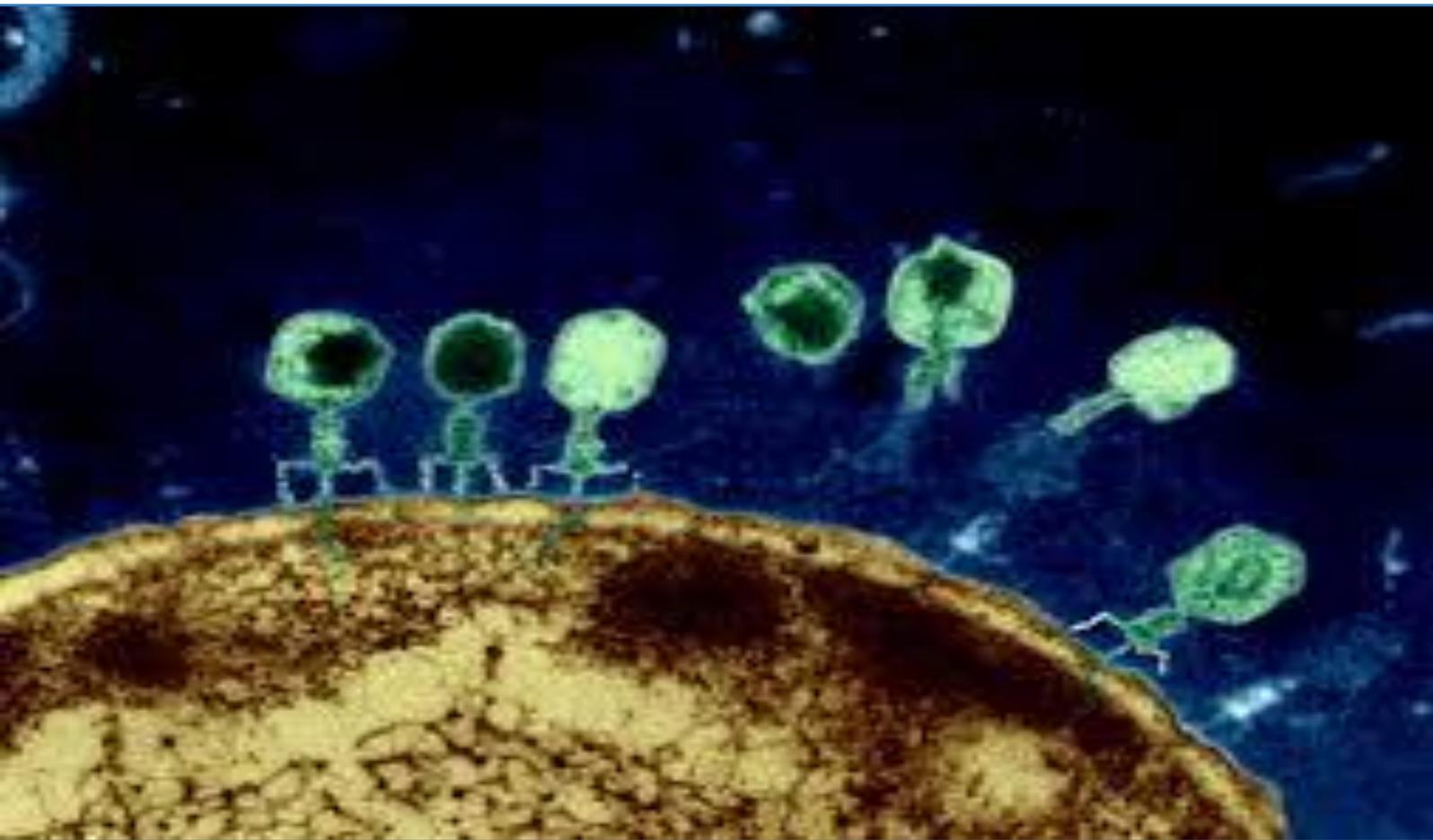


# Los bacteriófagos como alternativa terapéutica a los antibióticos



José María Serrano Romero

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Trabajo de Fin de Grado

# **Los bacteriófagos como alternativa terapéutica a los antibióticos**

Revisión Bibliográfica

José María Serrano Romero

15 de Junio 2020, Facultad de Farmacia, Sevilla

Grado en Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

Tutora: María del Carmen Márquez Marcos

## Resumen:

La resistencia a antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud pública a nivel mundial. La incidencia creciente de infecciones por bacterias multirresistentes supone un reto para el control de las enfermedades infecciosas y exige el desarrollo urgente y la implementación eficaz de nuevas herramientas terapéuticas para combatirlas. Los bacteriófagos son virus capaces de infectar y matar bacterias y su uso terapéutico es una de las alternativas a los antibióticos más prometedoras. Aunque la fagoterapia se implementó por primera vez hace más de un siglo, el aumento de la resistencia a antibióticos ha renovado el interés por los fagos y sus aplicaciones clínicas. En los últimos años se ha observado un número creciente de ensayos clínicos de fase I / II modernos que describen la seguridad y la eficacia de los fagos. Mediante la revisión de estos ensayos se analiza el papel que pueden desempeñar los fagos como alternativa a los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Seguidamente, se exponen las posibilidades terapéuticas de los fagos en tratamientos de fagoterapia convencional y la evolución de este enfoque tradicional a nuevas estrategias, como la terapia combinada de fagos y antibióticos, el uso de enzimas líticas de fago y la optimización de fagos mediante bioingeniería. Finalmente se discuten algunos aspectos clave que apoyan el uso de los bacteriófagos frente a los antibióticos y los inconvenientes que se han de superar para su implantación efectiva en la medicina occidental.

**Palabras clave:** resistencia a antibióticos, bacteriófagos, fagoterapia, ensayos clínicos.

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>2</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>2</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>3</b>
4.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS .....	3
4.2 BIOLOGÍA DE LOS FAGOS.....	4
4.3 ANTECEDENTES .....	6
4.4 EXPERIENCIA EN ENSAYOS CLÍNICOS .....	7
4.4.1 <i>Fagoterapia tópica en el tratamiento de quemaduras</i> .....	8
4.4.2 <i>Fagoterapia tópica en el tratamiento de infecciones de oído</i> .....	9
4.4.3 <i>Fagoterapia oral en el tratamiento de diarrea</i> .....	9
4.4.4 <i>Fagoterapia intravenosa en el tratamiento de septicemias</i> .....	10
4.4.5 <i>Fagoterapia inhalada en el tratamiento de infecciones respiratorias</i> .....	11
4.4.6 <i>Fagoterapia parenteral en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU)</i> .....	11
4.5 FAGOTERAPIA CONVENCIONAL .....	12
4.6 NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS .....	14
4.6.1 <i>Terapia combinada</i> .....	14
4.6.2 <i>Enzimas codificadas</i> .....	15
4.6.3 <i>Fagos modificados mediante bioingeniería</i> .....	18
4.7 COMPARATIVA CON ANTIBIÓTICOS .....	19
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>22</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>23</b>

## 1. Introducción

El descubrimiento de la penicilina por el bacteriólogo Alexander Fleming se convirtió en un hito en la historia de la medicina, marcando el comienzo de la era antibiótica. Los antibióticos fueron vistos inicialmente como la panacea de las enfermedades infecciosas, unas “balas mágicas” capaces de cambiar el curso de estas enfermedades e incrementar la supervivencia de los pacientes. A medida que nuestros conocimientos crecieron, se descubrieron más antibióticos con nuevos mecanismos de acción, diferentes propiedades y espectros de actividad (Nazarov, 2018). Desafortunadamente, el mal uso y uso excesivo de antibióticos ha conducido a la rápida propagación de la resistencia a los antibióticos adquirida (Ghose y Euler, 2020). La resistencia a antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial poniendo en peligro la capacidad de respuesta efectiva a las enfermedades infecciosas (OMS, 2014). Sin una acción coordinada e inmediata a escala mundial, el mundo se encamina hacia una era post-antibiótica en la que y las infecciones comunes podrían volver a matar. El objetivo de la OMS es garantizar la disponibilidad continua de opciones de tratamiento mediante el desarrollo y la implantación efectiva de nuevos recursos terapéuticos que nos permitan seguir luchando contra las enfermedades infecciosas de origen bacteriano. En este sentido los bacteriófagos representan una fuente de nuevos recursos terapéuticos especialmente prometedora. Los bacteriófagos son virus capaces infectar y matar bacterias y son considerados los organismos más abundantes y ubicuos en la Tierra. Las primeras observaciones documentadas de su actividad antibacteriana se dieron hace más de un siglo por Hankin, Twort y d’Herelle. No obstante, d’Herelle fue el primero en atribuir esta actividad antibacteriana a la presencia de microorganismos invisibles que él mismo llamó “bacteriófagos”. También el primero en usar los fagos para tratar infecciones bacterianas en animales y humanos. A pesar del éxito parcial de los primeros ensayos el uso de fagos para tratar infecciones bacterianas fue muy controvertido desde el principio. No se disponían de medios técnicos adecuados ni de conocimiento teórico suficiente para conocer la naturaleza de los fagos. El diseño inapropiado de los ensayos clínicos hacía que los resultados fueran inconsistentes y poco reproducibles. Por último, el desarrollo de los primeros antibióticos terminó por desplazar por completo a los fagos y la fagoterapia quedó olvidada casi por completo. En los últimos años, motivada por la crisis de la resistencia a antibióticos, la medicina occidental ha recuperado el interés por los fagos efectuando un número creciente de ensayos clínicos de fase I / II modernos que describen la seguridad y la eficacia de la fagoterapia.

## 2. Objetivo

El objetivo general de esta revisión ha sido examinar el papel que pueden desempeñar los fagos en el tratamiento de infecciones bacterianas como alternativa al uso de antibióticos.

Para ello, se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Revisar los ensayos clínicos actualizados y casos de uso compasivo documentados.
- Discutir la versatilidad de los fagos como agentes terapéuticos en tratamientos convencionales de fagoterapia y su evolución hacia nuevas estrategias como la terapia combinada de fagos y antibióticos, el uso de enzimas líticas de fago o el uso de fagos optimizados mediante bioingeniería.
- Evaluar los aspectos clave que apoyan el uso de fagos frente a los antibióticos y los inconvenientes que se han de superar para su implantación efectiva en la medicina occidental.

## 3. Metodología

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica utilizando las siguientes bases de datos: *PubMed*, *Web of Science* y *Scencedirect*. Comenzando la búsqueda con palabras claves muy generales, como “bacteriophages” y “phage therapy”, se obtuvieron los primeros documentos de carácter general. El elevado número de artículos encontrados hizo necesaria la utilización del filtro “review”. A estos documentos se les sumaron otros de temática más específica según se profundizaba en cada uno de los puntos de este trabajo. La búsqueda en la vasta literatura disponible se acotó a los artículos publicados en los cinco últimos años junto al uso de palabras claves más concretas, como “antibiotic resistance”, “early phage references”, “engineered phages”, “endolysins”, lo que nos permitió disponer de la información más precisa y actualizada disponible. Algunas de las revistas que más artículos han aportado a este trabajo son *Lancet of Infectious Diseases*, *Viruses*, *Frontiers in Microbiology* y *PLOS ONE*, todas ellas revistas internacionales con un elevado factor de impacto.

La búsqueda de los ensayos clínicos se realizó el 27 de abril de 2020 en la base de datos de ensayos clínicos de Estados Unidos. Los filtros utilizados fueron: “bacterial infection” y “bacteriophages” dando como resultado un total de 9 ensayos clínicos que fueron revisados.

Finalmente se han consultado diferentes páginas webs oficiales, que se encuentran especificadas en la bibliografía, de las que se ha recopilado información de gran utilidad para esta revisión bibliográfica.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Resistencia a antibióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en 2014 que la resistencia a antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial poniendo en peligro el núcleo mismo de la medicina moderna y la capacidad de respuesta efectiva a las enfermedades infecciosas (OMS, 2014). El mal uso sistemático y el uso excesivo de los antibióticos en la medicina humana y la producción de alimentos han puesto en riesgo a todas las naciones. Sin una acción coordinada e inmediata a escala mundial, el mundo se encamina hacia una era post-antibiótica en la que y las infecciones comunes podrían volver a matar. Ante esta situación, la OMS propuso un Plan de Acción Global Contra la Resistencia a Antimicrobianos en 2015 (OMS, 2015). Tras este comunicado, a finales del mismo año fue descubierto un nuevo mecanismo de resistencia a colistina mediado por plásmidos. Esto supuso la ruptura de un último grupo de antibióticos, las polimixinas (Liu et al., 2016). En octubre de 2016 fue descrita una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a daptomicina, capaz de inactivar el antibiótico mediante la liberación de fosfolípidos de membrana al entorno (Pader et al., 2016). En 2016 fue publicado el caso clínico de un paciente americano que murió de sepsis a causa de una bacteria Gram negativa, *Klebsiella pneumoniae*, resistente a todos los antibióticos aprobados en EEUU (Chen et al., 2017).

La resistencia a antibióticos es hoy es uno de los grandes retos para la salud pública a nivel mundial. Estimaciones recientes basadas en datos de la Red Europea de Vigilancia de Resistencia Microbiana indican que cada año tienen lugar en la UE más de 670000 infecciones por bacterias multirresistentes y aproximadamente 33000 personas mueren a causa de este tipo de infecciones (Cassini et al., 2019). El coste medio para los sistemas de salud de los países de la UE es alrededor de 1.1 billones de euros (ECDC, 2019). Se estima que para el año 2050 anualmente se perderán 10 millones de vidas debido a la resistencia a antimicrobianos, con un costo para las economías mundiales equivalente a 100 billones de dólares (Ghose y Euler, 2020).

El objetivo del Plan de Acción Mundial propuesto por la OMS es garantizar la disponibilidad continua de opciones de tratamiento y una de las medidas para lograrlo es aumentar la I + D para nuevos tratamientos antibacterianos (OMS, 2015). La OMS publicó en 2017 un análisis de todos los antibacterianos en desarrollo y sus posibilidades terapéuticas. Este análisis mostró una falta de opciones de tratamiento para infecciones por bacterias resistentes, especialmente para las Gram negativas multirresistentes y que las líneas de desarrollo clínico aún eran insuficientes para contrarrestar la resistencia creciente (OMS, 2017). La mayoría de las nuevas clases de antibióticos se dirigen a las bacterias Gram positivas, pero el principal desafío es encontrar nuevos antibióticos

contra las bacterias Gram negativas, calificadas por la OMS como prioridad crítica en su lista de patógenos prioritarios para I + D de nuevos antibióticos (OMS, 2017). Los antibióticos actualmente en desarrollo, especialmente para las bacterias Gram negativas, son mejoras de las clases ya existentes. Idealmente, la I + D debería dar como resultado clases, objetivos y modos de acción completamente nuevos para evitar la resistencia cruzada. Sin embargo, encontrar nuevas estructuras químicas con nuevos sitios de unión y nuevos modos de acción es realmente difícil (Payne et al., 2007). La ausencia de nuevas moléculas que sirvan como *leads* para el descubrimiento de fármacos es un obstáculo principal en el descubrimiento de antibióticos (Urahn et al., 2016).

La evolución de las bacterias multirresistentes y la dificultad para desarrollar nuevos antibióticos amenazan el control de las enfermedades infecciosas y nos apremia a desarrollar herramientas terapéuticas alternativas. En este sentido, los fagos representan una fuente especialmente prometedora de nuevas herramientas para combatir la resistencia microbiana (Aminov et al., 2018).

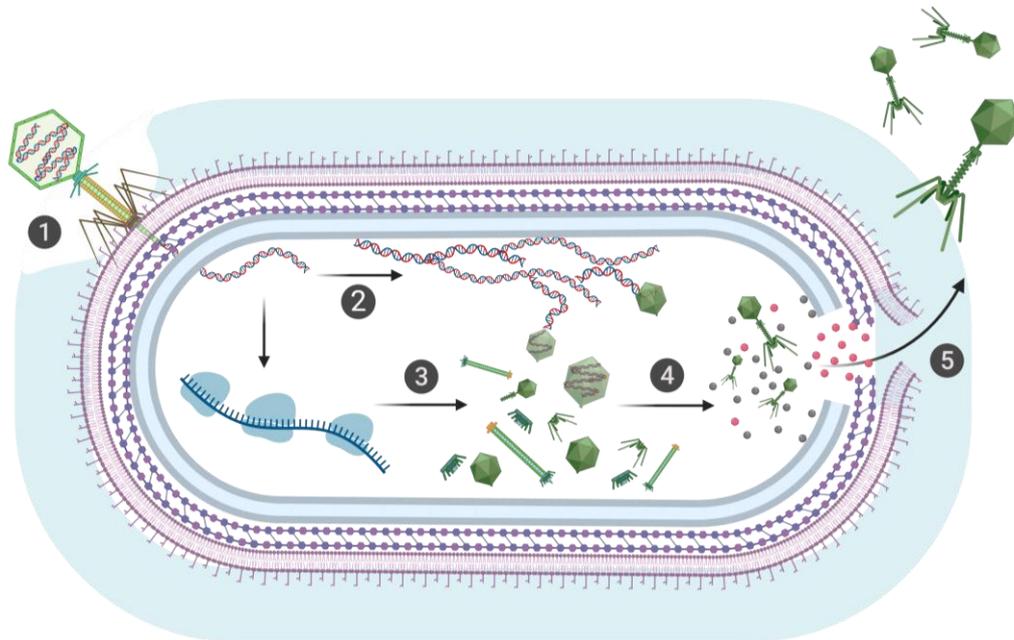
## 4.2 Biología de los fagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera específica. Esencialmente constan de un genoma vírico de ADN o ARN de cadena simple o doble, protegido por una cubierta proteica denominada cápside (Wittebole et al., 2014). Los fagos son la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra, con una población estimada de entre  $10^{30}$  y  $10^{32}$  Unidades Formadoras de Placa (UFP) en toda la biosfera y juegan un papel fundamental en el manteniendo el equilibrio poblacional de las bacterias en los ecosistemas (Guttman et al., 2004).

Los fagos se pueden caracterizar por la geometría de su cápside en: icosaedricos, filamentosos y complejos. Los miembros de estos grupos pueden tener ácido nucleico de varios tipos: ADN monocatenario, ADN bicatenario, ARN monocatenario y ARN bicatenario. Además, como parásitos intracelulares obligados de bacterias, los fagos pueden presentar diferentes ciclos de vida en la célula hospedadora: lítico, lisogénico, pseudolisogénico e infección crónica. Los fagos que desarrollan un ciclo lítico se conocen como fagos virulentos y son de especial interés por su potencial terapéutico, concretamente los fagos del orden *Caudovirales* han sido los mejor descritos por sus posibles aplicaciones clínicas (Romero-Calle et al., 2019). Estos presentan una cápside icosaédrica que conecta a través del cuello con la cola cuya zona distal está en contacto con la placa basal provista de espículas con capacidad de reconocer receptores de la superficie de

la bacteria (Wittebole et al., 2014). El orden *Caudovirales* se subdivide en tres familias: *Myoviridae* tienen una cápside grande y una cola contráctil; *Siphoviridae*, tienen una cápside relativamente pequeña y una cola no contráctil larga y flexible; y *Podoviridae*, con una cápside pequeña y cola corta (Ackermann, 2004).

El ciclo lítico (Figura 1) comienza con la unión específica de los antirreceptores del fago a los receptores de la superficie celular del huésped. Este proceso determina la especificidad entre el fago y sus posibles hospedadores. Una vez unidas irreversiblemente, las enzimas degradan la pared celular bacteriana y el material genético del virus es expulsado a la célula hospedadora. Dos grupos de proteínas facilitan este proceso: polisacárido depolimerasas y peptidoglucano hidrolasas. Una vez transcrito, el genoma del fago comienza a redirigir el metabolismo de la célula huésped a la producción de ácido nucleico y proteínas víricas. A menudo, el genoma del huésped se degrada durante este proceso. La lisis celular se inicia una vez que se ensamblan las proteínas recién sintetizadas que componen los viriones. La lisis bacteriana se desencadena por proteínas víricas codificadas por genes de expresión tardía que incluyen holinas (para permeabilizar la membrana celular interna), endolisinas (para degradar el peptidoglucano) e inhibidores de la síntesis de mureína. Estas enzimas promueven la pérdida de integridad de la pared celular que causa la lisis de la célula huésped liberando los nuevos viriones (Abubakar et al., 2016).



**Figura 1.** Ciclo lítico: **1** unión específica de los antirreceptores del fago a los receptores de la superficie celular, las enzimas degradan la pared celular bacteriana y el material genético del virus es expulsado a la célula hospedadora.; El genoma del fago redirige el metabolismo de la célula huésped a la producción de ácido nucleico **2** y proteínas víricas **3**; **4** empaquetamiento del material genético y ensamblaje de las proteínas que componen los viriones; **5** la lisis bacteriana inducida por enzimas víricas codificadas por genes de expresión tardía y liberación de los nuevos viriones.

### 4.3 Antecedentes

En 1896 el químico británico Ernest Hankin publicó un artículo en la revista *Anales del Instituto Pasteur* en el que describía una marcada actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae* en aguas tomadas de los ríos *Ganges* y *Junna* en India. Hankin sostuvo que de alguna manera esta actividad antibacteriana era responsable del reducido número de casos de cólera en las poblaciones cercanas a estos ríos. Atribuyó esta actividad a la presencia de un agente filtrable en dichas aguas que podía ser desactivado por calor (Hankin, 1896). En 1915, mientras estudiaba el crecimiento del virus vacuna en medios de cultivo libres de células, el microbiólogo británico Frederick Twort observó que cultivos bacterianos que él consideraba puros podrían estar asociados a un agente invisible y filtrable que podía destruir por completo las células de un cultivo en pequeñas zonas. El inóculo de las colonias que no pudieron crecer en un primer cultivo infectaba al nuevo cultivo con el agente filtrable, situación que podía repetirse un número indefinido de generaciones. Twort barajó varias hipótesis sobre la naturaleza de este agente filtrable e invisible que mostró ser incapaz de crecer en ausencia de cultivo bacteriano (Twort, 1915). Dos años después de la publicación de Twort, el francocanadiense Felix d'Hérelle identificó de forma independiente un efecto antagonista frente al bacilo de *Shiga* en el filtrado del líquido fecal de pacientes enfermos de disentería. Esta actividad antagonista se manifestaba en forma de pequeños halos de inhibición de aproximadamente 1mm de diámetro que aparecían en placas de medio sólido cultivadas con *Shigella*. Al igual que Hankin y Twort, atribuyó estas propiedades a agentes filtrables pero añadió que una inhibición tan localizada no podía deberse a la existencia de ninguna sustancia en el medio. D'Hérelle fue el primero en considerar a estos agentes filtrables como virus llamándolos 'Bacteriófagos' y describiendo los mismos como parásitos obligados muy selectivos. Estas observaciones fueron publicadas en el artículo: "Sobre un microbio invisible antagonista de la disentería" (d'Hérelle, 1917).

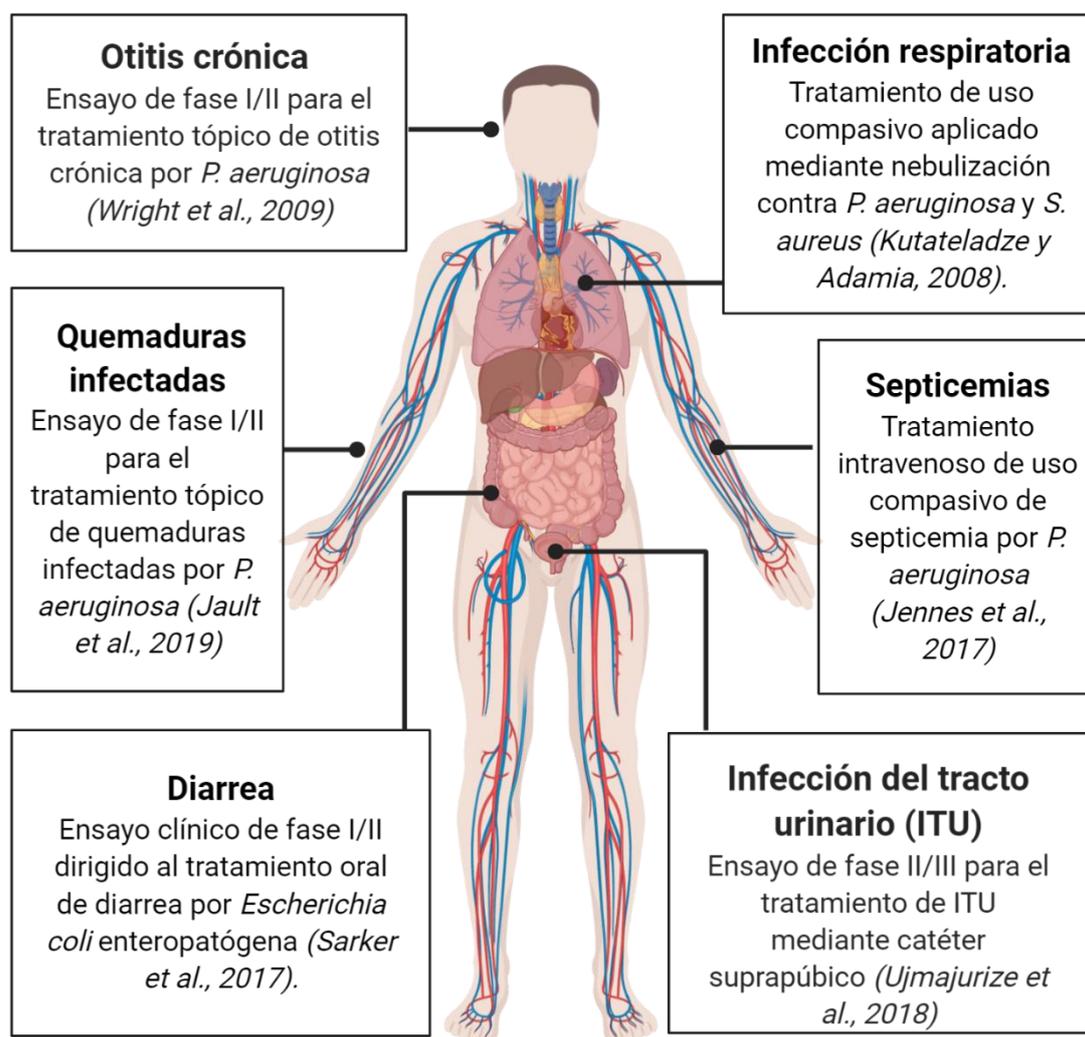
Fue precisamente d'Hérelle quien comenzó a explorar el potencial terapéutico de los bacteriófagos, primero en animales aislando fagos de heces de pollo que sirvieron para tratar exitosamente un brote de tifus aviar y seguidamente en humanos. Entre estos ensayos en humanos destaca el desarrollado en el Hospital de Enfants-Malades de París, en 1919, en el que d'Hérelle y varios trabajadores del hospital tomaron una preparación de fagos para garantizar su seguridad antes de administrarla a un niño de 12 años con disentería severa. Tras solo una administración los síntomas cesaron y el paciente se recuperó en pocos días. D'Hérelle continuó publicando varios ensayos basados en sus experiencias por todo el mundo (Sulakvelidze et al., 2001). La primera publicación científica sobre el uso de bacteriófagos en clínica vino de Bélgica en 1915 cuando Richard Bruynoghe y Joseph Maisin usaron un tratamiento a base de bacteriófagos para tratar infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus*. Describieron una clara evidencia de

mejoría de los pacientes tratados en las 48 horas posteriores, con reducción del dolor, rubor y fiebre (Bruynoghe y Maisin, 1921). El uso terapéutico de los fagos para tratar infecciones bacterianas fue muy controvertido desde el principio y no fue ampliamente aceptado por la comunidad médica. Los primeros estudios fueron muy criticados por la falta de controles apropiados y resultados inconsistentes. La falta de reproducibilidad y muchos resultados contradictorios obtenidos en los diversos estudios publicados mostraron que la evidencia del valor terapéutico de los filtrados líticos era poco convincente. Aún no se disponía de medios técnicos adecuados ni de conocimiento teórico suficiente para el desarrollo de esta estrategia clínica por lo que eran necesarias investigaciones adicionales para confirmar sus supuestos beneficios (García y López, 2002). El surgimiento de la era antibiótica con la introducción de las sulfamidas en la década de 1930 y más tarde la penicilina en la década de 1940 terminaron por desplazar por completo el interés en la investigación de los fagos y esta terapia fue olvidada por completo en los países occidentales (Wittebole et al., 2014). No obstante, algunos países del bloque de la antigua URSS, continuaron trabajando en esta línea por medio de entidades como el Instituto George Eliava de Tiflis, Georgia y el Instituto Hirszfield de Inmunología y Terapia Experimental en Wrocław, Polonia (Sulakvelidze et al., 2001). Aunque la investigación sobre fagos nunca fue abandonada en la antigua URSS, la literatura inglesa redescubrió la fagoterapia en la década de 1980 con los primeros experimentos en animales y los ensayos en humanos a principios de siglo, con el primer ensayo aleatorizado de fase I publicado en 2009 (Rhoads et al., 2009).

#### 4.4 Experiencia en ensayos clínicos

En sus primeros años de aplicación en humanos, la fagoterapia se usaban para tratar afecciones como disentería, infecciones de la piel, heridas quirúrgicas, peritonitis, septicemias, infecciones del tracto urinario y otitis externa (Wittebole et al., 2014). Después de la introducción de los antibióticos, los estudios de fagoterapia se relegaron principalmente a unos pocos países de Europa del Este. Particularmente el Instituto George Eliava de Georgia ha acumulado una gran experiencia en el desarrollo y la producción de preparaciones de fagos para uso clínico contra gran variedad de bacterias patógenas. Las aplicaciones terapéuticas de los fagos también han sido evaluadas durante décadas por el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental en Polonia. No obstante toda esta experiencia acumulada reportada en la literatura georgiana, rusa y polaca aún es de difícil acceso por barreras lingüísticas (Sulakvelidze et al., 2001). Durante los últimos años de investigación en aplicaciones terapéuticas de fagos, los estudios *in vitro* y preclínicos han

comenzado a traducirse en estudios de casos y ensayos clínicos cuidadosamente diseñados, destacando lecciones importantes que deben considerarse para avanzar en esta materia (Figura 2).



**Figura 2.** Resumen de experiencia de uso de fagoterapia en ensayos clínicos contemporáneos y casos de uso compasivo (modificado de Furfaro et al., 2018).

#### 4.4.1 Fagoterapia tópica en el tratamiento de quemaduras

Un estudio reciente realizado con 27 pacientes de hospitales de Francia y Bélgica comparó la eficacia y la seguridad de la fagoterapia tópica frente al tratamiento estándar de pacientes con quemaduras (Jault et al., 2019). Para ello utilizaron un cóctel de bacteriófagos virulentos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. A los participantes se les asignó aleatoriamente un cóctel de 12 bacteriófagos virulentos contra *P. aeruginosa* (106 UFP/ml) o bien tratamiento estándar con crema de emulsión de plata y sulfadiazina al 1%. La vía de administración fue tópica en ambos casos durante siete días, en un periodo total de seguimiento de 14 días.

El objetivo terapéutico fue alcanzado en 144 horas de media en el grupo de tratamiento con fagos y en 47 horas en el grupo de atención estándar. Tres de los 13 participantes (23%) analizados mostraron eventos adversos en el grupo de tratamiento con fagos frente a siete de 13 (54%) en el grupo de atención estándar. Las bacterias aisladas de pacientes del tratamiento fallido de fagos resultaron ser resistentes a dosis bajas de fagos. Este estudio mostró que el tratamiento con fagos necesitó más tiempo para disminuir la carga bacteriana en las heridas por quemaduras que el tratamiento estándar. En este sentido, se justifican los estudios que aumentan la concentración de fagos y el uso de "fagogramas" con más pacientes. Este ensayo está registrado en la Base de Datos Europea de ensayos clínicos N°: 201400071465 y en ClinicalTrials.gov, N°: NCT02116010.

#### *4.4.2 Fagoterapia tópica en el tratamiento de infecciones de oído*

Un ensayo de fase I / II realizado en Reino Unido evaluó la eficacia y seguridad de los fagos para el tratamiento de infecciones crónicas del oído por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos. En este estudio aleatorizado de doble ciego de 24 pacientes, se administró un cóctel comercial de seis fagos (BiophagePA,  $6 \times 10^5$  UFP) o placebo a cada grupo de pacientes. El seguimiento del tratamiento reveló una mejora significativa tanto en la condición clínica como en la experiencia subjetiva del paciente para el grupo tratado con fagos en comparación con el control. No se observaron reacciones adversas en el grupo tratado con fagos. La replicación *in vivo* de fagos en los pacientes fue evidente durante 23 días, con una recuperación media de fagos 200 veces superior a la concentración inicial. La eliminación de los fagos se observó cuando la infección por *P. aeruginosa* se resolvió en los pacientes. Las reducciones en los números generales de *P. aeruginosa* en el grupo de tratamiento con fagos fueron generalmente modestas pero la medición probablemente se vio comprometida por la falta de acceso a partes profundas del canal auditivo. Los autores del estudio sostienen que la fagoterapia continuada de tres a cuatro semanas podría ser beneficiosa para este tipo de pacientes (Wright et al., 2009).

#### *4.4.3 Fagoterapia oral en el tratamiento de diarrea*

Varios estudios han explorado la efectividad de la administración oral de fagos en el tratamiento de diarreas (Sarker y Brussow, 2016). El centro de investigación Nestlé y el Centro Internacional para la Investigación de la Diarrea colaboraron durante años para probar la eficacia de la terapia fágica en el tratamiento de la diarrea. En uno de estos estudios Sarker y sus colaboradores seleccionaron a 120 niños de Bangladés que presentaban diarrea aguda de origen bacteriano dividiéndolos en tres grupos. A un primer grupo se le administró un cóctel de fagos similares a

T4 ( $3,6 \times 10^8$  UFP), al segundo grupo le fue administrada una preparación comercial de fagos (*ColiProteus* de Microgen<sup>®</sup>,  $1,4 \times 10^9$  UFP) y por último un grupo placebo al que se le asignó un tratamiento estándar con suero de rehidratación oral.

Los resultados de este estudio aleatorio ciego no mostraron efectos adversos derivados de la administración oral de fagos. Los fagos resistieron el paso por el estómago pero no hubo evidencia de una amplificación efectiva a nivel intestinal. Ni los cócteles de derivados de T4 ni el comercial de Microgen<sup>®</sup> mostraron efectos favorables significativos en comparación con la terapia de rehidratación estándar. Las razones probables de la falta de efectos significativos fueron una presencia de *Escherichia coli* menor de la esperada (60%) y la incidencia de infecciones por especies mixtas, la presencia de coliformes no susceptibles e insuficiente título de fago (Sarker et al., 2017).

#### 4.4.4 Fagoterapia intravenosa en el tratamiento de septicemias

Respecto a la fagoterapia intravenosa en humanos Speck y Smithyman recopilaron datos de informes de los últimos 80 años, principalmente en septicemias graves como la causada por *S. aureus* y en el caso de la fiebre tifoidea. Encontraron que casi 1000 pacientes fueron tratados con éxito con fagoterapia intravenosa casi sin reacciones adversas descritas. En gran medida las pocas reacciones adversas graves descritas, como shock séptico o enfermedad del suero, podrían deberse a impurezas de las primeras preparaciones de fagos. Los autores concluyeron que probablemente la administración intravenosa de fagos sea segura y eficaz (Speck y Smithyman, 2015). Si bien la evidencia que respalda su uso es amplia, esta tiende a ser descartada debido a la falta de cumplimiento en estándares clínicos modernos que presentan estos estudios.

Aunque los ensayos clínicos modernos están aún por llegar, existen casos de fagoterapia intravenosa de uso compasivo que se han llevado a cabo con éxito. En pacientes con enfermedades terminales y con las opciones terapéuticas convencionales agotadas pueden ponerse en práctica tratamientos experimentales de manera excepcional (Furfaro et al., 2018). El uso compasivo nos permite una aplicación clínica inmediata y una obtención de datos valiosos para investigaciones futuras. No obstante los resultados obtenidos en estos casos no suelen ser reproducibles ya que se limitan a un solo paciente en condiciones excepcionales y no suelen ser suficientes para la aprobación de una terapia.

Uno de estos casos de uso compasivo es el de un paciente de 61 años con múltiples comorbilidades que desarrolló una septicemia por *Pseudomona aeruginosa*, posiblemente originada por infección de úlceras por presión a nivel de intestino. La cepa de *P. aeruginosa* era sensible exclusivamente

a Colistina, pero el tratamiento con este antibiótico tuvo que ser abortado tras detectarse daño renal. Así, se inició un tratamiento con un cóctel de dos fagos administrado cada 6 horas por vía intravenosa, combinado con irrigación local de las heridas cada 8 horas durante diez días. El tratamiento rápidamente comenzó a dar resultado obteniendo hemocultivos negativos y reduciendo los niveles de proteína C reactiva y la temperatura corporal. A pesar del éxito de la terapia el paciente finalmente murió cuatro meses después por un paro cardíaco a causa de una sepsis por *Klebsiella pneumoniae* (Jennes et al., 2017).

#### 4.4.5 Fagoterapia inhalada en el tratamiento de infecciones respiratorias

Los informes de fagoterapia para el tratamiento de infecciones respiratorias en humanos son escasos. En Georgia se documentó el caso de un paciente con fibrosis quística que presentaba una infección crónica por *P. aeruginosa* y *S. aureus*. La terapia con fagos se realizó utilizando un cóctel de fagos Pyo producido por el Instituto Eliava. Este cóctel se administró mediante nebulización tres veces al día durante seis días en tres ciclos de tratamiento. El número de *P. aeruginosa* se redujo considerablemente, sin embargo, el tratamiento no fue efectivo contra *S. aureus* por lo que se incluyó tetraciclina en el último ciclo de tratamiento. Finalmente se redujo también la concentración de *S. aureus* y no se observaron efectos adversos en el paciente (Kutateladze y Adamia, 2008). Se han dado importantes avances recientemente en la formulación de fagos mediante *spray dry* consiguiendo incrementar la dosis por inspiración hasta  $10^8$  UFC. Esto puede mejorar considerablemente los resultados clínicos de los tratamientos por fagoterapia inhalatoria en infecciones respiratorias (Matinkhoo et al., 2011).

#### 4.4.6 Fagoterapia parenteral en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU)

La fagoterapia para el tratamiento de ITU es una de las aplicaciones clínicas más prometedoras de los fagos. Un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, de fase II/III (registro de ensayos clínicos n° NCT03140085) analizó la eficacia de la administración intravesical del cóctel de fagos comercial Pyo (Ujmajuridze et al., 2018). En la primera etapa del ensayo, 130 pacientes sometidos a cirugía de próstata se examinaron para detectar infecciones urinarias postoperatorias. De estos, 118 fueron seleccionados tras mostrar en el urocultivo más de  $10^4$  UFC/ml de los patógenos *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus sp*, *P. aeruginosa* o *Proteus mirabilis*. El análisis *in vitro* mostró una sensibilidad para las bacterias patógenas al bacteriófago Pyo (producto comercial del Instituto Eliava) del 41% (48/118) y los ciclos de adaptación del bacteriófago Pyo aumentaron su sensibilidad al 75% (88/118).

En la segunda etapa, nueve pacientes con infecciones causadas por bacterias sensibles a Pyo fueron tratados con 20 ml de  $10^7$ - $10^9$  UFP /ml mediante catéter suprapúbico dos veces cada 24 h durante siete días. La orina de los pacientes se cultivó posteriormente siete días después de la cirugía. Después de la terapia, los títulos de los patógenos disminuyeron en 1 a 5 log UFC / ml en seis de nueve pacientes. Solo un paciente infectado por *P. aeruginosa* requirió tratamiento con antibióticos después de un pico de fiebre. No se detectaron efectos adversos de la terapia con fagos. Los autores del estudio esperan seguir definiendo aún más el papel de esta opción de tratamiento potencialmente revolucionaria.

En los próximos años se espera ver un aumento de los ensayos clínicos de fagoterapia de fase I y su progreso hacia las fases II y III. Los estudios presentados han evaluado principalmente un enfoque convencional de la terapia con fagos. En el siguiente apartado, se incluyen enfoques innovadores que han surgido del estudio de la biología de los fagos y la experiencia acumulada de su uso como agentes terapéuticos.

#### 4.5 Fagoterapia convencional

La fagoterapia consiste en el uso de fagos de ciclo lítico como único agente terapéutico para el tratamiento de una infección bacteriana. La terapia de fagos segura y eficaz implica el control de las interacciones entre fago y paciente, así como de las interacciones entre fagos y bacterias (Abubakar, 2016).

La naturaleza replicativa de los fagos se ha destacado como una característica única en esta terapia. La fagoterapia puede aplicarse mediante estrategias activas o pasivas. En regímenes de tratamiento activo, los fagos se introducen a bajas concentraciones en relación con la concentración de bacterias. La terapia se basa en la capacidad del fago para replicarse y liberar su progenie para infectar a todas las bacterias (Payne y Jansen, 2000) . En este caso, el número de células bacterianas debería ser mayor que el umbral de proliferación para mantener una multiplicación activa. Este umbral de proliferación es una función de la velocidad a la que un fago se encuentra con una bacteria, el número de viriones liberados tras la lisis de la célula hospedadora y la descomposición del fago a través de la inactivación o eliminación por el sistema retículo-endotelial del bazo y el hígado. En otras palabras, la amplificación del fago solo puede compensar la descomposición del fago por encima de este umbral (Abedon y Thomas-Abedon 2010). Los tratamientos activos con fagos tienen características de dosificación autorregulada que limitan la producción de fagos a focos reales de infección en lugar de sistémicamente. En regímenes de

tratamiento pasivo, las dosis inicial de fagos deben ser lo suficientemente altas para garantizar la muerte de cada célula sin depender de la replicación. En ese tipo de tratamiento debemos tener en cuenta parámetros fundamentales como el número de viriones liberados tras la lisis de la célula hospedadora, la tasa de propagación, el título de muerte (número de fagos administrados calculado mediante recuento de fagos en placa) o el de multiplicidad de infección (número de fagos administrados por célula bacteriana) (Abedon, 2011).

A pesar de las características ventajosas de los fagos como agentes antibacterianos su aplicación clínica puede verse obstaculizada por distintos aspectos. La autorreplicación de los fagos da como resultado una farmacocinética compleja por lo que todavía existe una falta comprensión de la farmacocinética de los fagos. El conocimiento limitado sobre la farmacocinética de fagos ya ha contribuido al fracaso de los experimentos de terapia con fagos (Abedon y Thomas-Abedon, 2010). Otro aspecto a tener en cuenta es la aparición de resistencia bacteriana que puede darse con relativa rapidez. Dentro de un entorno natural, los fagos y su huésped bacteriano evolucionarán y se adaptarán continuamente para preservar la capacidad infecciosa o resistirla, respectivamente, entrando en una carrera evolutiva (Stern y Sorek, 2011). Aunque la capacidad evolutiva de los fagos para superar la resistencia bacteriana es una ventaja sobre la terapia con antibióticos, esto puede no ser suficientemente como para garantizar el uso clínico de la terapia con fagos (Gordillo y Barr, 2019). Una desventaja adicional es que los fagos generalmente presentan un espectro estrecho. La especificidad está determinada por los receptores de superficie, los mecanismos de defensa antivirales y las interacciones específicas con la maquinaria del huésped. Debido a esta alta especificidad, el uso de fagos requiere una identificación precisa del agente etiológico de la infección (Abdelkader et al. 2019).

Una estrategia para abordar los problemas derivados de la especificidad de los fagos y la posible aparición de resistencias es el uso de cócteles de varios fagos. El uso de varios fagos reduce la capacidad del hospedador de mitigar la adsorción vírica y obstaculiza los mecanismos de protección genética del huésped. Los cócteles de fagos van dirigidos a diferentes receptores, por lo que pueden diseñarse para atacar una sola cepa bacteriana, múltiples cepas de una misma especie o múltiples especies. Estos cócteles requieren procesos de preparación y purificación más largos y complejos. Además presentan unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas poco predecibles, lo que complica aún más su manejo terapéutico (Chan y Abedon, 2012).

## 4.6 Nuevos enfoques terapéuticos

### 4.6.1 Terapia combinada

La sinergia farmacológica ocurre cuando el efecto combinado de dos agentes terapéuticos es mayor que la suma de sus efectos individuales, un fenómeno que produce tasas significativamente más altas de éxito del tratamiento (Torres-Barceló y Hochberg, 2016). El término sinergia fago-antibiótico (PAS) se utiliza para describir el fenómeno en el que concentraciones subletales de antibióticos incrementan en gran medida la producción bacteriana de fagos, aumentando así el deterioro bacteriano mediado por el mismo (Comeau et al., 2007). El beneficio esperado de este enfoque dual podría ser una supresión bacteriana más fuerte y una reducción de la capacidad bacteriana de desarrollar resistencia a fagos y antibióticos (Torres-Barcelo y Hochberg, 2016). De hecho, varios estudios que investigan el beneficio combinado de fagos y antibióticos tradicionales han proporcionado resultados alentadores para algunas combinaciones de fagos y antibióticos (Tagliaferri et al., 2019). Dada la inmensa diversidad de fagos, todavía existe una gran cantidad de combinaciones de fagos y antibióticos por probar. Además, las interacciones positivas entre dos agentes antimicrobianos pueden depender en gran medida de parámetros de tratamiento como dosis, frecuencia, tiempo de administración u orden de administración (Torres-Barceló et al., 2018). Concretamente, las terapias de fagos y antibióticos podrían beneficiarse de la administración secuencial. Se ha observado que el tratamiento con fagos antes de los antibióticos puede lograr un efecto terapéutico mejorado si el antibiótico se administra después de que los fagos hayan comenzado a combatir la infección. Este efecto del orden de administración se ha documentado en al menos dos estudios con *P. aeruginosa* en los que se muestra como optimizar los tiempos de administración puede potenciar la eficacia terapéutica (Chaudhry et al., 2017).

Desde que se describió el concepto de PAS se han descubierto mecanismos adicionales a través de los cuales la terapia combinada con fagos y antibióticos puede resultar ventajosa. Uno de estos mecanismos se basa en observaciones de Torres-Barceló y Hochberg que sugieren que la evolución bacteriana tiene limitaciones genéticas por las cuales la adquisición de resistencia contra fagos puede conllevar costos de aptitud (Torres-Barcelo y Hochberg, 2016). Se han documentado casos en los que mutaciones bacterianas que confieren resistencias a fagos restauran la sensibilidad a antibióticos en dichas bacterias. Esto ocurre en casos en los que el fago interactúa con los sistemas de salida de antibióticos bacterianos (Chan et al., 2016). Comprender y explotar estos costos de aptitud para las bacterias resistentes durante la terapia combinada puede ser una vía de investigación prometedora.

Un segundo mecanismo se basa en la capacidad de los fagos para degradar polisacáridos que componen estructuras que envuelven la célula bacteriana, como cápsulas o matrices de *biofilm*. La cápsula bacteriana y las matrices de *biofilm* son importantes factores de virulencia que puede bloquear la acción de los antibióticos y de la respuesta inmune. Muchos fagos están equipados con depolimerasas de polisacáridos asociadas a sus fibras caudales o espículas basales. Estas depolimerasas degradan los polisacáridos que componen las estructuras que envuelven la célula bacteriana facilitando el acceso a los receptores de la superficie celular del huésped. La capacidad de los fagos de atacar y eliminar estas estructuras puede aprovecharse para promover una mejor penetración de los antibióticos en tratamientos de terapia combinada. Bedi y sus colaboradores propusieron este mecanismo para explicar la destrucción del *biofilm* de *Klebsiella pneumoniae*, tras el tratamiento del mismo con fagos y amoxicilina (Bedi et al., 2009).

#### 4.6.2 Enzimas codificadas

La idea intuitiva de utilizar un depredador natural para tratar infecciones bacterianas inspiró el uso de fagos con fines terapéuticos. No obstante, el conocimiento profundo de la biología de los fagos ha dado otras vías de investigación hacia el desarrollo de nuevos antibacterianos. Los fagos codifican en su genoma una serie de enzimas necesarias para romper estructuras de la célula bacteriana durante su ciclo infectivo. Estas enzimas, llamadas lisinas, son utilizadas por los fagos para destruir la pared celular de una bacteria objetivo. Su acción antibacteriana directa los convierte en posibles reemplazos de antibióticos o en coadyuvantes cuando actúan junto con otros antibacterianos. El potencial de las lisinas de fagos o enzibióticos como antibacterianos para su uso en medicina se describió por primera vez en 2001. Las primeras compañías comenzaron a desarrollar antibióticos inspirados en lisinas de fago unos 10 años después (Fischetti, 2018).

En el apartado anterior se trató el uso de fagos provistos de polisacárido depolimerasas como coadyuvante para atacar estructuras de exopolisacáridos en estrategias de terapia combinada. Adicionalmente, se han diseñado depolimerasas de polisacáridos modificadas mediante bioingeniería que pueden resultar también útiles en tratamientos combinados de infecciones causadas por bacterias encapsuladas o productoras de *biofilms* (Mushtaq et al., 2005). A pesar de su utilidad terapéutica, las depolimerasas de polisacáridos no presentan actividad antibacteriana por sí mismas, lo que hace al siguiente grupo de lisinas especialmente prometedor.

Hacia el final del ciclo lítico los fagos producen las llamadas endolisinas. Estas son enzimas libres y solubles que facilitan la lisis de la célula hospedadora y la liberación de la progenie viral. Las endolisinas degradan ampliamente la capa de peptidoglicano desde el interior celular provocando una lisis osmótica repentina de la célula bacteriana y la dispersión de la progenie viral

(Abdelkader et al. 2019). Las endolisinas se clasifican según el tipo de enlace que hidrolizan en la estructura del peptidoglicano, las tres clases principales son glicosidasas, amidasas y endopeptidasas (Maciejewska et al., 2018). El espectro de su actividad viene determinado por la composición química del peptidoglucano, que se conserva en gran medida a nivel de especie, lo que hace que las endolisinas tengan un espectro de acción más amplio en comparación con los fagos. Otra ventaja respecto a los fagos es que las endolisinas presentan un comportamiento farmacocinético más parecido a fármacos convencionales.

Las propiedades naturales de lisis de la pared celular de las endolisinas les han dado un gran potencial como agentes antibacterianos. Sin embargo, la mayoría de los informes de uso exitoso de endolisinas con fines terapéuticos han sido contra bacterias Gram positivas. Esto se debe a que las membranas externas de las Gram negativas actúan como una barrera para estas enzimas. Pocas endolisinas naturales tienen la capacidad de eludir la membrana externa y desarrollar su actividad contra Gram negativas. Por esta razón, se han ideado estrategias para evitar el obstáculo de la membrana externa, como la administración conjunta de agentes permeabilizantes (polimixinas, aminoglucósidos, quelantes y AEDT) o endolisinas modificadas mediante bioingeniería (Ghose y Euler, 2020).

Las estrategias habituales en ingeniería de proteínas pueden aplicarse para aumentar el potencial terapéutico de las lisinas de fago. El método más utilizado es el intercambio de dominios (Gerstmans et al., 2018). La combinación aleatoria de la composición modular de las lisinas que comprende la unión de la pared celular y los dominios enzimáticamente activos permite mejorar propiedades antibacterianas tales como la especificidad, la actividad, la estabilidad y la solubilidad. Además, la fusión de módulos adicionales puede expandir o modular su actividad. Un ejemplo de dicha bioingeniería se da en las artilisinas (Artilysin<sup>®</sup>), donde la adición de oligopéptidos policatiónicos a la endolisina natural otorga la capacidad de romper la membrana externa y matar a los patógenos multirresistentes Gram negativos como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Briers et al., 2014).

Se han completado dos ensayos de fase I para las endolisinas CF-301 y SAL200 que han demostrado su seguridad al no mostrar efectos adversos. También se han completado dos ensayos de fase I/II pero sus resultados no son todavía públicos. Otros dos ensayos clínicos de fase II están aún en curso (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ensayos clínicos con lisinas de fago (Modificado de Abdelkader et al., 2019).

Estudio	Fecha de registro	Fase	Numero de registro de ensayo clínico	Resultados	Publicaciones
A Study to Evaluate the Safety Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of N-Rephasin® SAL200 in Healthy Male Volunteers	Mayo 2013	I	NTC01855048	No se observaron efectos adversos importantes. AUC y Cmax incrementaron proporcionalmente a la dosis. Se recomiendan dosis superiores a 1mg/kg .	(Jun et al., 2017)
A Placebo-Controlled, Dose-Escalating Study to examine the Safety and Tolerability of single Intravenous Doses of CF-301 in Healthy Subject	Mayo 2015	I	NTC02439359	Una dosis de CF-301 tiene poca probabilidad de producir una respuesta inflamatoria. No se observe relacion entre anticuerpos especificos y factores de hipersensibilidad	(jandourek et al., 2017)
The effect of Gladskin on Disease Severity and the skin Microbiome, including Staphylococcus aureus, in Patients with Atopic Dermatitis Phase Iia Clinical Study of N-Rephasin SAL200	Julio 2016	I/II	NTC02840955	En curso	(Totté et al., 2017)
Phase Iia Clinical Study of N-Raphasin® SAL200	Marzo 2017	IIa	NCT03089697	En curso	-
Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of CF-301 vs. Placebo in Addition to Antibacterial Therapy for Treatment of S. aureus Bacteriemia	Mayo 2017	II	NCT0316344	En curso	-

Las enzimas líticas han pasado por la evaluación clínica y preclínica mucho más rápido que los fagos a pesar de haberse considerado su aplicación en medicina humana hace solo 20 años. Las lisinas no pueden replicarse ni evolucionar, tienen un espectro de actividad más amplio y una farmacocinética más sencilla que los fagos. Esto permite que los estándares utilizados en el análisis preclínico de antibióticos podrían traducirse más fácilmente a la evaluación preclínica de las lisinas en comparación con los fagos (Abdelkader et al., 2019). Por esta razón las lisinas son los productos derivados de fagos más avanzados y con mayor potencial de implementación efectiva en medicina humana. Los próximos años serán cruciales para la evaluación de las lisinas para su uso como compuestos farmacéuticos (Czaplewski et al., 2016).

#### 4.6.3 Fagos modificados mediante bioingeniería

Los avances recientes en técnicas de bioingeniería y el desarrollo rápido de recursos proporcionados por un conocimiento cada vez mayor del genoma de los fagos han permitido la investigación de métodos para sortear las limitaciones actuales de la fagoterapia. La bioingeniería podría aumentar drásticamente el potencial terapéutico de los fagos superando limitaciones actuales como el espectro estrecho de hospedadores o la respuesta inmune del paciente.

El espectro de los fagos puede ampliarse o cambiarse mediante técnicas de edición genética. El intercambio de los genes que codifican la proteína de unión al receptor bacteriano entre diferentes fagos puede cambiar la especificidad de éste por su hospedador. Machichi y colaboradores reemplazaron genes del fago T2 que codificaban proteínas de unión al receptor bacteriano por los homólogos del fago IP008 que tiene un rango de hospedadores más amplio. El fago recombinante mostró el amplio espectro del fago IP008 manteniendo el carácter lítico del T2 (Mahichi et al., 2009). Otro grupo de investigadores reemplazó los genes de proteínas de reconocimiento de las fibras caudales del fago T2 por los del fago PP01 cambiando el hospedador natural de T2 (*E. coli*-K12) por *E. coli* O157:H7 (Yoichi et al., 2005). Este intercambio de genes de proteínas de unión al receptor puede incluso llevarse a cabo con fagos de espectros más distantes (Ando et al., 2015).

Otra limitación importante de la terapia con fagos es que pueden ser reconocidos e inactivados por el sistema inmune del paciente. Merrill y colaboradores diseñaron una técnica que les permitió aislar fagos  $\lambda$  mutantes capaces de evadir el atrapamiento del sistema retículo endotelial permitiéndoles permanecer en circulación sanguínea un mayor periodo de tiempo. Los fagos  $\lambda$  mutantes poseían una mutación común de sustitución del residuo de lisina 158 por ácido glutámico en la proteína E de la cápside (Merrill et al. 1996). El mismo grupo demostró que esta mutación es suficiente para obtener fagos  $\lambda$  "de circulación larga" (Vitiello et al. 2005). Una comprensión más profunda de los epítomos de fagos puede ser útil en el diseño de fagos modificados con farmacocinética mejorada.

Los nuevos avances en bioingeniería también potencian la investigación de estrategias que van más allá de los enfoques tradicionales del uso de fagos ampliando sus aplicaciones terapéuticas. Los fagos pueden modificarse usando técnicas de edición genética para entregar genes que puedan introducir mecanismos adicionales que mejoren su actividad antimicrobiana. Lu y Collins reforzaron la capacidad del fago T7 de degradar *biofilm* mediante la liberación de la enzima degradadora del exopolisacárido Dispersina B. Para ello modificaron el fago T7 de *E. coli* para expresar la enzima Dispersina B en el interior de la célula hospedadora. El virus diseñado fue capaz de reducir significativamente el recuento de células en el *biofilm* en comparación con el fago T7 control (Lu y Collins, 2007). Del mismo modo, Pei y Lamas-Samanamud modificaron el

fago T7 para expresar una enzima lactonasa que interfiere con la detección del *quorum sensing*, que juega un papel importante en la formación de *biofilms*. El fago modificado consiguió una reducción de la formación de *biofilm* más amplia (74,9 %) respecto a la placa control que el fago T7 no modificado (31.7%) (Pei y Lamas-samanamud, 2014).

También pueden insertarse en la célula bacteriana secuencias CRISPR/Cas9 que permitan inactivar genes específicos. Bikard y col. diseñaron un fago basado en Cas9 dirigido a un gen de resistencia a kanamicina de *Staphylococcus aureus*. El fago de *S. aureus* modificado que entrego el gen condujo a una reducción de bacterias resistentes a la kanamicina, pero no provocó ningún efecto sobre las bacterias sensibles a la Kanamicina. Este efecto antibacteriano específico se confirmó utilizando el modelo de colonización de piel de ratón (Bikard et al., 2014).

#### 4.7 Comparativa con antibióticos

Los bacteriófagos presentan diferencias significativas respecto a los antibióticos como agentes terapéuticos (Tabla 2). En este apartado se discuten los aspectos clave que apoyan el uso terapéutico de los bacteriófagos frente a los antibióticos y los obstáculos que se deben superar aun para su desarrollo e implantación efectiva en medicina.

**Tabla 2.** Aspectos diferenciales clave de los fagos frente a los antibióticos como agentes terapéuticos.

Aspectos clave	Antibióticos	Bacteriófagos
Espectro	Amplio Espectro	Muy estrecho. Evita daños sobre la microbiota. Requiere identificación precisa del agente causal
Seguridad	Reacciones adversas frecuentes incluidas las alergias.	No reacciones adversas. Necesidad de garantizar seguridad genética.
Resistencias	Incidencia creciente	Múltiples estrategias para salvar la resistencia.
Cinética	Bien conocida	Compleja influenciada por la replicación y eliminación simultaneas.
Gastos de desarrollo	Elevados	De moderado a bajo
Experiencia clínica	Dilatada	Pocos ensayos clínicos. Se necesitan establecer criterios de dosis, posología...
Marco Legal	Bien establecido	Inexistente

Los fagos son entidades naturales en constante evolución y su principal ventaja es su versatilidad. Debido a su diversidad genética, abundancia y ubicuidad, existe una fuente prácticamente ilimitada de fagos que se puede administrar a través de diferentes estrategias. Además, gracias a su biología sencilla y a un mayor conocimiento de su genoma, los fagos pueden modificarse fácilmente para mejorar sus propiedades terapéuticas.

La lisis inducida por los fagos al final del ciclo lítico es un proceso clave en la terapéutica basada en fagos. Esto dota a los fagos de una acción bactericida muy efectiva que afecta por igual a Gram positivas y Gram negativas. Por su parte, la mayoría de los antibióticos se dirigen a una de las tres vías metabólicas procariontas clave: síntesis de proteínas, replicación de ADN y síntesis de la pared celular bacteriana y algunos de ellos solo inhiben el crecimiento bacteriano. La mayoría de los enfoques posibles para estas dianas ya han sido propuestos y analizados (Urahn et al., 2016). Esto dificulta aún más el proceso de desarrollo de nuevos antibióticos que generalmente requiere millones de dólares y varios años para obtener un candidato apto para uso terapéutico. En comparación, aislar y seleccionar nuevos bacteriófagos es menos costoso en términos de tiempo y dinero (Golkar et al., 2014).

La terapia con fagos tiene un estrecho espectro antibacteriano con un efecto limitado a una sola especie o, en algunos casos, una sola cepa dentro de una especie. Esta especificidad es simultáneamente una ventaja y una desventaja para la fagoterapia. Los fagos afectan selectivamente a la bacteria objetivo evitando los daños colaterales al resto de bacterias que producen los tratamientos con antibióticos. Gracias a esta gran especificidad, la fagoterapia está exenta de efectos secundarios relacionados con el desbalance de la microbiota, como diarrea asociada a antibióticos y evita el crecimiento de patógenos secundarios, como *Candida* sp. o *Clostridium difficile* (Langdon et al., 2016). La gran especificidad de los fagos también supone ciertos inconvenientes. Por un lado, demanda un diagnóstico preciso del agente causal de la infección, a veces a nivel de cepa, lo que consume mucho tiempo y recursos analíticos. Por otro lado, implica la selección de un fago específico para cada infección. El proceso de selección podría agilizarse desarrollando colecciones o bibliotecas de fagos compuestas por fagos fácilmente disponibles (Nilsson, 2016). Estos inconvenientes hacen que las estrategias que implican a un solo fago solo sean posibles para las infecciones crónicas. Para tratar infecciones agudas, se propone el uso de cócteles de fagos que abarquen todo el espectro posible de cepas. Las desventajas de los cócteles de fago son los procedimientos complejos necesarios para la producción de un cóctel adecuado y estable.

Hasta la fecha los fagos no han mostrado ningún efecto secundario ni riesgo de toxicidad en modelos animales. En esto difieren de los antibióticos que presentan reacciones adversas perjudiciales para el paciente, prolongan la hospitalización e incrementan el gasto sanitario

(Cunha, 2001). Algunas de estas reacciones adversas incluyen reacciones de hipersensibilidad que pueden reducir las opciones de tratamiento para pacientes con alergia a antibióticos (Terico y Gallagher, 2014). La terapia con fagos puede ser una opción valiosa para pacientes con alergias a antibióticos. Un problema que entorpece el uso de bacteriófagos y del que los antibióticos están exentos se debe a la habilidad innata potencial de los fagos para transferir ADN de una bacteria a otra. Este proceso de transferencia horizontal, llamado transducción, podría ser responsable de aportar determinantes de patogenicidad y factores de virulencia, facilitando la aparición de nuevas bacterias patógenas o nuevas resistencias. En este sentido, para incrementar la seguridad de los fagos habría que seleccionar fagos sin capacidad de transmisión genética o modificarlos mediante bioingeniería para eliminar este proceso natural (Reina y Reina, 2018). Una consideración final en cuanto a seguridad es que la lisis bacteriana inducida por los fagos hacia el final del ciclo lítico determina la liberación de elementos bacterianos, como las endotoxinas de Gram negativas, que pueden llegar a provocar un shock séptico. Este fenómeno se da también con el uso de diversos antibióticos. No obstante, a diferencia de éstos, los fagos pueden ser modificados mediante técnicas de ingeniería genética para abordar este problema (Hagens et al., 2004).

Una de las mayores ventajas de los fagos sobre los antibióticos es su actividad anti *biofilm*. La capacidad de destruir estas estructuras imposibles de penetrar por los antibióticos es especialmente útil en el tratamiento de infecciones crónicas. Sin embargo, la eliminación de *biofilms* maduros puede resultar difícil en la práctica clínica necesitando de periodos largos de tratamiento, dosis frecuentes de fagos y terapia combinada con antibióticos (Abedon, 2016).

Otra ventaja clave de la terapia de fagos sobre los tratamientos convencionales radica en las estrategias posibles para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana. En primer lugar, el uso de cócteles de varios fagos dirigidos a diferentes receptores mejora la capacidad de los fagos de sobreponerse a los mecanismos de resistencia del huésped. La ingeniería genética también puede proporcionar un medio para mejorar la diversidad y la eficiencia de los fagos para evitar la resistencia. Otra consideración es que las mutaciones bacterianas que confieren resistencia a los fagos a menudo resultan en costos de aptitud para la bacteria resistente. Comprender y explotar estos costos de aptitud durante la terapia es una vía de investigación prometedora.

La naturaleza replicativa de los fagos se ha destacado como una característica única en esta terapia. La capacidad de los fagos de distribuirse ampliamente mediante administración sistémica y de replicarse en presencia del huésped con carácter autolimitado son cualidades que la mayoría de los antibióticos no tienen. No obstante, los fagos también pueden ser reconocidos por el sistema inmune y ser rápidamente eliminados del sistema circulatorio por el sistema retículo endotelial o la inmunidad adquirida antes de que lleguen a los tejidos infectados, disminuyendo con ello su eficacia, especialmente en administraciones repetidas y prolongadas (Abedon y Thomas-Abedon,

2010). La replicación y destrucción simultáneas de fagos da como resultado una farmacocinética compleja, por lo que todavía existe una falta relativa en la comprensión de la farmacocinética de los fagos.

El potencial de replicación y evolución de los fagos los hace distintos de cualquier otro antibacteriano. Estas capacidades únicas, excluyen a los fagos de cualquier marco regulatorio existente para el proceso de aprobación de ensayos clínicos y representan un factor de retraso significativo en su aprobación como medicamentos (Abdelkader et al., 2019). Actualmente no existe un marco que defina explícitamente los fagos en el contexto de los medicamentos para uso en humanos. La Agencia Europea del Medicamento ha reconocido que los aspectos legales han obstaculizado y retrasado la evaluación de bacteriófagos y la innovación terapéutica exitosa (Pelfrene et al., 2016). Es necesario un debate continuo entre los investigadores y las autoridades competentes para establecer un marco legal específico que posibilite la introducción regulada de la fagoterapia en la medicina occidental.

## 5. Conclusiones

1. La resistencia a antibióticos es hoy es una de las grandes amenazas para la salud pública a nivel mundial y se necesitan nuevas opciones terapéuticas para luchar contra ella. Reanudar el estudio de los fagos como alternativa terapéutica es una de las estrategias posibles para afrontar este reto.
2. Aunque el uso de fagos contra las infecciones bacterianas ha existido durante más de un siglo, la crisis de resistencia a los antibióticos ha renovado el interés por la fagoterapia.
3. En los últimos años ha observado un número creciente de ensayos clínicos de fase I / II modernos que describen la seguridad y la eficacia de la fagoterapia. No existe un enfoque único efectivo para el uso clínico de los fagos. Esta versatilidad es una de sus mayores ventajas.
4. La fagoterapia convencional ha derivado en nuevas estrategias como el uso de enzimas líticas de fagos, la terapia combinada con antibióticos o el uso de fagos optimizados mediante ingeniería genética, que expanden las posibilidades terapéuticas de los fagos.
5. Los fagos nos aportan una gran cantidad de recursos y nuevas estrategias terapéuticas que deben incluirse en nuestro repertorio de tratamientos contra las bacterias resistentes a antibióticos. No obstante, se deben llenar algunas lagunas de conocimiento antes de que podamos estandarizar el manejo terapéutico de los fagos y establecer marcos legales adecuados. El renovado interés en el campo de la terapia con fagos nos da razones para ser optimistas de que estos desafíos se pueden enfrentar en los próximos años.

## 6. Bibliografía

Abdelkader K, Gerstmans H, Saafan A, Dishisha T, Briers Y. The preclinical and clinical progress of bacteriophages and their lytic enzymes: The parts are easier than the whole. *Viruses* 2019; 11(2): 1-16.

Abedon S. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Adv. Appl. Microbiol.* 2011; 77: 1-40.

Abedon ST, Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010; 11(1): 28-47.

Abubakar S. Novel uses of bacteriophages in the treatment of human infections and antibiotic resistance. *Am. J. Biosci.* 2016; 4(3): 34.

Ackermann H. Bacteriophage classification. *Bacteriophages Biol. Appl.* 2004; 67-90.

Aminov R, Caplin J, Chanishvili N, Coffey A, Cooper I, De Vos D, et al. Application of bacteriophages. *Microbiol. Aust.* 2018; 38: 63–66.

Bedi MS, Verma V, Chhibber S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 25(7): 1145.

Bikard D, Euler C, Jiang W, Nussenzweig PM, W. GG, Duportet X, et al. Development of sequence-specific antimicrobials based on programmable CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(11): 1146–50.

Briers Y, Walmagh M, Puyenbroeck V Van, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based “artilysins” to combat multidrug-resistant Gram-Negative pathogens. *MBio.* 2014; 5(4): e01379-14.

Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage du Staphylocoque. *Compt. Rend. Soc. Bio.* 1921; 85.

Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(1): 56-66.

Chan BK, Abedon ST. Phage therapy pharmacology. Phage cocktails. *Adv. Appl. Microbiol.*

2012; 78: 1-23.

Chaudhry WN, Concepcion-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. 2017; 12(1): 1–16.

Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. Pan-resistant New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* — Washoe County, Nevada, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly. Rep. 2017; 66(1): 33.

Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-antibiotic synergy (PAS):  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. PLoS One. 2007;2(8):8-11.

Cunha BA. Antibiotic side effects. Med. Clin. North Am. 2001;85(1):149-85.

Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. Lancet Infect. Dis. 2016;16(2):239-51.

D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C R Acad. Sci. (Paris). 1917; 165: 373–5.

ECDC. Antimicrobial Resistance Tackling the Burden in the European Union. Eur. Cent. Dis. Prev. Control. 2019;1-20.

Fischetti VA. Development of phage lysins as novel therapeutics: A historical perspective. Viruses. 2018;10(6):10-310.

Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. Front. Cell Infect. Microbiol. 2018;8(1):376.

García E, López R. Los bacteriófagos y sus productos genicos como agentes antimicrobianos. Rev. Esp. Quimioter. 2002;15(4):306-12.

Gerstmans H, Criel B, Briens Y. Synthetic biology of modular endolysins. Biotechnol. Adv. 2018;36(3):624-40.

Ghose C, Euler CW. Gram-negative bacterial lysins. Antibiotics 2020;9(2):1-14.

Golkar Z, Bagasra O, Gene Pace D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. J. Infect. Dev. Ctries. 2014;8(2):129-36.

Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. Clin. Microbiol. Rev. 2019;32(2):1-25.

Guttman B, Raya R, Kutter E. Basic Phage Biology. En: Kutter E., Sulakvelidze A.

- Bacteriophages: biology and applications. Boca Raton: CRC Press Florida; 2011. p. 29–66.
- Hagens S, Habel A, Von Ahsen U, Von Gabain A, Bläsi U. Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(10):3817–22.
- Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(1): 35–45.
- Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit. Care* 2017; 21(1): 2016-8.
- Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine Mal. Infect. Elsevier Masson.* 2008; 38(8): 426-30.
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis.* 2016; 16(2): 161–8.
- Lu T, Collins J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104: 1197-1202.
- Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018;102(6):2563–81.
- Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T, Tanji Y. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009; 295(2): 211–7.
- Matinkhoo S, Lynch KH, Dennis JJ, Finlay WH, Vehring R. Spray-dried Respirable Powders Containing Bacteriophages for the Treatment of Pulmonary Infections. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(12): 5197–205.
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93(8): 3188-92.
- Mushtaq N, Redpath MB, Luzio JP, Taylor PW. Treatment of experimental *Escherichia coli* infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56(1): 160-5.

Nazarov PA. Alternatives to antibiotics: Phage lytic enzymes and phage therapy. Bull. Russ. State Med. Univ. 2018; 7(1): 5-15.

Nilsson A. Phage therapy-constraints and possibilities. Upsala J. Med. Sci. 2014; 119(2): 192-198.

OMS. Antimicrobial resistance (AMR). OMS. 2014; 26(3):175–7.

OMS. Global Action plan on antimicrobial resistance. OMS. 2015; 10(9):354–5.

OMS. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. OMS. 2017;7.

Langdon, A., Crook, N. & Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. Genome Med. 2016; 8:39.

Pader V, Hakim S, Painter KL, Wigneshweraraj S, Clarke TB, Edwards AM. *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. Nat. Microbiol. 2016; 2: 16194.

Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 2007; 6(1): 29-40.

Payne RJH, Jansen VAA. Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clin. Pharmacol. Ther. 2000; 68(3): 225-30.

Pei R, Lamas-samanamud GR. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing Quorum-Quenching enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 2014; 80(17): 5340–8.

Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: A regulatory perspective. J. Antimicrob. Chemother. 2016; 71(8): 2071-4.

Reina J, Reina N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? Rev. Esp. Quim. 2018; 31(2): 101-4.

Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. J. Wound Care 2009; 18(6): 237-238,240-243.

Romero-Calle D, Benevides RG, Góes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. Antibiotics 2019; 8(3).

Sarker SA, Berger B, Deng Y, Kieser S, Foata F, Moine D, et al. Oral application of *Escherichia*

*coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh. *Environ. Microbiol.* 2017; 19(1): 237-50.

Sarker SA, Brussow H. From bench to bed and back again: phage therapy of childhood *Escherichia coli* diarrhea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016; 1372(1): 42-52.

Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 363(3): 1-5.

Stern A, Sorek R. the phage-host arms-race: Shaping the evolution of microbes. *Bioessays.* 2011; 33(1): 43-51.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris GJ. Minireview bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(3): 649-59.

Tagliaferri TL, Jansen M, Horz H-P. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 18-9.

Terico AT, Gallagher JC. Beta-lactam hypersensitivity and cross-reactivity. *J. Pharm. Pract.* 2014; 27(6): 530-44.

Torres-Barceló C, Gurney J, Gougat-Barberá C, Vasse M, Hochberg ME. Transient negative effects of antibiotics on phages do not jeopardise the advantages of combination therapies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018; 94(8): 1–9.

Torres-Barcelo C, Hochberg ME. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol.* 2016; 24(4): 249-56.

Twort F. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses by Twort FW, L.R.C.P. Lond., M.R.C.S. (From the Laboratories of the Brown Institution, London). *Lancet.* 1915; 1(3): 127–9.

Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Leitner L, Mehnert U, Chkhotua A, et al. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections. *Front. Microbiol.* 2018; 9(AUG): 1-7.

Urahn SK, Coukell A, Jungman E, Talkington K, Shore C, Kothari P. A Scientific roadmap for antibiotic discovery. *Pew Charit. Trust.* 2016;1–42.

Vitiello CL, Merrill CR, Adhya S. An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than a 1000-fold. *Virus Res.* 2005; 114(1): 101-3.

Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2014; 5(1): 226-35.

Wright A, Hawkins CH, Änggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; A preliminary report of efficacy. Clin. Otolaryngol. 2009; 34(4): 349-57.