geradora de grandes quantidades de pus tanto na cavidade oral quanto fora dela [5].

Já foram descritos 87 fagos diferentes com atuação contra os *Actinomyces*. Elas foram classificadas nas famílias *Siphoviridae*, *Podoviridae* e ainda um terceiro tipo, sem características específicas de nenhuma família. Os melhores exemplos destes fagos são os denominados “AV-1” e “AV 11”, associados a ações antibacterianas mais acentuadas, diminuindo a formação do biofilme e da placa [5].

13.2 - BACTERÍOFAGOS CONTRA *AGGREGATIBACTER*

A periodontite quando se manifesta de forma agressiva está muitas vezes relacionada à ação desta bactéria, que também pode ser isolada em casos de abscessos e infecções cardíacas como a endocardite bacteriana infecciosa. [5,18]

Foram identificados 37 fagos contra a *Aggregatibacter*. O papel real destes fagos em sua interação com ela permanece nebuloso e carece de estudos maiores e bem delineados. Os dois fagos desta classe mais estudados são o “Myovírus ϕ Aa” e o “Aa ϕ 23”. São bastante comuns e fáceis de serem isolados, mas a maioria são temperados e seu papel claro na patogênese oral ainda é desconhecido. [5,18]

13.3 - BACTERÍOFAGOS CONTRA *ENTEROCOCCUS*

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria extra oral comensal que pode ser encontrada eventualmente na cavidade oral em infecções pulpares e em implantes.[5]

Existem fagos temperados e líticos descritos contra esta bactéria como o “ ϕ Ef11”, “EFDG1” e “EFLK1”. Sua ação lítica na cavidade oral já foi bem observada e descrita.[5]

13.4 - BACTERÍOFAGOS CONTRA *STREPTOCOCCUS*

Os Estreptococos são os constituintes mais abundantes da flora endógena que colonizam o esmalte e tecidos moles da cavidade oral.[7] Na gênese da placa dentária algumas espécies de estreptococos como o *S. mitis*, o *S. oralis* e o *S. sanguinis* têm seu papel bem definido como colonizadores primários, bem como na formação de cáries, periodontites, abscessos e em infecções cardíacas, como os *Aggregatibacter* na endocardite bacteriana.[5]

Os fagos conhecidos contra os Estreptococos são um grupo aproximado de 50. [18] Os mais detalhadamente estudados são quatro: “e10”, “f1”, “M102/M102DL” e “ ϕ APCM01”. São *Siphovirus* estritamente líticos, ou seja, fortemente agressivos contra

esta bactéria. Diversos outros dentro deste grande grupo foram classificados, entretanto, como temperados e sua ação parece ser mais branda neste sentido.[5]

13.5 - BACTERIÓFAGOS CONTRA BACTÉRIAS ANAERÓBIAS DA CAVIDADE ORAL

As bactérias anaeróbias encontradas na cavidade oral e associadas com a formação do biofilme são as dos gêneros: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema* e *Veillonella*. [6] No total foram descritos já 31 fagos diferentes com atuação nestas. [5]

Contra as *Fusobacterium* foram isolados 2 bacteriófagos. O mais estudado, “Fn ϕ 02”, responsável por uma ação discreta na lise bacteriana. [5]

Contra as bactérias *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Tannerella*, nenhum fago específico foi encontrado ainda nas pesquisas e, conseqüentemente, na literatura. [5]

Contra o *Treponema*, apenas um fago foi identificado, denominado “ ϕ td1”.

Finalmente, contra a *Veillonella* já foram isoladas 25 espécies diferentes de fagos.

13.6 - BACTERIÓFAGOS CONTRA OUTRAS BACTÉRIAS DA CAVIDADE ORAL

Outras bactérias da cavidade oral como os *Lactobacillus*, a *Neisseria* e o *Staphylococcus* também são alvo de fagos conhecidos. [5]

14. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma vez que o completo conhecimento das possibilidades de tratamento pelos bacteriófagos ainda carece de estudos maiores, sua utilização na prática clínica endodôntica, ainda engatinha nos dias de hoje. Pesquisas direcionadas ao seu espectro de ação, farmacodinâmica e citotoxicidade são necessárias.

Nos casos de cáries dentárias, por exemplo, defende-se o uso de bacteriófagos de *Streptococcus mutans* em seu tratamento. [18] Seu uso como rotina na prática clínica ainda não foi estabelecido, mas os estudos apontam nesta direção. Em doenças periodontais também existem grandes expectativas para o desenvolvimento de bacteriófagos capazes de serem utilizados com mais segurança comprovada.

Na endodontia, estudos atuais demonstram a atividade contra o *Enterococcus faecalis* de forma promissora e contundente. [18] Na periimplantite também já existem estudos que sugerem a possibilidade de fagos que se ligam à superfície da zircônia, podendo estar relacionado ao impedimento de formação de biofilme [18,22].

Acredita-se que no futuro, casos de infecções endodônticas que não respondam aos tratamentos convencionais possam ser beneficiados pelo uso de suspensões de fagos como medicação intracanal ou ainda como substância irrigadora. [13] Alguns autores acreditam, entretanto, que enquanto existirem antibióticos disponíveis e bactérias sensíveis ao seu uso, os fagos possivelmente não alcançarão o título de terapêutica de primeira escolha. [13]

Impulsionados pela crescente resistência bacteriana ao uso disseminado de antibióticos há cerca de um século, os fagos constituem uma alternativa a ser valorizada pelos estudos para que o uso clínico consciente possa ser um dia alcançado.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. Eric Pelfrene 2016
2. McAdams, D., Wollein Waldetoft, K., Tedijanto, C., Lipsitch, M., & Brown, S. P. (2019). Resistance diagnostics as a public health tool to combat antibiotic resistance: A model-based evaluation. *PLOS Biology*, 17(5), e3000250. doi:10.1371/journal.pbio.3000250
3. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2013.
4. Li, W., Yang, H., Gong, Y., Wang, S., Li, Y., & Wei, H. (2018). Effects of a Chimeric Lysin against Planktonic and Sessile *Enterococcus faecalis* Hint at Potential Application in Endodontic Therapy. *Viruses*, 10(6), 290. doi:10.3390/v10060290
5. Szafranski, S. P., Winkel, A., & Stiesch, M. (2017). The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *Journal of Biotechnology*, 250, 29–44. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.01.002
6. He, X., McLean, J. S., Guo, L., Lux, R., & Shi, W. (2013). The social structure of microbial community involved in colonization resistance. *The ISME Journal*, 8(3), 564–574. doi:10.1038/ismej.2013.172
7. Jakubovics, N. S., Yassin, S. A., & Rickard, A. H. (2014). Community Interactions of Oral Streptococci. *Advances in Applied Microbiology*, 43–110. doi:10.1016/b978-0-12-800261-2.00002-5
8. Pinto, G., Silva, M. D., Peddey, M., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). The role of bacteriophages in periodontal health and disease. *Future Microbiology*, 11(10), 1359–1369. doi:10.2217/fmb-2016-0081
9. Brady JM, Gray WA, Caldwell MA. The electron microscopy of bacteriophage-like particles in dental plaque. *J. Dent. Res.* 56(8),991–993 (1977)
10. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 50–53 (2003)
11. Machuca P, Daille L, Vinés E, Berrocal L, Bittner M. Isolation of a novel bacteriophage specific for the periodontal pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(21), 7243–7250 (2010).
12. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des.* 2015;21(1):85-99.
13. Paisano AF, Bombana AC. Fagoterapia como alternativa no combate às infecções endodônticas. *Porto Alegre, 2010. RGO, Rev. gaúch. odontol.* (Online) vol.58 no.2:243-52.
14. Heintz CE, Deblinger R, Oliet S. Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *J Endod.* 1975 Nov;1(11):373-6.
15. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand.* 1983;41(1):19-22.
16. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001 Jul;34(5):399-405.
17. Smith, H. W., Huggins, M. B., & Shaw, K. M. (1987). The Control of Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves by Means of Bacteriophages. *Microbiology*, 133(5), 1111–1126. doi:10.1099/00221287-133-5-1111

18. Steier, L., de Oliveira, S., & de Figueiredo, J. (2019). Bacteriophages in Dentistry—State of the Art and Perspectives. *Dentistry Journal*, 7(1), 6. doi:10.3390/dj7010006
19. Chanishvili, C. Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. In *Advances in Virus Research—Part B: Bacteriophages*; Łobocka, M., Szybalski, W., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; 3–40.
20. Novik, G.; Ladutska, A.; Rakhuba, D. Bacteriophage taxonomy and classification. In *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs*; Microbiology Book Series N° 6; Formatex: Badajoz, Spain, 2017; 251–9.
21. Domingo-Calap, P., Georgel, P., & Bahram, S. (2016). Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA*, 87(3), 133–140. doi:10.1111/tan.12742
22. Hashimoto, K.; Yoshinari, M.; Matsuzaka, K.; Shiba, K.; Inoue, T. Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia. *Dent. Mater. J.* 2011, 30, 935–940.