



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Bacteriófagos, virus aliados en la guerra
bacteriana.**

Autor: Sergio López Martín

Fecha: 25/08/2020

Tutor: Esperanza Pascual Sánchez-Gijón

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Problema creciente: resistencia bacteriana a antibióticos.....	4
4.2 Una posible solución: los bacteriófagos.....	5
a. Contexto histórico.....	5
b. Biología de los bacteriófagos.....	6
c. Fagos como agentes terapéuticos.....	10
d. Tipos de terapia con fagos.....	11
e. Ventajas e inconvenientes de la fagoterapia	14
4.3. Ensayos clínicos.....	16
5. CONCLUSIONES.....	17
6. BIBLIOGRAFÍA.....	19

1. RESUMEN

El aumento de bacterias multirresistentes en los últimos años es un problema creciente para la salud pública, estimándose como primera causa de muerte en el mundo para 2050. Entre las posibles soluciones, los investigadores han puesto el foco en el tratamiento con bacteriófagos, virus que parasitan bacterias de manera muy específica provocando su lisis sin dañar las células del paciente.

Los bacteriófagos han demostrado claras evidencias de su eficacia en la eliminación bacterias *in vitro*. En este trabajo revisaremos diversas investigaciones realizadas que han proporcionado datos esperanzadores referentes al uso de cócteles de fagos, fagos asociados con terapia antibiótica y tratamiento con fagos obtenidos mediante ingeniería genética como tratamientos frente a infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

Actualmente su uso clínico en humanos está únicamente autorizado en Rusia, Georgia, Polonia y en casos de uso compasivo ya que a pesar de que existen diversos ensayos clínicos en curso, los rigurosos controles de calidad y seguridad suponen un obstáculo en su desarrollo.

Para afrontar el salto hacia su aplicación segura en clínica es necesaria la participación de una nueva industria farmacéutica y cambios legislativos que impulsen la investigación de estas terapias, en la que ya es la era post-antibiótica.

2. ABSTRACT

The increase of multi-resistant bacteria in recent years is a public health growing problem, being estimated as the first cause of death in the world by 2050. Among the possible solutions, researchers have been focusing on treatments with bacteriophages, viruses that parasitize bacteria in a very specific way causing their lysis without damaging the patient's cells.

Bacteriophages have shown clear evidence of their effectiveness in killing bacteria *in vitro*. In this work, we will review various investigations that have provided promising data using phage cocktails, phages associated with antibiotic therapy, and treatment with phages obtained by genetic engineering as treatments against infections caused by multi-resistant bacteria.

Currently, phage's clinical use in humans is only authorized in Russia, Georgia, Poland and in cases of compassionate use. Despite the fact that there are several ongoing clinical trials, the rigorous quality and safety controls are preventing its development.

To advance in its safe clinical application, the participation of a new pharmaceutical industry and legislative changes are necessary to promote the research of these therapies. This will contribute to reaching the so-called post-antibiotic era.

3. OBJETIVOS

En el presente trabajo se realizará una revisión bibliográfica de las posibles alternativas a la terapia contra bacterias multirresistentes que encontramos en el tratamiento con bacteriófagos. Se analizará su trayectoria desde el descubrimiento por D'Herelle hasta su momento presente de investigación y uso clínico, recopilando las posibles ventajas y desventajas, experiencias en casos clínicos y futuros problemas a afrontar para su desarrollo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Un problema creciente: resistencia bacteriana a antibióticos

En los últimos años se ha producido un crecimiento de las bacterias multirresistentes a antibióticos, debido a su mal uso, lo que ha provocado un gran interés en la terapia con bacteriófagos como terapia alternativa. Esta terapia, precede históricamente al uso de antibióticos frente a patologías infecciosas, pero no se ha desarrollado con tanto éxito como los antibióticos debido a su complejidad.

En 1940, 5 años después del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, Abraham y Chain aislaron y caracterizaron una enzima de *Escherichia Coli* que era capaz de hidrolizar la penicilina, lo que significó el comienzo de la lucha entre bacterias y antibióticos. Más tarde, se describieron otros mecanismos de resistencia causados por la adaptación de las bacterias a un ambiente en el que cada vez era más frecuente la presencia de antibióticos. Esta adaptación ha provocado que las posibilidades terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas se vean cada vez más limitadas, obligando a la búsqueda de nuevas alternativas en su tratamiento.

La gran capacidad que poseen las bacterias para mutar, intercambiar y adquirir material genético es una de las causas principales del rápido desarrollo de resistencias. Los mecanismos más comunes de resistencia por parte de las bacterias son: aparición de beta-lactamasas, modificación de la diana de actuación, inactivación enzimática, reducción de la permeabilidad de la membrana y mecanismos de expulsión activa. Así, las bacterias pueden ser resistentes a uno o varios grupos de antibióticos dependiendo de las mutaciones o mecanismos de resistencia adquiridos. (1)

En 2017 la OMS publicó la siguiente lista con los patógenos que causan mayores problemas de salud pública por su multirresistencia a antibióticos (2):

- **Prioridad 1: Crítica**
 - *Acinetobacterbaumannii*: resistente a carbapenémicos.
 - *Pseudomonas aeruginosa*: resistente a carbapenémicos.
 - *Enterobacteriaceae*: resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL (beta-lactamasas de espectro extendido).

- **Prioridad 2: Elevada**
 - *Enterococcus faecium*: resistente a la vancomicina.
 - *Staphylococcus aureus*: resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina.
 - *Helicobacter pylori*: resistente a la claritromicina.
 - *Campylobacter spp*: resistente a las fluoroquinolonas.
 - *Salmonellae*: resistente a las fluoroquinolonas.
 - *Neisseria gonorrhoeae*: resistente a la cefalosporina y a fluoroquinolonas.

- **Prioridad 3: Media**
 - *Streptococcus pneumoniae*: sin sensibilidad a la penicilina.
 - *Haemophilus influenzae*: resistente a la ampicilina.
 - *Shigella spp* : resistente a las fluoroquinolonas.

El rápido avance de las bacterias multirresistentes debido a un abuso de antibióticos convierte la concienciación sobre su uso racional en una prioridad para organizaciones sanitarias como la OMS, CDC, etc. Este uso racional se fundamenta en:

1. La utilización de antimicrobianos exclusivamente para tratar una infección bacteriana verdadera basada en un diagnóstico etiológico correcto.
2. La realización de pruebas *in vitro* de sensibilidad para prever el antibiótico más efectivo frente al patógeno a tratar, asegurándonos así un tratamiento más individualizado y efectivo.
3. La adherencia a las pautas de dosis, duración y periodicidad del tratamiento prescrito.
4. Instauración de sistemas de rotación de antimicrobianos en los protocolos de quimioprofilaxis y tratamientos empíricos.
5. Realización de programas formativos para fomentar un mayor conocimiento de los antimicrobianos. (1)

En la actualidad, mueren casi 700.000 personas al año en todo el mundo debido a resistencia a antibióticos, cifra que se prevé en aumento hasta los 10 millones de personas en el 2050. Teniendo en cuenta estas previsiones, y a pesar de todos los beneficios que nos han proporcionado desde su descubrimiento, podemos afirmar que la era de los antibióticos está en declive y científicos de todo el mundo investigan la manera de afrontar el tratamiento de infecciones bacterianas en el futuro. (3)

4.2. Una posible solución: los bacteriófagos.

a. Contexto histórico

En 1896, Ernest Hanbury Hankin, un bacteriólogo británico que trabajaba en la India, demostró que el agua de los ríos Ganges y Jumna contenían un principio biológico que destruía colonias de bacterias inductoras de cólera. Este material transparente encontrado, fue descrito por Twort en 1915 como un fermento secretado por microorganismos por una causa desconocida, planteó la hipótesis basada en que un virus podría ser la causa detrás de esta actividad antibacteriana. Realizó cultivos del virus *Vaccinia* en un medio con agar y observó el crecimiento de colonias de micrococos con zonas claras. Cuando examinó estas colonias descubrió agrupaciones de bacterias muertas, lo que le ayudó a formular esta hipótesis.

Dos años después, Felix d' Herelle describió en su primer paper un experimento similar mientras estudiaba pacientes con disentería bacteriana. Aisló de las heces de pacientes recuperados de Shigelosis, un denominado "microbio anti-shiga". Para demostrar su actividad lo inoculó en conejos de laboratorio confirmando la significancia clínica de su hallazgo ya que este filtrado era capaz de detener el crecimiento de las bacterias y provocar la lisis y muerte de los bacilos, dando así protección frente a la infección por *Shigella* en los conejos inoculados. D'Herelle describió su hallazgo como un microbio de inmunidad bacteriana y obligado bacteriófago ("come bacterias"). Por este experimento y su gran hallazgo D'Herelle es considerado el descubridor de lo que ahora conocemos como terapia fágica.

Además, d'Herelle introdujo el uso de bacteriófagos en medicina clínica y publico numerosos ensayos no aleatorizados, incluso empleando un tratamiento con fagos intravenosos para infecciones invasivas. (3)

La primera publicación sobre el uso clínico de los fagos fue realizada en Bélgica por Bruynoghe y Maisin, que usaron inyecciones de fagos específicos para tratar forúnculos y carbuncos cutáneos provocados por estafilococos. Describieron evidencias claras de mejora clínica en 48 horas, con reducción del dolor, hinchazón y fiebre en pacientes tratados. (4)

Siguiendo estos importantes hallazgos, equipos de microbiólogos comenzaron a usar bacteriófagos con fines terapéuticos tanto en animales como en humanos. A partir de este punto, hay un crecimiento notable en el desarrollo de terapias con bacteriófagos. Incluso D'Herelle estableció su propio laboratorio, que produjo el primer cóctel comercial de bacteriófagos.

Sin embargo, este entusiasmo por la terapia con bacteriófagos disminuyó después del descubrimiento de la sulfonamida y la penicilina, además del informe con duras críticas hechas por Eaton y Bayne-Jones de 1934 que cuestionó la precisión y la consistencia de los protocolos de terapias con bacteriófagos, estos hechos sumados a la falta de conocimiento sobre la naturaleza esencial del ADN y ARN como la esencia genética de la vida, obstaculizó y paralizó el entendimiento y desarrollo de los fagos a principio de siglo XX en la mayor parte del mundo (1).

Después de este abandono, hace unas pocas décadas, países tales como Polonia, Georgia y Rusia continuaron la investigación en el campo de las terapias con bacteriófagos contra las infecciones bacterianas. Lamentablemente, la documentación de dichos estudios no suele estar disponible a escala internacional, debido al uso de otros idiomas. Hoy en día solamente una selección específica de bacteriófagos virulentos son usados como agentes biocontroladores y considerados seguros, especialmente por no transferir genes de síntesis de toxinas o resistencia antibiótica de una bacteria hospedadora a otra (1). Estos bacteriófagos se han considerado como no tóxicos y actualmente su uso se limita como aditivos en la comida, su función es antimicrobiano según agencias reguladoras.

b. Biología de los bacteriófagos

Se les considera elementos antibacterianos capaces de regular las poblaciones bacterianas, son esenciales para los ciclos biológicos de la naturaleza y se les puede detectar en cualquier ecosistema, habiéndose calculado que son capaces de infectar a más de 140 géneros bacterianos distintos, son las entidades biológicas más abundantes del planeta con cerca de 10^{31} fagos como masa biológica. (5)

Los fagos son entidades biológicas no vivas, simples, e increíblemente diversas que consisten en ADN o ARN encerrado por una cápsida proteica. Al ser parásitos bacterianos, los fagos son incapaces de reproducirse de manera independiente, y dependen de su hospedador bacteriano para la supervivencia. (5) (Figura 1)

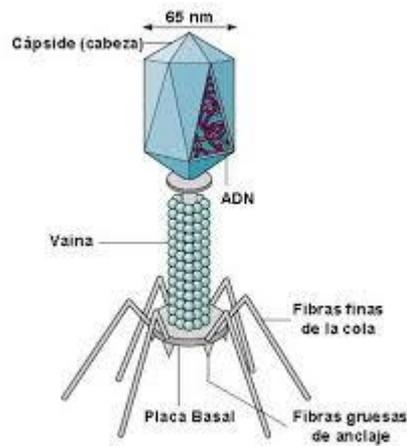


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de un bacteriófago.

Una vez que un bacteriófago se une a su hospedador, llevará a cabo una de dos estrategias de replicación: lítica o lisogénica. (Figura 2)

- Ciclo lítico: el fago se une a su huésped bacteriano, introduce su genoma en el interior y emplea los ribosomas del hospedador para fabricar sus propias proteínas y producir la siguiente progenie de fagos, que dependiendo de las condiciones ambientales activan proteínas líticas que hidrolizan la pared celular, liberando los nuevos fagos para reiniciar el ciclo lítico en otra bacteria.
 - Ciclo lisogénico: el fago comienza de la misma forma uniéndose al huésped e introduciendo su genoma en el interior. Sin embargo, este genoma vírico es integrado en el genoma bacteriano o se mantiene como episoma (molécula de ADN que es capaz de replicarse de forma autónoma), en ambos casos es replicado y se transmite a las células hijas sin causar la muerte de la bacteria. Estos bacteriófagos son denominados fagos atemperados y en algunos casos pueden cambiar su ciclo al lítico dependiendo de las condiciones ambientales.
- (6)

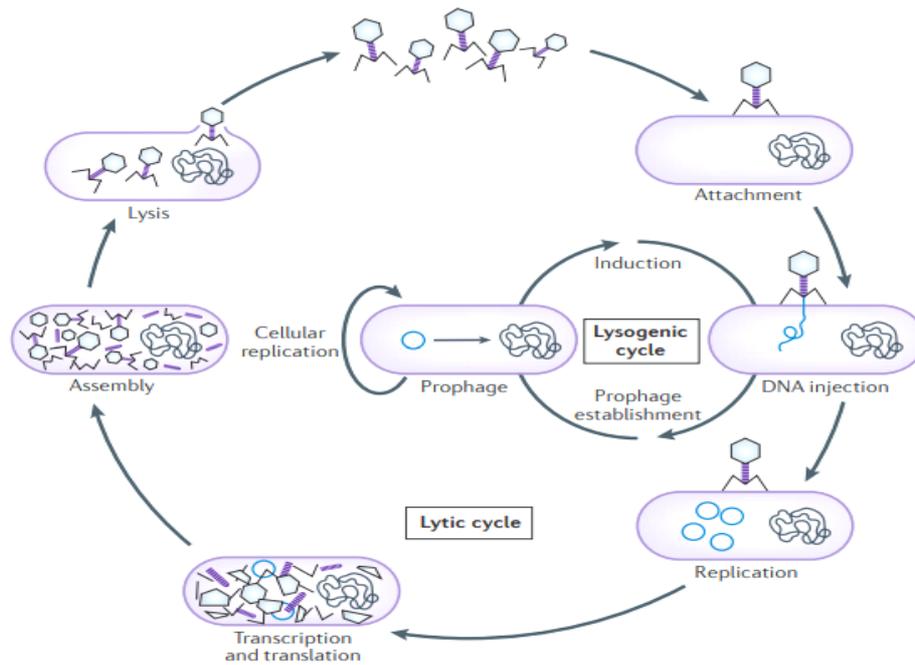


Figura 2. Ciclo lítico y ciclo lisogénico (7)

Los fagos varían de gran forma en tamaño, forma y complejidad, y el genoma que contiene es más diverso aún si cabe. Su genoma en tamaño puede ir desde 3.4kb hasta 500kb y a diferencia de las bacterias no hay un solo gen presente en todos los fagos. De hecho, el genoma de los bacteriófagos representa el reservorio de genes y proteínas inexplorados más grande de la biosfera.

Los bacteriófagos son conductores de la evolución bacteriana, porque las bacterias deben constantemente evolucionar para evitar ser eliminados por sus depredadores virales y también porque los fagos, especialmente los atemperados (aquellos que pueden integrar de manera estable su propio genoma en el del huésped) son agentes de transmisión horizontal de genes. (8)

La formación de biofilms durante la infección bacteriana es uno de los principales problemas en el control de estas. Las bacterias en los biofilms son extremadamente resistentes a los antibióticos, están protegidas de las defensas del huésped y acaban convirtiéndose en infecciones crónicas. Algunos fagos son capaces de penetrar estos biofilms y podrían suplementar al tratamiento antibiótico convencional. Algunos autores han comprobado como una mezcla de diferentes fagos frente a *Clostridium difficile* reducen significativamente los biofilms y previenen la colonización bacteriana de los mismos. (9)

Algunas consideraciones biológicas importantes a tener en cuenta de los fagos son:

- Especificidad

La infección de una célula bacteriana por un fago comienza con el que llamamos proceso de adsorción, cuando tiene lugar la interacción de las fibras de la cola del fago con estructuras compatibles en la superficie de la bacteria. A menudo, estas estructuras bacterianas denominadas “receptores de fagos” son muy variables y específicas, no siendo raro que el rango de posibles hospedadores de un fago se limite a muy pocas cepas dentro de

la misma especie bacteriana. Esta especificidad es una gran ventaja desde el punto que no daña el resto de microbiota, sin embargo a su vez también es uno de los puntos débiles a la hora de pensar en como adaptar la terapia con fagos para tratar una amplia cantidad de patógenos.

Existen varias maneras de ampliar el espectro de los fagos, tanto de forma biológica como en preparaciones. Una de las formas de afrontar este desafío puede ser la utilización de ingeniería genética para facilitar el intercambio de las fibras de la cola entre diferentes fagos. Este método tiene sus propias limitaciones, ya que los fagos no son universalmente compatibles, y no todos presentan la misma proporción a la hora de expresar las fibras de la cola.

La manera más fácil de ampliar el rango es añadir más fagos, formando cócteles de fagos, que son combinaciones de varios fagos en la misma preparación, sin embargo, los costes para demostrar seguridad clínica y eficacia para cada fago dentro del cóctel suponen un problema.

- Resistencia a los fagos

Las bacterias presentan números mecanismos para contrarrestar las infecciones por fagos, como la alteración o enmascaramiento del receptor de fagos, sistemas de restricción-modificación y sistema CRISPR-Cas.

El sistema CRISPR-Cas, que ahora es sinónimo de modificación genética, fue primeramente propuesto como un “sistema adaptativo inmune” por Francisco Mojica y independientemente por un grupo de la Université Paris-Sud en 2005. CRISPR es un locus formado por una serie de secuencias cortas repetidas de la bacteria intercaladas por espaciadores (fragmentos de la secuencia de ADN del fago viral).

Cuando una bacteria es atacada por un fago al que no se había enfrentado anteriormente, se añaden nuevos espaciadores procedentes de fragmentos del ADN viral al final de uno de los lados del CRISPR, haciendo de CRISPR un recordatorio cronológico de los fagos a los que la bacteria y sus antecesoras se han enfrentado. En respuesta a la invasión de los fagos, estas secuencias espaciadoras de CRISPR son transcritas y en colaboración con las proteínas nucleasas Cas, señalizan y destruyen las secuencias del fago que son homologas a las secuencias espaciadoras que ya poseen. (10)

La creación de cócteles de fagos capaces de infectar al mismo huésped por adsorción mediante diferentes receptores debe prevenir o por lo menos retrasar la aparición de mutantes resistentes. Esta adición de diferentes fagos específicos para el mismo tipo de bacteria no solo disminuye la probabilidad de resistencia genética, también incrementa la posibilidad de que ciertos mutantes tengan defectos en otras aptitudes, ya que se producen compensaciones a costa del crecimiento bacteriano y la pérdida de genes, como pueden ser genes de resistencia antibiótica.

Esto convierte la resistencia de los fagos clínicamente relevantes en algo difícil de predecir, ya que las bacterias fago-resistentes que surgen bajo condiciones de laboratorio puede que nunca aparezcan en condiciones fisiológicas, donde el acúmulo de estos defectos en genes accesorios puedan derivar en destrucción inmunológica, resensibilización antibiótica o error a la hora de prosperar.

La resistencia siempre será un obstáculo para cualquier agente antibacteriano. Los fagos, como entidades replicativas sujetas a las fuerzas de la evolución están mejor equipados para tratar con estas que la mayoría. Millones de años de coevolución han dotado a los fagos con una serie de defensas antibacterianas tales como, metilación genómica para evitar el reconocimiento por enzimas de restricción (endonucleasas bacterianas Cas), despolimerización de la cápsula bacteriana para favorecer el acceso a su receptor y moléculas antitoxina presentes en el código genético para revertir el sistema Abi (abortive-infection) de las bacterias. (16)

c. Fagos como agentes terapéuticos

Algunas características deseadas en la selección de fagos para su aplicación terapéutica a tener en cuenta son:

▪ Virulencia del fago

La habilidad de lisar completamente un cultivo bacteriano es el resultado de dos propiedades del fago. En primer lugar, los fagos deben tener la suficiente virulencia y productividad para que la velocidad de multiplicación de la bacteria no sea superior a la tasa de mortalidad causada por el fago, ya que a no ser que la dosis inicial del fago sea tan alta para infectar a todas las células bacterianas, será necesario que el fago se reproduzca hasta el punto que todos los huéspedes estén infectados.

En segundo lugar, las bacterias mutantes que puedan resistir la infección deben aparecer en bajo porcentaje, de lo contrario una población de bacterias resistentes reemplazaría rápidamente la población de las bacterias que si son sensibles al fago y continuaría la infección del paciente por la bacteria resistente.

▪ Fago de ciclo lítico obligado

Los fagos líticos son preferidos sobre los atemperados o de ciclo lisogénico para la terapia fágica debido a tres razones:

- Los fagos atemperados pueden portar genes de toxinas que actúan como factores de virulencia en las bacterias que sufran el ciclo lisogénico, incrementando la probabilidad de crear un patógeno bacteriano más virulento en los pacientes bajo tratamiento.
- Muchos fagos atemperados son capaces de realizar transducción genética, pudiendo transmitir genes de una bacteria a otra con el potencial de incrementar la virulencia de la bacteria receptora.
- Las bacterias que han sufrido un ciclo lisogénico normalmente también adquieren inmunidad frente a la infección lítica por el fago al igual que a otros fagos que compartan sistemas de represión.

▪ Espectro de huéspedes

El espectro de infección de un fago son las diferentes cepas bacterianas capaces de ser infectadas por él y de producir nuevos viriones, por tanto, es una propiedad crítica a la hora de decidir la utilidad de un fago para su uso en terapia.

De manera ideal un fago no debería infectar otras especies porque esto provocaría la muerte de bacterias no patógenas de la flora normal y además diluiría la concentración efectiva del fago hacia la bacteria objetivo. Generalmente, se piensa que este factor es únicamente cuestión de la presencia del receptor correcto en la bacteria, sin embargo, también incluye las defensas anti-fagos que presenta la bacteria tales como CRISPR- Cas, enzimas de restricción y sistemas de toxinas anti-toxina. A su vez los fagos también presentan sistemas para contrarrestar los anteriores, convirtiendo el espectro de acción de los fagos en una propiedad dinámica a lo largo del tiempo. (11)

d. Tipos de terapia

I. Terapia convencional (monofágica y polifágica)

La terapia con bacteriófagos administrada a pacientes la podemos clasificar según la variedad de fagos que contenga, de manera que esta puede contener una dosis de un solo tipo de fago, y por tanto será una terapia monofágica o bien un cóctel que incluya varios tipos de fagos, denominándose polifágica.

En las terapias monofágicas se selecciona una cepa de bacteriófago específica para la bacteria patógena. Las dosis se pueden repetir sin efectos adversos, pero con este tipo de terapia es mas probable que la bacteria desarrolle resistencias a los fagos (20)

En los cocteles polifágicos sucede al contrario, se selecciona un espectro mayor de bacteriófagos para que entre ellos compensen las resistencias que puedan desarrollar las bacterias patógenas.

En la práctica clínica y el diseño de la terapia fágica diferenciamos dos enfoques diferentes:

- Preparación de fagos personalizados: inicialmente se aísla la bacteria causante de la infección del paciente y se ensaya *in vitro* con una batería de fagos para seleccionar la combinación óptima, aquella reduzca al mínimo las probabilidades de desarrollo de resistencia y supervivencia de la bacteria patógena. Este es un proceso complejo y que consume gran cantidad de recursos, sin embargo, al ser una terapia individualizada obtenemos muy buenos resultados.
- Preparación comercial de cóctel de fagos: es una combinación de múltiples fagos con eficacia *in vitro* contra una determinada infección bacteriana. Estos fagos deben tener un amplio espectro de actividad para poder hacer frente a las diversas bacterias que suelen provocar la infección a tratar. Estas preparaciones comerciales de cócteles ya están preformuladas, lo que hace que estas terapias no sean tan específicas ni eficaces como las anteriores, pero el proceso es más rápido. Este modelo de fabricación encaja mejor a nivel legal y de regulación de compuestos farmacéuticos con el sistema médico actual de los países europeos. (12)

II. Terapia conjunta de fagos y antibióticos

Existen diversos factores que pueden resultar en resistencia bacteriana a los fagos, tales como la modificación de los receptores de la superficie celular, degradación del DNA fágico por endonucleasas de restricción (CRISPR-Cas) producidas por la bacteria, o mecanismos que inhiben la entrada del material genético del fago a la bacteria entre otros. Estos mecanismos sumados a ciertas condiciones como un ratio de fagos por bacteria bajo, o el uso de terapia monofágica pueden provocar esta aparición de resistencias por parte de la bacteria. Una posible solución a este problema de resistencias emergentes la encontramos en la terapia conjunta de fagos con antibióticos.

Según estudios realizados, el uso combinado de fagos y antibióticos proporciona una mayor supresión del crecimiento bacteriano y ayuda a reducir las resistencias bacterianas tanto a los fagos como a los antibióticos, ya que es poco probable que una bacteria adquiera resistencia a los fagos y a los antibióticos simultáneamente debido a que usan diferentes dianas. (13)

Estudios *in vitro* e *in vivo* recientes han demostrado una mayor eficacia en el control del crecimiento de patógenos bacterianos como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* y *Burkholderia cepacia* utilizando combinaciones de fagos y antibióticos. (21,22)

Esta terapia es especialmente útil en el tratamiento de bacterias formadoras de biofilms como *Pseudomonas Aeruginosa*, ya que tiene una fuerte capacidad de colonizar en superficies bióticas y abióticas, y persiste a una amplia gama de antimicrobianos. El tratamiento inicial de la biopelícula con fagos provoca la desintegración de la biopelícula, estos penetran en las capas más profundas donde se replican y facilitan la penetración del antibiótico al biofilm cuya actividad va a inhibir el crecimiento de nuevo de la biopelícula, degradando por completo la matriz del biofilm.

Las biopelículas y los cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* fueron el objetivo principal de muchos estudios que utilizaron principalmente la cepa PA01 u otras cepas de referencia, como PA14, CHA y PAK. (5) Chaudhry y col. trataron una biopelícula de 48 h de PA14 con los dos fagos NP1 (Siphoviridae, NP1Virus) y NP3 (Myoviridae) juntos o ambos en combinación con cinco antibióticos (21). Cada antimicrobiano administrado solo mostró una eficacia anti-biofilm moderada, sin embargo, cuando se aplicaron simultáneamente, se observaron verdaderos efectos sinérgicos entre fagos con ceftazidima o ciprofloxacino.

El resultado terapéutico difirió con el uso retardado de fagos y antibióticos. La adición de tobramicina o gentamicina 24 h después de la aplicación del fago condujo a un efecto sinérgico significativo. Por el contrario, la adición sucesiva de ciprofloxacina o ceftazidima no condujo a un mejor resultado en comparación con la aplicación simultánea. Por lo tanto, para una aplicación combinada exitosa es fundamental conocer la dosis y el momento óptimo de la adición cada antibiótico en particular respecto al fago.

III. Terapia con fagos genéticamente modificados

Además de tener actividad antimicrobiana directa, los fagos pueden ser diseñados para su uso junto con otras estrategias antimicrobianas. Lu y Collins modificaron el fago lisogénico M13mp18 para sobreexpresar *lexA3*, un represor del sistema de reparación de ADN, que administrado junto a un antibiótico quinolónico (ofloxacina) mejoró en hasta 4,5 veces la acción bactericida frente *E. coli* en comparación con la administración única del antibiótico.

En otra estrategia para disminuir el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos, Edgar et al. diseñaron fagos con el fin de incorporar en las bacterias genes que aumentan la sensibilidad a los antibióticos. Más precisamente, los genes dominantes *rpsL* y *gyrA*, que confieren sensibilidad a la estreptomicina (un aminoglucósido) y nalidíxico ácido (una quinolona), respectivamente, se insertaron en el fago por recombinación homóloga.

Para superar la eficacia reducida de fagos y antibióticos contra biopelículas, Lu y Collins diseñaron un fago T7 para expresar la enzima degradante de biofilms dispersina-B (DspB) procedente de un gen aislado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* que redujo en 4,5 veces la población de bacterias de *E.Coli* en biofilms después de 24 h de tratamiento.

La combinación de fagos en un solo cóctel, es actualmente la forma más común de obtener un espectro de huéspedes bacterianos amplio. Compuestos por un grupo grande y diverso de fagos, pueden plantear desafíos para la fabricación, caracterización e ingeniería. Como alternativa, es posible diseñar un conjunto más uniforme de fagos basados en rasgos comunes y un espectro de huéspedes que se puede expandir y modificar, y para demostrarlo múltiples estudios apuntan a que el espectro está relacionado con la composición de las fibras de la cola de algunos fagos.

Yoichi et al. modificó genéticamente un fago T2 intercambiando los genes (*gp37* y *gp38*) de las fibras de la cola con los del fago PP01, el cual tiene especificidad por *E.Coli* O157:H7. El fago recombinante T2ppD1 tenía el mismo espectro de rango que el fago PP01 pero perdió la capacidad de infectar al huésped original del fago T2, *E.Coli* K-12. Este trabajo demostró que los cócteles de fagos sintéticos compuestos por fagos con la misma estructura pero diferentes componentes en la cola pueden ser usados para eliminar especies bacterianas específicas dentro de una población bacteriana diversa.

Una preocupación asociada al uso de fagos en terapia antibacteriana es la capacidad del sistema inmune humano de neutralizarlos debido a su inmunogenicidad. Para evitar este problema de eliminación de fagos por el paciente, en particular por el sistema de retículo endoplasmático (RES), Merrill et al. inyectó una serie de fagos en ratones en la búsqueda de fagos mutantes capaces de permanecer en el sistema circulatorio por un tiempo mayor, encontrando que estos presentaban una mutación en la proteína D de la cápsida, sugiriendo que gracias a esta técnica podemos aislar fagos capaces de evadir el sistema RES.

Como añadido, el tratamiento con fagos líticos puede causar una lisis bacteriana masiva y la consecuente liberación de componentes y toxinas bacterianas que posiblemente desencadenen una respuesta inmune. Para solucionar este problema, Hagens y Bläsi diseñaron mutantes como el fago M13R que expresan proteínas letales pero no líticas, como la enzima de restricción BglIII que induce la rotura de la doble hebra del cromosoma bacteriano.

Los fagos también pueden ser diseñados para matar bacterias según su genética, dando lugar a una actividad antimicrobiana muy precisa. Basados en la tecnología CRISPR-Cas, Citorik et al. y Bikard et al. desarrollaron fagos cuyo espectro de actividad estaba programado contra secuencias DNA bacterianas específicas. Lo consiguen mediante la introducción de nucleasas guiadas por RNA a través de vectores en bacterias, donde la nucleasas buscarán la secuencia objetivo y como resultado, si la encuentran, producirán un corte en la cadena de doble hebra, matando a la bacteria.

La mayoría de métodos usados actualmente para identificar estos patógenos en comida, hospitales e industria consumen mucho tiempo. Loessner et al. describió un método rápido, fácil y sensible para detectar *Listeria monocytogenes* en comida contaminada. Consiste en la inserción mediante recombinación homóloga de una fusión de los genes luxA y luxB (luxAB) del *Vibrio harvevi* en el gen que codifica para la cápsida proteica del fago de *Listeria* A511. Tras la infección de las bacterias objetivo, este fago diseñado genéticamente genera luz, esta luminiscencia es detectada rápidamente, tan solo 2 horas después de su aplicación incluso en comida contaminada con un número muy pequeño de bacterias (500 células de *L.monocytogenes/ml*) (15)

IV. Terapia con proteínas derivadas de fagos

Las proteínas de los fagos se pueden extraer o diseñar y emplearse como alternativa terapéutica a los fagos completos. En especial se utilizan las endolisinas, enzimas codificadas por los fagos al final de su ciclo lítico que facilitan la lisis de la pared celular bacteriana y la liberación de la progenie fágica al medio. Esta capacidad de degradar el peptidoglicano de la pared bacteriana desde el exterior permite que se emplee como potencial agente antimicrobiano sin dañar la flora natural del paciente debido a la especificidad de la actividad enzimática.

La mayoría de endolisinas tienen efecto limitado en bacterias Gram negativas debido a la presencia de la membrana externa que protege al peptidoglicano, sin embargo, podemos lograr la inactivación de estos patógenos aumentando la permeabilidad de la membrana externa de manera física o mediante la creación de fusiones “endolisina-peptido” capaces de permeabilizar la membrana externa.

Además, la probabilidad de desarrollar resistencia a endolisinas es baja ya que tienen como diana las moléculas esenciales de la pared bacteriana, por lo que son grandes candidatos para el tratamiento de infecciones resistentes a múltiples fármacos. Una de las aplicaciones principales de esta terapia es el control biológico contra patógenos bacterianos en la industria alimentaria y agrícola. (13)

e. Ventajas e inconvenientes

Ventajas

- ✓ **Agentes bactericidas:** se ha demostrado que las bacterias que han sido infectadas por un fago lítico son incapaces de recuperar su viabilidad, al contrario que el tratamiento con algunos antibióticos bacteriostáticos, como la tetraciclina, que pueden provocar un rápido desarrollo de resistencia por parte de las bacterias al no ser bactericida.

- ✓ **Auto “dosificación”:** los fagos, durante el proceso de lisis de las bacterias pueden ir aumentando su número en aquellas zonas donde haya mayor concentración de bacterias, por eso se llama auto “dosificación” ya que son capaces de aumentar su número según el número de bacterias.
- ✓ **Toxicidad inherente baja:** ya que los fagos están formados por ácidos nucleicos y proteínas no son tóxicos por sí mismos. Hay estudios que han demostrado que la terapia con fagos puede provocar respuestas inmunes dañinas o respuestas anafilácticas, este hecho se puede deber a que los fagos al provocar la lisis de las bacterias hacen que se liberen las endotoxinas y otros componentes bacterianos que inducen una respuesta inmune. Este proceso también ocurre cuando se emplean antibióticos que alteran la pared celular.
- ✓ **Alteración mínima de la flora:** debido a la gran especificidad de los fagos por las cepas bacterianas es muy poco probable que infecten a otras cepas, por lo que la terapia con fagos no tendría el inconveniente que tienen muchos antibióticos de su poca especificidad y por lo tanto la destrucción de la flora natural.
- ✓ **Menor potencial para inducir resistencias:** el estrecho espectro de acción antibacteriana que presenta cada tipo de fago limita el número de tipos bacterianos que pueden desarrollar mecanismos específicos de resistencia fágica. Esto contrasta con la gran parte de bacterias que pueden ser afectadas por antibióticos. Además, algunas mutaciones causantes de resistencia a fagos pueden provocar una pérdida de la patogenicidad bacteriana.
- ✓ **No tienen resistencia cruzada con antibióticos:** los fagos emplean mecanismos diferentes para matar a la bacteria, por lo que la resistencia a antibióticos que haya adquirido la bacteria no se traduce en mecanismos de resistencia a los fagos, por ello se emplean en el tratamiento de infecciones resistentes a antibióticos.
- ✓ **Rápido descubrimiento:** el proceso de descubrimiento de un nuevo fago contra una bacteria es muy rápido, se descubren fácilmente en aguas residuales y materiales de desecho que contienen grandes cantidades de bacteria, como por ejemplo de los hospitales. El proceso de aislamiento del fago es más complicado, ya que no se puede cultivar individualmente, sino que necesita la bacteria hospedadora para multiplicarse.
- ✓ **Versatilidad de formulación y aplicación:** los fagos se pueden aplicar de diferentes formas: líquidos, cremas o sólidos impregnados, por lo que son adecuados para la mayoría de las vías de administración. Además, en su formulación también se pueden mezclar con otros fagos y así aumentar su espectro de actividad antibacteriana.
- ✓ **Eliminación de biofilms:** las biopelículas suelen ser muy resistentes antibióticos por lo que su erradicación es un desafío. Los fagos tienen la capacidad de eliminar algunos biofilms penetrando a través de la película gracias a sus polimerasas que degradan los exopolímeros que presentan.

Inconvenientes

- × **No todos los fagos son buenos agentes terapéuticos:** para que lo sea debe tener un alto potencial para alcanzar y matar a las bacterias combinado con un bajo potencial para modificar el entorno. Estas características se pueden asegurar si empleamos un fago obligatoriamente lítico (no templado), estable a temperaturas típicas de almacenamiento, sujeto a estudios de eficacia y seguridad, e idealmente también completamente secuenciado genéticamente.
La baja virulencia mostrada por algunos fagos puede ser por una mala adsorción a la bacteria, bajo potencial para invadir ciertas bacterias o características de replicación ineficientes. Además, los fagos deben mostrar poco potencial transfiriendo genes bacterianos entre las bacterias (transducción).
La caracterización de fagos es un punto muy importante en su estudio, se puede observar la morfología del virión, perfiles de proteínas y la secuenciación del genoma completo, de lo que se obtiene mucha información para la puesta en práctica de un nuevo fago. El problema es que los costes de estos procesos son muy altos, por lo que muchos laboratorios no pueden investigarlos.
- × **Estrecho rango de hospedadores:** los fagos son muy específicos de algunas cepas, unas pocas especies o tan sólo de algún género bacteriano. Este estrecho espectro de huéspedes es un problema práctico debido a la necesidad de establecer rápidamente la etiología de la bacteria causante de la infección.
- × **Los fagos no son productos farmacéuticos:** los fagos son agentes vivos que potencialmente pueden presentar problemas de seguridad debido a la necesidad de comprobar que no actúan como traductores de ADN entre bacterias que generen bacterias con mayor patogenicidad o resistencia, y también que no pueden interactuar con el sistema inmunológico, por sus procesos de replicación activa y las toxinas bacterianas liberadas in situ tras ser lisadas. No deben ser descartados por este motivo, pero la falta de estándares establecidos en la medicina occidental supone un gran desafío para continuar con su desarrollo y uso.

4.3 Ensayos y casos clínicos.

Uno de los desafíos actuales que afronta el progreso de la terapia fágica en la práctica clínica es la falta de ensayos clínicos validados y controlados adecuadamente. Hay determinados factores que no son comparables con los ensayos clínicos de fármacos, incluyendo consideraciones farmacológicas como la dosis (al ser virus que se replican su dosis tiene un potencial de crecimiento exponencial) y la seguridad (la posibilidad de provocar un shock tóxico debido al efecto bactericida de los fagos), a pesar de que este método antibacteriano es compartido con determinados antibióticos.

Los primeros ensayos clínicos controlados en humanos fueron realizados en 2009, y son tomados de ejemplo por la literatura científica como ejemplos de seguridad y eficacia. Rhoads et al. demostraron la seguridad de los fagos en un pequeño ensayo en fase 1 en pacientes con úlceras venosas en las piernas y no reportaron ningún efecto adverso con la administración de fagos. Por otra parte, Wright et al. demostraron la eficacia y seguridad de fagos anti-*pseudomonas* contra los últimos estadios de otitis recurrente, habitual en *P. aeruginosa* multirresistente. (17)

Uno de los últimos casos más citados por la literatura científica es el de un paciente de 15 años de edad que sufría fibrosis quística con una infección diseminada provocada por la bacteria *Mycobacterium abscessus*, fue tratado con un cóctel de tres fagos después de un trasplante pulmonar bilateral. El paciente estaba infectado de manera crónica por *Pseudomonas aeruginosa* y *M. abscessus* y estuvo en tratamiento con fármacos anti-tuberculosos durante 8 años previos al trasplante, se le administraron antibióticos e inmunosupresores post-trasplante por vía intravenosa. Se desarrollaron dos lesiones en la piel del antebrazo y biopsias de heridas externas revelaron inflamación granulomatosa. El paciente fue diagnosticado con una infección micobacteriana diseminada 7 meses después del trasplante. La terapia antimicrobiana continuó con un plan de cuidados paliativos.

Un mes después del trasplante fueron aislados *M. abscessus* para su uso en la identificación de posibles fagos terapéuticos y se exploró una colección de más de 10.000 fagos, este cribado identificó uno (Muddy) que mata la micobacteria objetivo (GD01). Un segundo fago, Zoj también infecta a GD01 pero con una eficacia reducida, por lo que se diseñó un derivado lítico usando recombinación de ADN bacteriófago electroporado para eliminar el gen represor. Un tercer fago (BPs) y su derivado infectan deficientemente a GD01 pero se aíslan mutantes del rango de hospedadores que infectan de manera efectiva a GD01. Cada uno de estos tres fagos, Muddy, BPs33 y Zoj, infectan y matan GD01 en un gran rango de diferentes concentraciones de células y fagos.

Un día después de una única dosis de este coctel vía tópica en la herida externa, se inició la terapia I.V. con el coctel de estos tres fagos (109 UFP / dosis de cada fago) cada 12 horas durante 32 semanas. El tratamiento con fagos fue bien tolerado en todo momento, sin efectos secundarios significativos. Después de nueve días el paciente fue dado de alta y continuó la administración I.V. en su domicilio. Después de un mes de tratamiento la herida superficial había mejorado más que el resto de las lesiones cutáneas. Durante los siguientes 6 meses la paciente continuó mejorando clínicamente, con la curación gradual de la lesión externa y heridas cutáneas, también se observó mejoría en la función pulmonar y hepática.

Hasta donde sabemos este es el primer uso terapéutico de fagos para una infección micobacteriana humana y el primer uso de fagos modificados genéticamente. Este tratamiento se asoció con mejoría clínica, aunque no podemos excluir la posibilidad de que se hubiera producido en ausencia del tratamiento con fagos, observamos la gran morbilidad y mortalidad de pacientes con condiciones clínicas similares y se demostró evidencia de la replicación de fagos in vivo. (18)

5. CONCLUSIONES

Debido a la creciente aparición de bacterias multirresistentes a antibióticos, el interés por la terapia con bacteriófagos ha aumentado en los últimos años y con ella, la cantidad de artículos y revisiones de ensayos clínicos que encontramos en la actualidad.

Como hemos visto, se ha demostrado que los bacteriófagos son capaces de eliminar eficazmente las bacterias que se encuentran dentro de su estrecho espectro de acción, respetando así la flora natural del paciente.

La selección de fagos para su uso terapéutico es un proceso crítico, ya que los fagos deben ser capaces de eliminar las bacterias rápidamente sin intervenir en procesos de transmisión genética horizontal (fagos líticos obligados).

Comparando los diversos tipos de terapias con fagos, encontramos una mayor eficacia en la terapia polifágica (cócteles de fagos) y en la terapia combinada con antibióticos. Estas terapias se benefician de la elección evolutiva que debe realizar la bacteria a la hora de presentar resistencias frente a un compuesto antibiótico o frente a un fago que le parasite.

Una de las terapias más prometedoras está basada en fagos obtenidos por ingeniería genética, técnica que nos permite adaptar el espectro de huéspedes bacterianos, evitar problemas de resistencias y evadir una posible respuesta exacerbada del sistema inmune frente a ellos.

Aun con los beneficios descritos, debido a una legislación no adaptada a productos farmacológicos “vivos”, la percepción negativa frente a los virus, y los estrictos estándares de seguridad es necesario un gran avance en la regulación de estas nuevas terapias para llevar a cabo su desarrollo a gran escala.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández S.; Leiva. J. Bacterias multirresistentes. Gh Continuada. Julio-Agosto 2005. Vol. 4 n° 4: 191-193. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-70000281>
2. Tacconelli E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. OMS:7. Disponible en: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
3. d'Herelle F. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. Bull N Y Acad Med. Mayo de 1931;7(5):329-48.
4. Bruynoghe R, Maisin J, Maisin JR. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. 1 de enero de 1921. Disponible en: <https://www.scienceopen.com/document?vid=f9178fff-aba9-440f-a4dd-1316136e86a7>
5. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 6 de agosto de 2017;8(3):162-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5547374/#:~:text=Current%20research%20n%20the%20use,a%20supplement%20to%20antibiotic%20treatments.>
6. Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>
7. Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. Nat Rev Microbiol. Diciembre de 2015;13(12):777-86. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3564>
8. Keen EC. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. Enero de 2015;37(1):6-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418462/>
9. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infectious biofilms. Curr Pharm Biotechnol. Agosto de 2008;9(4):261-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18691087/#:~:text=Several%20in%20vitro%20experiments%20have,of%20the%20biofilm%20exopolymeric%20matrix.>
10. Lytic vs Lysogenic – Understanding Bacteriophage Life Cycles. Technology Networks. Disponible en: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/lytic-vs-lysogenic-understanding-bacteriophage-life-cycles-308094>
11. Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals. 11 de marzo de 2019;12(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6469166/>
12. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiol. Junio de 2013;8(6):769-83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23701332/>

13. Manohar P, Loh B, Athira S, Nachimuthu R, Hua X, Welburn SC, et al. Secondary Bacterial Infections During Pulmonary Viral Disease: Phage Therapeutics as Alternatives to Antibiotics? *Front Microbiol.* 26 de junio de 2020;11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7358648/>
14. Tagliaferri TL, Jansen M, Horz H-P. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 18 de febrero de 2019;9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6387922/>
15. Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 de septiembre de 2016;80(3):523-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27250768/>
16. Hesse S, Adhya S. Phage Therapy in the Twenty-First Century: Facing the Decline of the Antibiotic Era; Is It Finally Time for the Age of the Phage? *Annu Rev Microbiol.* 2019;73(1):155-74. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-090817-062535>
17. Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front Cell Infect Microbiol.* 23 de octubre de 2018;8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6205996/>
18. De Soyza A, Hall AJ, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Kaca W, Drulis-Kawa Z, et al. Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. *MicrobiologyOpen.* diciembre de 2013;2(6):1010-23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24214409/>
19. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* Mayo de 2019;25(5):730-3. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41591-019-0437-z>
20. Patel DR, Bhartiya SK, Kumar R, Shukla VK, Nath G. Use of Customized Bacteriophages in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds: A Prospective Study. *Int J Low Extrem Wounds.* 22 de noviembre de 2019; Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1534734619881076>
21. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS ONE.* 11 de enero de 2017;12(1). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0168615>
23. Torres-Barceló C, Hochberg ME. Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends Microbiol.* Abril de 2016;24(4):249-56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26786863/>