



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
BACTERIÓFAGOS COMO ALTERNATIVA AL USO
DE ANTIBIÓTICOS EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS**

Autor: Natalia Castillo Trueba

Fecha: Junio 2020

Tutor: Jesús Pla Alonso

1. RESUMEN

Los bacteriófagos son virus que atacan de forma selectiva a las bacterias, característica que se ha empleado en la terapia de fagos para el tratamiento de infecciones producidas por colonias bacterianas resistentes a los antibióticos. Por esta razón, la terapia fágica, pese a no tener gran presencia en la práctica clínica actual, se plantea como una alternativa terapéutica útil y necesaria debido a la creciente inefectividad de los antibióticos.

Los fagos presentan múltiples ventajas frente a la antibioterapia, entre las cuales se puede destacar su alta especificidad y seguridad, además de poder ser empleados en cócteles de fagos y en combinación con antibióticos para aumentar considerablemente la eficacia del tratamiento. Gracias a los avances tecnológicos también se han podido utilizar con éxito las enzimas líticas y los fagos modificados mediante ingeniería genética proporcionando nuevas funciones a los virus naturales.

No obstante, la fagoterapia se encuentra aún en fase de investigación para su uso clínico en humanos puesto que todavía deben superarse algunas limitaciones como la respuesta inmune generada por el organismo o el desarrollo de resistencias, así como, definir su seguridad y eficacia *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: *Bacterias ESKAPE · Bacteriófago · Biofilms · Cóctel de fagos · Enzimas líticas · Terapia de fagos*

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los antibióticos se utilizan como los principales fármacos para combatir las enfermedades infecciosas producidas por bacterias desde mediados del siglo XX. Sin embargo, la aparición de bacterias multiresistentes plantea una verdadera amenaza a escala global para el control y profilaxis de infecciones bacterianas, puesto que, el desarrollo de resistencias disminuye la efectividad de estos antibióticos¹. Surge así, la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de dichas infecciones, siendo la terapia con fagos una de las más populares.

El origen de esta terapia se remonta al descubrimiento de los bacteriófagos por Frederick Twort y Félix d'Hérelle. Frederick Twort, en 1915, investigó cultivos de *Staphylococcus* sp. junto con las vacunas de virus vaccinia en los cuales observó zonas en las que no se había producido crecimiento bacteriano, a esto lo designó como un «agente bacteriolítico». Si bien no fue hasta dos años más tarde, donde Félix d'Hérelle, después de estudiar cultivos de *Salmonella gallinarum*, acuñó el término «bacteriófago» haciendo referencia a ciertas entidades que podían lisar células bacterianas².

En 1919 se realizaron en París los primeros ensayos clínicos con bacteriófagos para el tratamiento de la disentería en niños provocada por *Shigella*; estos ensayos proporcionaron resultados positivos dado que el tratamiento resultó ser altamente eficaz en la erradicación de la infección³.

Sin embargo, el estudio clínico con bacteriófagos fue abandonado por diversos motivos: por la falta de ensayos controlados, por el rápido éxito de la terapia antibiótica y por la capacidad de producción a gran escala de los antibióticos. A pesar de ello, países como Rusia, Georgia y Polonia siguieron investigando la aplicación de estos bacteriófagos hasta hoy en día donde se emplean eficazmente en distintos campos como en veterinaria, en seguridad alimentaria, en control ambiental e incluso, en terapia humana⁴.

2.1 INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA DE FAGOS

«Los bacteriófagos son virus que infectan de forma selectiva a las bacterias. Son entidades biológicas simples no vivas que consisten en DNA o RNA encerrado dentro de una cápside de proteína. Son parásitos bacterianos obligados incapaces de reproducirse independientemente y que dependen de un huésped bacteriano para sobrevivir»^{5,6}.

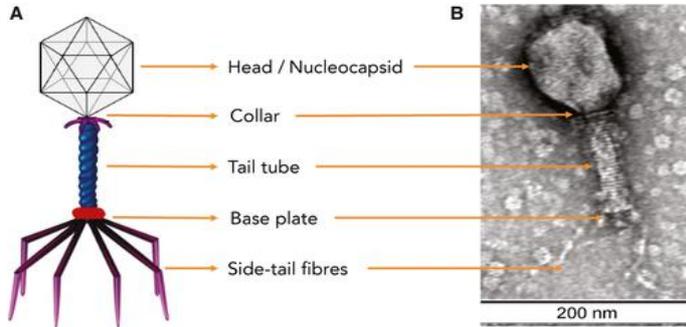


Fig.1 Esquema (A) y micrografía electrónica de bacteriófago T4 (Myoviridae) (B).

Los bacteriófagos para infectar al huésped se unen a receptores específicos presentes en la pared celular como carbohidratos, lipopolisacáridos y proteínas. De esta manera, los fagos se adsorben en la superficie de la célula bacteriana antes de introducir el material genético e iniciar el proceso viral característico de cada ciclo de vida.

Este ciclo de replicación es el principal criterio que se utiliza para dividir a los bacteriófagos en líticos y lisogénicos, a estos últimos asimismo se denominan fagos templados.

En el **ciclo lítico** el fago inyecta su genoma en el huésped dando comienzo a distintos procesos que secuestran la maquinaria molecular bacteriana para finalmente producir múltiples progenies virales y lisis la célula. Al alcanzar una masa crítica de progenie, los nuevos componentes virales se ensamblan y se liberan del huésped utilizando proteínas líticas codificadas por el fago. Estas enzimas hidrolizan la pared celular de peptidoglucano dando lugar a la liberación de fagos que pueden infectar a nuevas bacterias iniciando de nuevo el ciclo.

En el **ciclo lisogénico** el fago inyecta el material genético en la célula huésped, convirtiendo al fago en un profago que puede integrar su material genético en el genoma del huésped o formar un plásmido circular o lineal dentro del citoplasma. El profago se replica simultáneamente con el genoma bacteriano y se reproducen verticalmente de la célula madre a la hija durante varias generaciones, creando nuevas células bacterianas con el material genético del virus. El fago puede permanecer en ese estado hasta que una señal ambiental (p. ej.: estrés celular) induzca el ciclo lítico^{5,7}.

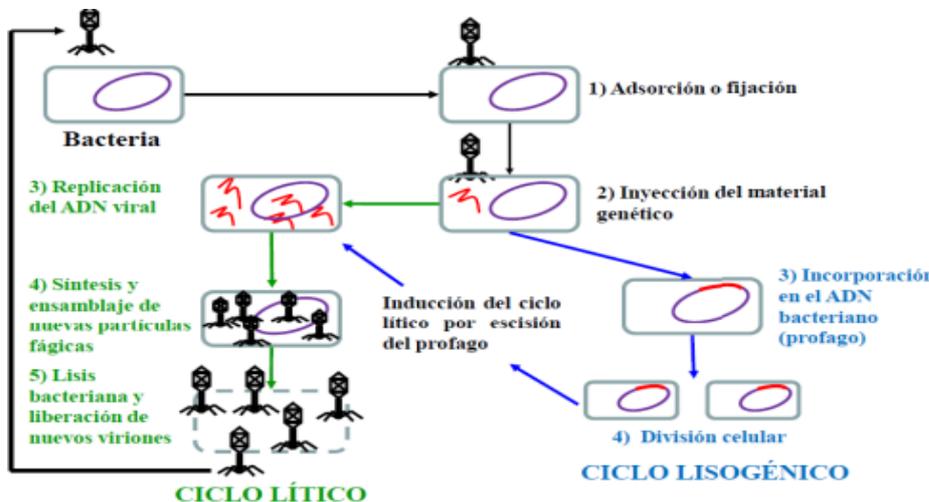


Fig. 2. Esquema de los ciclos de vida del bacteriófago: lítico y lisogénico.

Como se ha explicado anteriormente, los fagos son virus y los virus se pueden encontrar en múltiples ambientes siendo de esta manera la entidad biológica más abundante en la biosfera, tanto en entornos naturales como artificiales; se aproxima que existe una cantidad de 10^{31} - 10^{32} viriones.

En **entornos naturales** los fagos son cruciales para los ciclos biológicos puesto que, debido a su capacidad de replicarse dentro del huésped, afectan a la diversidad de las colonias bacterianas. Podemos destacar tres ambientes en los que se encuentran: en el **cuerpo humano** (en piel, tracto digestivo y respiratorio, cavidad oral y tracto urinario formando el llamado «fagooma») donde participan en la homeostasis del organismo protegiéndole de bacterias patógenas; en el **ambiente marino** siendo este el mayor reservorio de fagos (se estima que contiene 4×10^{30} virus) y en el **suelo**, que pese a haber sido el medio menos estudiado, se ha descubierto que los fagos contribuyen a la simbiosis del ciclo de nutrientes entre las raíces de las plantas y las bacterias^{2,7}.

En cuanto a los **entornos artificiales** podemos destacar su importancia en las plantas de **tratamiento de aguas residuales** y en la **industria alimentaria, petrolífera y farmacéutica**. En todas ellas son utilizados con el mismo fin: reducir el número de bacterias para controlar así patógenos y disminuir los problemas asociados a ellos.

Pese a que la aplicación en la industria farmacéutica aún es escasa, el creciente estudio con bacteriófagos y la pérdida progresiva de la eficacia de los antibióticos convierte a esta terapia en una posible y útil alternativa terapéutica⁷.

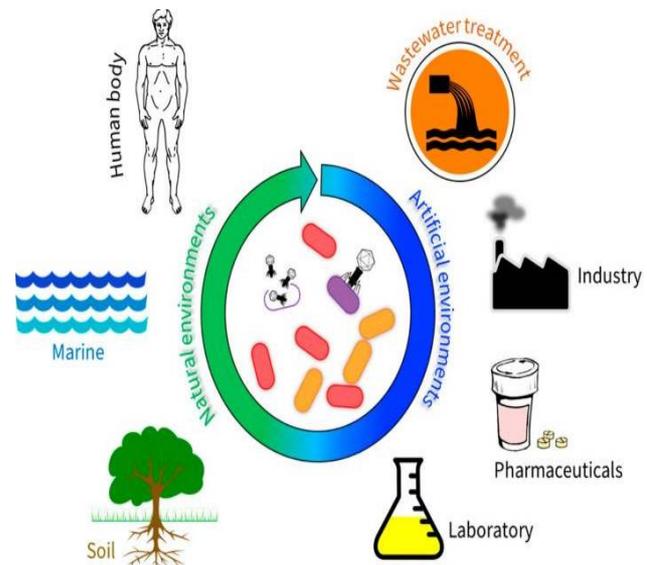


Fig. 3. Bacteriófagos en entornos naturales y artificiales

3. OBJETIVOS

Como consecuencia a la actual crisis de los antibióticos y a la aparición de bacterias resistentes a un gran número de fármacos, emerge la extrema necesidad de buscar y encontrar otras opciones terapéuticas a la antibioterapia.

Es por esta razón, que el principal objetivo de este trabajo es describir y analizar una de esas alternativas prometedoras como lo es la terapia de fagos.

Para alcanzar dicho objetivo se ha realizado una búsqueda de información acerca de los bacteriófagos, haciendo especial hincapié en sus ventajas e inconvenientes a nivel teórico y en cómo estas se han trasladado a los actuales ensayos clínicos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar dicho objetivo se ha aplicado un estricto método compuesto de una revisión bibliográfica de múltiples artículos publicados en los últimos años en las bases de datos de PubMed y Google Scholar seguido de una ordenación de la información prestando especial atención a las posibilidades terapéuticas de la terapia analizada.

Además, ha resultado de gran utilidad la bibliografía de los artículos encontrados en las bases de datos previamente citadas a través de las siguientes palabras clave: «phage», «phage therapy», «biofilms», «phage proteins» y «ESKAPE».

Se han consultado otros artículos publicados en la página web de Infectious Diseases Hub y en la página de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Para realizar la bibliografía se ha utilizado el gestor bibliográfico Mendeley.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La terapia con fagos consiste en el uso terapéutico de los bacteriófagos para tratar infecciones bacterianas utilizando su capacidad intrínseca de atacar selectivamente a las bacterias⁸.

Los fagos, como se ha mencionado anteriormente, se dividen según su ciclo lítico o lisogénico, siendo escogidos preferentemente los fagos denominados líticos para el empleo en el tratamiento puesto que, al final de su ciclo destruyen a la bacteria y liberan nuevos viriones dando lugar a la propagación del virus. Mientras, los fagos lisogénicos o templados al introducir su genoma y replicarse junto al material genético del huésped van a contribuir a la transferencia horizontal de genes; siendo esta la principal causa de transmisión de genes de virulencia y resistencia a los antibióticos^{9,10}.

Cabe destacar que los antibióticos y los fagos tienen en común su función antibacteriana al inhibir o lisar a las bacterias que producen la infección.

A continuación, se van a tratar las ventajas e inconvenientes fundamentales de la terapia fágica en comparación con los antibióticos.

5.1 VENTAJAS DE LA TERAPIA DE FAGOS

Las principales ventajas que presenta esta terapia frente a la utilización de los antibióticos se pueden resumir en elevada **seguridad** y **especificidad**. Además, esta terapia puede emplearse en **combinación con los antibióticos** para mejorar la eficacia del tratamiento.

5.1.1 Seguridad

La seguridad de los fagos se debe a su capacidad de auto-amplificación y auto-limitación, ya que, cuando el fago infecta a la bacteria patógena, este introduce su material genético dando comienzo al ciclo lítico en el que se formarán y se liberarán los nuevos fagos capaces de infectar a nuevas bacterias propagándose de este modo el virus; esta multiplicación se llevará a cabo hasta que no existan más huéspedes que infectar lo que dará lugar a la eliminación de los fagos. El crecimiento exponencial y la rápida proliferación permite la administración en dosis menores y en intervalos de tiempo más distanciados^{2,10}.

A lo mencionado anteriormente se debe añadir que los bacteriófagos por sí mismos presentan baja toxicidad puesto que están compuestos principalmente por ácidos nucleicos y proteínas, no obstante, antes de su utilización en terapia se realiza una secuenciación y análisis del genoma y una posterior purificación mediante cromatografía de intercambio iónico y centrifugación a alta velocidad para eliminar de esta manera las posibles sustancias tóxicas^{10,11,12}.

Pese a ser bastante seguros, dado que la estructura externa del fago consiste en una cápside de proteína, es muy probable que se produzcan interacciones entre el fago y el sistema inmune pudiendo ocasionar casos de anafilaxia^{10,11}.

Es importante saber que los fagos están presentes en nuestra vida ya que son ingeridos en diversas acciones cotidianas como respirar, consumir alimentos fermentados o ingerir agua del mar por accidente. Por este motivo, cabe suponer que los bacteriófagos no plantean una potencial amenaza para la seguridad del individuo aunque deben seguir realizándose estudios sobre su seguridad².

A diferencia de los fagos, los antibióticos requieren altas dosis de fármaco para ejercer su efecto antimicrobiano lo que puede producir daños en los diferentes tejidos. Con el uso de estos se han descrito diversas reacciones adversas en las que se incluyen anafilaxia, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad y alteraciones gastrointestinales y hematológicas⁵.

5.1.2 Especificidad

Los bacteriófagos inician la infección del huésped con el reconocimiento y la adsorción a los receptores celulares existentes en la pared de las células Gram positivas y Gram negativas¹³. Esta interacción fago-receptor es la que va a determinar la especificidad del fago, si este reconoce una región única en la pared bacteriana puede conducir a la infección de una sola especie o cepa⁷. Por lo tanto, la especificidad, primordial ventaja de esta terapia, va a depender principalmente de los receptores de la superficie de la célula huésped y de los mecanismos de defensa antivirales.

La especificidad de los fagos supone un beneficio importante frente a la utilización de antibióticos ya que estos eliminan un amplio espectro de bacterias incluidas las que forman parte del microbioma intestinal causando disbiosis⁶. Esta alteración de la microbiota genera diversos efectos dañinos como diarrea, candidiasis de las mucosas y colitis pseudomembranosa causada por *Clostridium difficile* entre otros⁵. Los fagos no causan dichas alteraciones puesto que atacan de forma directa y selectiva a las bacterias patógenas resultando inocuos para las células eucariotas y para aquellas células procariotas que no reconozcan como huésped^{8,13}.

A su vez, esta elevada especificidad se presenta también como la limitación más importante de esta terapia ya que para que los fagos puedan atacar de forma tan específica a las bacterias patógenas es necesario la identificación del agente etiológico causante de la infección. Este diagnóstico, en ocasiones, conlleva mucho tiempo y recursos, o incluso, ciertas infecciones pueden estar causadas por más de una cepa bacteriana como ocurre en las heridas de quemaduras^{5,13}.

Por lo tanto, esta especificidad resulta muy útil en infecciones crónicas donde el patógeno que causa dicha infección se encuentra debidamente caracterizado. Sin embargo, en infecciones agudas se plantea la creación de cócteles de fagos o la utilización de enzimas líticas dado que ambos presentan una especificidad más amplia a nivel de género y especie⁶.

- **Cócteles de fagos**

Una de las alternativas para afrontar las limitaciones que genera la elevada especificidad de la terapia monofágica son los cócteles de fagos los cuales están formados por una combinación adecuada y estudiada de bacteriófagos. Esta asociación produce una ampliación del espectro de actuación frente a la bacteria patógena y disminuye el riesgo de aparición de resistencia ya que si el huésped desarrolla resistencia a uno de ellos, el resto de los fagos todavía puede ejercer su actividad pues resulta inusual que se produzca resistencia simultánea contra diferentes fagos^{14,15}. Estos cócteles pueden elaborarse de forma estandarizada o personalizada donde dicha personalización ofrece la especificidad de la cepa requerida dando mejores resultados en la terapia, sin embargo, esta resulta muy costosa e implica gran cantidad de tiempo⁵.

Por otra parte, los cócteles necesitan procesos más prolongados de elaboración y purificación lo que incrementa la probabilidad de producir una respuesta inmune además de presentar una baja predicción de sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas. Para mitigar dichas limitaciones deben eliminarse aquellos fagos poco activos y evaluar la eficacia individual de cada fago que forma el cóctel¹³.

A pesar de haber resultado eficaces para combatir distintas infecciones, se han dado casos de «resistencia cruzada» entre fagos que se dirigen hacia un mismo receptor lo que se ha solucionado utilizando fagos que interaccionen con diferentes receptores de superficie¹⁶.

- **Enzimas líticas derivadas de fagos**

Otra de las alternativas que resulta de gran utilidad y supone un importante avance en la terapia fágica es el aislamiento y uso de enzimas derivadas de fagos. Estas enzimas son producidas por los mismos bacteriófagos en el curso de su ciclo lítico y son esenciales para atacar a envolturas bacterianas como el peptidoglucano, la cápsula y la membrana celular. La destrucción de estos componentes presenta gran importancia puesto que son las partes que utiliza la bacteria para protegerse de ser infectada^{5,17}. Dichas enzimas se pueden emplear como enzibióticos debido a que por sí mismas tienen la capacidad de eliminar las bacterias cuando se utilizan como proteínas recombinantes².

Las enzimas generadas por dichos fagos se pueden diferenciar en lisinas y polisacáridos despolimerasas.

Por un lado, las **lisinas** son las encargadas de degradar la pared de peptidoglucano produciendo la lisis por desequilibrio osmótico. Estas lisinas a su vez se pueden diferenciar en lisinas asociadas a viriones (VAL) y en endolisinas.

Las **lisinas asociadas a viriones** (VAL) son las responsables de la hidrólisis de los enlaces químicos de la pared de mureína que van a permitir la introducción del genoma vírico en el huésped^{2,18}. En cambio, las **endolisinas** son las encargadas de la degradación de la pared para la posterior liberación de los nuevos viriones; las endolisinas para ejercer su acción lítica necesitan la asociación con otras proteínas codificadas por el fago denominadas hollinas y spaninas; estas últimas son necesarias únicamente en las bacterias Gram negativas debido a la presencia de la membrana externa^{2,19}.

El empleo de las lisinas en terapia se debe a su carencia de toxicidad, puesto que no presentan actividad frente a las células eucariotas, a su velocidad de acción, a su escasa probabilidad de desarrollar resistencias y a su elevada potencia y eficiencia^{5,17}.

Por lo que estas lisinas se han utilizado con gran éxito en diversos estudios frente a bacterias resistentes a los antibióticos como por ejemplo la endolisina LysEF-P10 frente a *Enterococcus faecalis* que aplicada a modelos de ratones consiguió erradicar las colonias bacterianas resistentes a vancomicina sin originar daños colaterales en la microbiota intestinal demostrando así, ser una alternativa eficaz al uso de bacteriófagos²⁰.

Por otro lado, las enzimas **polisacáridos despolimerasas** se encargan de la degradación de los polisacáridos capsulares o estructurales de la célula huésped mediante el reconocimiento específico del polisacárido. Según el mecanismo de degradación podemos diferenciar las **hidrolasas**, que producen la hidrólisis de los polisacáridos capsulares o de las cadenas laterales del antígeno O del LPS y las **liasas** que actúan sobre los polímeros que constituyen la cápsula reduciendo de este modo la virulencia bacteriana al facilitar la acción del sistema inmune^{2,18}.

Además de su elevado potencial para combatir la infección, estas enzimas permiten la penetración de los fagos en los biofilms dado que son capaces de degradar sustancias poliméricas extracelulares.

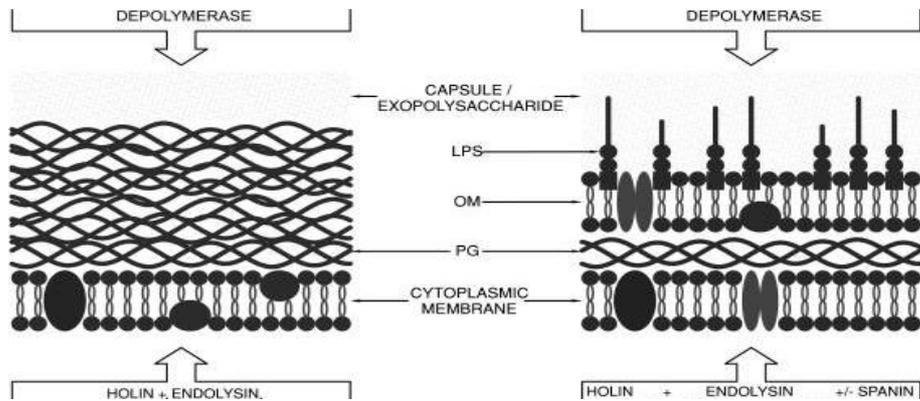


Fig.4. Esquema de actuación y localización de enzimas derivadas de fagos

• Penetración de biofilms

La formación de biopelículas por parte de las bacterias es muy frecuente en entornos naturales y artificiales como por ejemplo, en la placa dental. Estas biopelículas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre los pacientes puesto que contribuyen a la supervivencia de las bacterias y por tanto, a su patogenicidad. Los biofilms protegen a las bacterias de la fagocitosis, de la acción del sistema inmune, de los antimicrobianos y de los diferentes agentes desinfectantes como cloro, alcohol o calor¹¹.

La antibioterapia ha intentado la erradicación de estas biopelículas, sin embargo, para alcanzar este fin se requieren altas concentraciones de fármaco lo que resulta tóxico para los tejidos y, además, una vez terminado el tratamiento es muy probable que se reanude el crecimiento bacteriano. Es por ello por lo que se necesitan otras opciones para conseguir la penetración y eliminación de estos biofilms, sobre todo en infecciones crónicas⁵.

Por este motivo los fagos se presentan como una alternativa valiosa ya que son capaces de infectar a las bacterias de las capas más externas del biofilm y por medio de la liberación de nuevos viriones tras su ciclo de replicación consigue atacar a aquellos patógenos de las zonas internas produciendo una erradicación más eficaz. Asimismo, lo que resulta más interesante es la producción, por parte de los fagos, de enzimas capaces de degradar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que facilitan el acceso de los bacteriófagos y ocasionan una mayor exposición de las bacterias, obteniendo así, la eliminación del biofilm. Esta capacidad ha sido demostrada por diversos ensayos clínicos contra diferentes bacterias productoras de biofilms como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que producen diferentes infecciones asociadas a la producción de estas biopelículas como endocarditis, fibrosis quística, otitis media, periodontitis y prostatitis crónica^{14,11,21}.

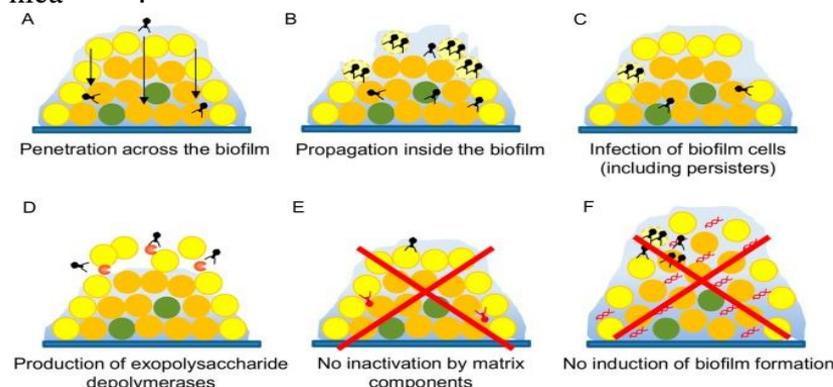


Fig.5. Capacidad antibiofilm de un bacteriófago

Gracias a los avances en ingeniería genética se ha podido modificar el genoma de los fagos para la inducción de las enzimas mencionadas anteriormente y también, para aumentar su especificidad; lo que dota al tratamiento con bacteriófagos de mayor eficacia.

- **Modificación mediante ingeniería genética**

La evolución en biotecnología ha posibilitado el diseño de nuevos fagos y la introducción de modificaciones en los virus ya existentes lo que ha permitido incrementar la capacidad terapéutica y la disminución de la inmunogenicidad. Por medio de estas modificaciones del genoma viral se posibilita la inserción de nuevas funciones como bacteriocinas, enzimáticos, inhibidores de detección del quórum, sistemas CRISPR y enzimas capaces de degradar biopelículas para hacer más efectiva la fagoterapia^{6,13}.

Una demostración de este procedimiento es la modificación de la nucleasa guiada por ARN (RGN). Estas nucleasas se dirigen a secuencias específicas del ADN no deseadas como genes o polimorfismos que participan como determinantes de virulencia o en el desarrollo de resistencias. Gracias a estas se diseñan antimicrobianos altamente selectivos frente a secuencias concretas presentes en el genoma bacteriano. Una muestra de esta práctica es la modificación de la nucleasa guiada por ARN Cas9 mediante el sistema CRISPR, en este estudio se reprogramó a Cas9 para atacar genes de virulencia de *Staphylococcus aureus* lo que supuso la muerte de las bacterias virulentas pero no de las avirulentas^{22,23,24}.

Tal y como se ha adelantado en el apartado de penetración de biofilms, el empleo de la ingeniería genética ha hecho posible el diseño de fagos que codifiquen determinadas enzimas para combatir la formación de biofilms. Un ejemplo de ello es el fago T7 el cual no presenta de forma natural genes de enzimas polisacáridos despolimerasas por lo que se ha modificado para producir la expresión de la dispersina B (DspB) la cual provoca la disminución de células bacterianas en las biopelículas ya que ataca a una adhesina necesaria para la formación e integridad de estas⁷.

5.1.3 Uso combinado de antibióticos y bacteriófagos

La aplicación conjunta de antibióticos y fagos se utiliza como táctica terapéutica para aumentar la eficacia del tratamiento en infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos¹⁴.

Diversos ensayos consideran el uso combinado como una mejor opción que los cócteles de fagos puesto que cada uno posee un mecanismo de actuación distinto limitando de esta forma la aparición de resistencias. También se ha comprobado mediante varios estudios que la administración de fagos antes de la antibioterapia genera mejores resultados al provocar una mayor destrucción bacteriana. Es importante el orden de exposición de ambos tratamientos para obtener la máxima eficacia ya que, si se aplica primero el antibiótico no se obtienen los mismos resultados¹⁶.

Por un lado, este aumento de la eficacia del tratamiento se debe al llamado «efecto sinergia de fago-antibiótico» (PAS) que hace referencia al descubrimiento del aumento de la virulencia del fago como consecuencia a la administración de concentraciones subletales de antibióticos que podrían incrementar la producción bacteriana de fagos líticos. Dichas concentraciones no causan la muerte de las bacterias pero inhiben la división celular. Esto le proporciona al bacteriófago un menor tiempo de latencia lo que incrementa la producción de fagos al aumentar los precursores disponibles que facilitan y mejoran el ensamblaje y la maduración. Todo ello permite una mayor propagación del virus y una disminución más rápida de las colonias bacterianas dado que se acelera la lisis celular^{13,14}.

Asimismo, el esquema de terapia combinada fago-antibiótico también incluye la actuación del sistema inmune para la eliminación completa de la infección. Múltiples estudios han investigado el efecto sinérgico entre los tres componentes para un tratamiento plenamente eficaz. Ambos tratamientos ejercen su efecto en la célula huésped y una vez que han actuado, las células del sistema innato, especialmente los neutrófilos, atacan a las bacterias persistentes produciendo la eliminación total de la infección; esta cooperación se ha denominado «sinergia de inmunofágicos». Por lo que el estado inmunológico del paciente es un aspecto a tener en cuenta ya que la respuesta inmunitaria desempeña un papel fundamental en el éxito de esta terapia^{26,27}.

Por otro lado, la administración conjunta de antibióticos y fagos ha demostrado un aumento de la sensibilidad hacia los antibióticos debido a la presión selectiva que ejercen los fagos en las bacterias provocando el desarrollo de resistencias contra los bacteriófagos. A su vez, esta presión produce diferentes alteraciones en los mecanismos de resistencia bacterianos hacia los antibióticos como, por ejemplo, en las bombas de eflujo, generando una pérdida de funcionalidad de estas lo que provoca una expulsión ineficiente del antibiótico incrementando por ende la sensibilidad hacia estos fármacos²⁷.

Además de todas las ventajas que implica la combinación de ambos tratamientos, la falta actual de conocimiento sobre la terapia de fagos hace que esta asociación tenga mayor aceptación en la práctica clínica.

5.2 INCONVENIENTES DE LA TERAPIA DE FAGOS

A pesar de las múltiples ventajas, en esta terapia aún existen una serie de limitaciones que deben seguir investigándose, entre las que destacan:

5.2.1 Respuesta inmune

El sistema inmunitario desempeña un papel fundamental tanto en la eliminación de fagos, lo que compromete el éxito de la terapia, como en la erradicación de las colonias bacterianas¹³.

Ante el hecho de que la estructura externa del fago se encuentra formada por una cápside proteica resulta bastante probable que el sistema inmune del paciente reaccione ante su presencia en el organismo. Previamente a su administración, las preparaciones de fagos deben ser purificadas para que resulten exentas de cualquier sustancia tóxica o que pueda generar alergia en el organismo.

Los anticuerpos específicos contra fagos han sido el factor más estudiado de la respuesta inmune en mamíferos. En la mayor parte de los casos, estos anticuerpos reducen la concentración de fagos activos en sangre y suero originando así un efecto negativo sobre la terapia. Sin embargo, en algunas situaciones esta formación de anticuerpos no supuso una alteración en la capacidad antibacteriana del fago ya que diversos estudios comprobaron, tras una administración oral e intravenosa a roedores, que la aparición de los anticuerpos neutralizadores se producía fuera del cuadro temporal del tratamiento efectivo, además de necesitar elevadas dosis por vía oral. Por lo tanto, la producción de anticuerpos va a depender de la dosis administrada de fago y del tiempo que el sistema inmune necesita para producir una respuesta²⁸.

Otros estudios avalan que la activación del sistema inmune dependerá del tipo de fago, de la dosis suministrada y de la vía de administración del fago puesto que no se han documentado efectos adversos por aplicación tópica pero sí por vía intravenosa²⁹.

Actualmente, se encuentra en investigación la posibilidad de diseñar fagos menos inmunogénicos gracias a la ingeniería genética. Aunque por el momento no existen datos suficientes ni con gran relevancia clínica sobre la inmunogenicidad de los fagos, estos deben seguir como tema de estudio⁶.

5.2.2. Aparición de resistencias contra fagos

Al igual que sucede con los antibióticos, las bacterias también han desarrollado mecanismos de resistencia contra los fagos aunque la tasa de desarrollo hacia estos es menor y es evitable mediante el uso de varios fagos o con la selección de un fago activo diferente¹².

Dichas resistencias se producen como resultado de la mutación y de la selección o adquisición de fagos templados, siendo transmitidas bien verticalmente, de la célula madre a la hija, o bien, horizontalmente a través de plásmidos. Se pueden generar mecanismos de resistencia en los diferentes pasos del ciclo.

En primer lugar, se puede producir la **alteración o pérdida del receptor** siendo este el mecanismo más común de resistencia contra fagos. La pérdida de un receptor puede deberse a cambios en las proteínas de membrana lo que produce una alteración en la composición de la superficie celular. Como consecuencia de esta pérdida o alteración, el fago no reconocerá al huésped lo que evitará la adsorción y la producción de nuevos fagos. Además, algunas bacterias son capaces de **secretar ciertas moléculas**, entre ellas glicoconjugados, alginatos o sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como los exopolisacáridos que producen el enmascaramiento del receptor evitando así la adsorción del fago. Este problema se puede solucionar mediante la elección de otro receptor o con la secreción de enzimas que degraden las sustancias^{17,30}.

En segundo lugar, la bacteria también puede desarrollar sistemas para la eliminación del ADN viral como el **sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR)** o el **sistema de exclusión de superinfección (Sie)**. Este último está formado por proteínas asociadas a la membrana, las cuales interactúan con las proteínas implicadas en la introducción del ADN impidiendo su inyección, de esta manera, disminuye la virulencia y la propagación del virus².

En último lugar, actúa el **sistema de infección abortiva (Abi)** que tiene como objetivo la destrucción de la célula infectada para evitar la transmisión al resto de células. Es el responsable del bloqueo de la replicación, transcripción, traducción, ensamblaje y liberación de nuevos viriones^{2,17}.

De acuerdo con lo explicado con anterioridad, los fagos líticos ejercen una presión selectiva en las bacterias lo que provoca que el huésped desarrolle mecanismos de resistencia. No obstante, en algunas circunstancias, esto puede ser útil como por ejemplo en la «resensibilización antibiótica» que describiremos en algunos estudios clínicos cuando se administran fago y antibiótico conjuntamente¹³.

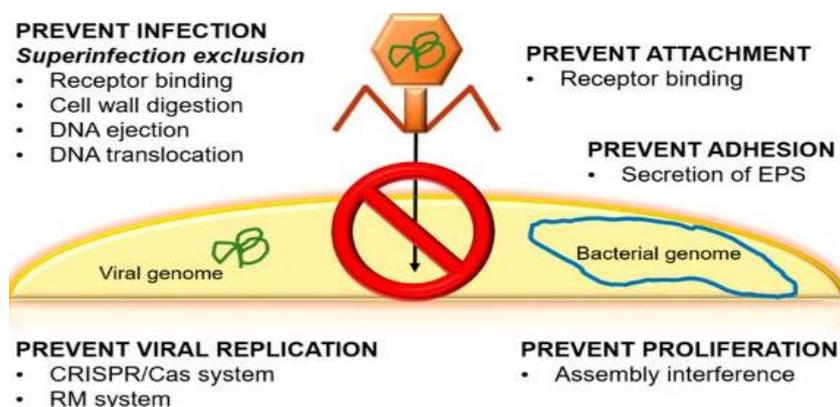


Fig.6. Principales mecanismos de resistencia de bacterias contra fagos

5.2.3 Falta de datos clínicos

La falta de información sobre la utilidad en clínica de los fagos y la ausencia de regulación y aprobación por los organismos oficiales como la Agencia Europea del Medicamento (EMA) o la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) son algunas de las principales limitaciones de la fagoterapia¹⁰.

Durante décadas, en países del este de Europa se ha estudiado esta terapia, sin embargo, para la obtención de sus datos clínicos se han encontrado con diversos impedimentos referentes a los procedimientos de realización (p. ej.: ensayos no aleatorizados ni controlados con placebo), al idioma y al contexto político^{6, 31}.

A raíz de esto, se produce una ausencia de protocolos validados para la vía de administración, dosis, frecuencia y duración del tratamiento lo que hace más difícil su aprobación y validación y, por tanto, su aplicación en la clínica⁶.

Actualmente, la FDA ha autorizado el uso de fagos para suplementos dietéticos, profilaxis ambiental y descontaminación de alimentos. En cuanto al uso en humanos, esta terapia se encuentra en ensayos clínicos de fase I y fase II para definir su eficacia y seguridad⁸.

5.3 ESTUDIOS CLÍNICOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017 la primera lista de «patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos» con el propósito de fomentar la investigación de nuevas posibilidades terapéuticas puesto que los expertos estiman que en el año 2050 se producirán más muertes por resistencia a los antibióticos que por cáncer, de ahí, la importancia de la aplicación de la terapia de fagos. En esta lista se incluyen seis patógenos nosocomiales resistentes a antibióticos englobados por el acrónimo ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). Dichas bacterias son las principales causantes de mortalidad asociada a resistencia con antibióticos^{32,33}.

Este trabajo se va a centrar en los estudios clínicos realizados para combatir las infecciones provocadas por dichas bacterias:

5.3.1 *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*

Las dos especies más habituales de *Enterococcus* que se asocian a infecciones nosocomiales son *E. faecium* y *E. faecalis* los cuales se vinculan con la producción de endocarditis, bacteriemias, meningitis, infecciones del tracto urinario y del conducto radicular entre otras infecciones sistémicas y locales. Estas bacterias generan biofilms con gran facilidad lo que les dota de resistencia frente a la acción de diferentes antibióticos y frente a la acción del sistema inmunitario. Por lo que estas infecciones resultan óptimas para la aplicación de la terapia de fagos. Los estudios realizados se centran en la utilización de diferentes fagos para combatir la formación de biopelículas en infecciones dentales.

En el primer estudio analizado se aisló un fago procedente de aguas residuales para valorar su eficacia contra la formación de biopelículas en la infección de periodontitis crónica. Las muestras de enterococos fueron tomadas de 100 pacientes con dicha infección de las cuales se aislaron 46 enterococos, entre ellos, *E. faecium* y *E. faecalis*. Mediante el cultivo *in vitro* para la formación de las biopelículas y posterior análisis estadístico e identificación del fago a través de microscopía de transmisión (TEM) se observó una reducción significativa en la actividad metabólica de las biopelículas dentro de las 24 horas de contacto. Se obtuvo un mejor resultado frente a las colonias de *E. faecalis* que frente a *E. faecium* lo que indica la alta especificidad del

fago y el estrecho rango de hospedadores de este. Como conclusión se obtuvo que la administración de fagos resulta eficaz para limitar el crecimiento de enterococos y la formación de biopelículas³⁴.

Otro estudio *in vitro* analizó el fago EFDG1, aislado de agua de alcantarillado, el cual resultó ser muy eficaz al reducir de forma significativa la biomasa de las biopelículas en siete días en las muestras tratadas frente a las muestras no tratadas con dicho fago. Con esto, se llevaron a cabo ensayos *ex vivo* en un modelo experimental de dientes humanos donde mediante imágenes de microscopía confocal se observó que aquellos tratados mediante irrigación de EFDG1 en los conductos radiculares obturados mostraron bacterias muertas mientras que en los controles las bacterias seguían vivas^{35,36}.

En ambos estudios se ha demostrado la eficacia y la especificidad de determinados fagos como el EFDG1 contra los biofilms producidos por *E. faecalis* y por algunas cepas de *E. faecium* y, además, en ninguno de ellos se ha observado la aparición de resistencias a dicho fago.

Asimismo, se estudiaron la utilización de bacteriófagos para el tratamiento de la bacteriemia producida por *E. faecium* resistente a vancomicina. La cepa bacteriana fue introducida en ratones mediante una inyección intraperitoneal para producir la bacteriemia en 48 horas. Con la posterior administración de los fagos se obtuvieron resultados del 100% de los ratones recuperados. También se realizó el mismo ensayo, pero retrasando la administración del fago a los ratones el máximo tiempo posible consiguiendo que el 50% se recuperara con una sola dosis de fagos. Con esto se demostró la eficacia de los fagos para destruir bacterias resistentes a los antibióticos³⁷.

5.3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos causantes de diferentes infecciones tanto en hospitales como en la cría de ganado produciendo infecciones en piel, tejidos blandos, huesos, heridas y torrente sanguíneo; siendo también el responsable del shock tóxico y de diversas intoxicaciones alimentarias debido a la producción de enterotoxinas³⁸.

En un primer estudio *in vitro*, se analizó la capacidad de prevención y erradicación de biopelículas de dos formulaciones comerciales de fagos para uso humano, una de ellas contenía el fago Sb-1 y la otra un cóctel de fagos denominado PYO la cual presentaba virus dirigidos a diferentes especies bacterianas. Ambas se habían utilizado anteriormente de manera satisfactoria: Sb-1 se empleó en el tratamiento de osteomielitis y úlceras en los pies mientras que PYO resultó eficaz para tratar infecciones en heridas. Por microcalorimetría isotérmica (IMC) y microscopía de alta resolución se comprobó que ambas formulaciones consiguieron prevenir la formación de biopelículas al destruir las bacterias y evitar su adhesión, pero solo fueron capaces de eliminar los biofilms ya formados con una administración a mayor dosis durante 5-7 días. Además, se realizaron experimentos *in vivo* para probar su eficacia como tratamiento o profilaxis en una infección sistémica con larvas de *Galleria mellonella* donde se determinó que si se producía la administración una hora antes de la infección la tasa de supervivencia era mayor que si se administraba una hora después de dicha infección poniendo de manifiesto la importancia del tiempo de administración del fago. El cóctel presentó mejores resultados que la terapia monofágica aunque ambas aumentaron la tasa de supervivencia y una sola dosis fue suficiente para reducir la mortalidad de las larvas³⁹.

Otro estudio efectuó diversos ensayos en ratas a las que se provocó una infección articular periprotésica asociada a biopelículas para estudiar la eficacia de un cóctel de fagos administrado de forma individual y en combinación con el antibiótico vancomicina. Los resultados demos-

traron que la utilización conjunta de fago y antibiótico resulta más eficaz que la terapia individual consiguiendo una reducción de la inflamación. La terapia con fagos logró reducir la carga bacteriana sin desarrollar inflamación o resistencia al tratamiento⁴⁰.

Un último estudio comprobó, en un modelo de ratas con *S. aureus* formadores de biopelículas, la eficacia del empleo de fagos modificados genéticamente por la técnica CRISPR-Cas9 para el tratamiento de la osteomielitis y de las infecciones en tejidos blandos. Este fago modificado presenta mayor potencial bactericida que el fago natural o que los antibióticos vancomicina y fosfomicina puesto que presenta dos mecanismos de lisis bacteriana, el primero por la acción de las enzimas líticas como holinas e hidrolasas y el segundo por la actividad de endonucleasas CRISPR-Cas9. Esto demostró que la modificación mediante ingeniería genética aumenta la capacidad del fago para atacar y destruir a las bacterias⁴¹.

5.3.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria encapsulada comensal y oportunista resistente a una gran variedad de antibióticos y causante de diferentes infecciones nosocomiales. Ocasiona infecciones del tracto urinario, neumonía, colecistitis, diarrea, osteomielitis, meningitis y sepsis; todas estas resultan potencialmente mortales en individuos inmunocomprometidos, recién nacidos y ancianos^{42,43}. Se efectuaron diversos estudios para valorar la eficacia de la utilización de fagos y cócteles, el empleo junto a antibióticos y la aparición de resistencias al tratamiento.

Un estudio inicial analizó el efecto sinérgico *in vitro* e *in vivo* del tratamiento conjunto de antibióticos y fagos para combatir una infección urinaria recurrente que ocasionó pielonefritis aguda y shock séptico causada por *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos. La muestra fue tomada de la orina de una paciente inmunocomprometida, la cual había sido tratada anteriormente con diferentes antibióticos donde ninguno resultó eficaz. Se emplearon tres cócteles distintos con varios fagos líticos dando como resultado la aparición de resistencia para cada uno de ellos. Posteriormente, se administró el último cóctel junto con una dosis alta del antibiótico trimetoprima-sulfametoxazol (muy utilizado en infecciones urinarias) lo que inhibió tanto el crecimiento bacteriano como la aparición de bacterias resistentes, demostrando así, la sinergia entre ambos tratamientos. Es significativo el hecho de que la paciente fuese inmunocomprometida ya que el sistema inmune ejerce un papel esencial en la erradicación total de las infecciones y en la prevención del desarrollo de resistencias por el efecto sinérgico entre fago, antibiótico y sistema inmune que evita la supervivencia de bacterias resistentes⁴⁴.

En otro ensayo se investigó la eficacia y los efectos de la aplicación de fagos líticos en un modelo de ratón para combatir la neumonía causada por *K. pneumoniae*. Se aisló el fago VTCCBPA43 y se administró al ratón una dosis única intranasal de este, observándose a las 48 horas una disminución significativa del recuento bacteriano pulmonar en los animales tratados frente a los no tratados. Además, la administración del fago protege y disminuye el desarrollo y la intensidad de lesiones histopatológicas graves como se detectó en el grupo no tratado (trombosis con infiltración de neutrófilos, necrosis del parénquima alveolar, vasculitis...). Esto manifestó la capacidad terapéutica *in vivo* del fago VTCCBPA43 para disminuir la carga bacteriana y las lesiones pulmonares administrado por vía intranasal⁴⁵.

Un último ensayo *in vitro* estudió la utilización de enzimas despolimerasas como agente terapéutico y la importancia de la cápsula de *K. pneumoniae* como determinante de virulencia y marcador epidemiológico. El fago SH-KP152226 codifica enzimas con actividad despolimerasa como Dep42. Esta enzima recombinante originó la despolimerización de la cápsula K47, limitó la formación de biopelículas y ayudó en la degradación de las ya formadas. También se observó un efecto sinérgico con el antibiótico poliximina para combatir la formación de biofilms⁴⁶.

5.3.4 Acinetobacter baumannii

Las infecciones por *Acinetobacter baumannii* resistentes a los antibióticos se han convertido en un importante problema de morbilidad y mortalidad en hospitales, sobre todo, en pacientes de cuidados intensivos (UCI) al ser causantes de neumonía adquirida en el hospital, de infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y de heridas. Se realizaron diferentes estudios para la determinación de la eficacia y seguridad del tratamiento, así como para analizar las vías de administración, la posible respuesta inmune y la aparición de resistencias.

En un primer estudio se investiga el bacteriófago Abp1 frente a una muestra de *A. baumannii* recogida de un paciente con quemaduras para comprobar su eficacia en infecciones locales en modelos de ratones. Con este fin, se provocó a los ratones dos heridas en las que se inoculó una muestra de la bacteria con una posterior administración de los fagos por vía tópica o vía sistémica. Los ratones tratados con el fago por vía tópica tuvieron mejores resultados (heridas más pequeñas, secas y limpias) que los que lo recibieron por vía sistémica, en estos se redujo el tamaño de la herida pero no obtuvieron resultados significativos frente al grupo control. Esto demostró que el tratamiento con fagos ayuda a la cicatrización y al tratamiento de heridas y que para ello es también importante la vía de administración⁴⁷.

En otro estudio se analizaron 34 cepas de *A. baumannii* resistente a múltiples antibióticos y se aislaron 8 fagos que provenían de las aguas residuales de diferentes hospitales. Mediante diversas pruebas se identificó el rango de hospedadores siendo el fago ϕ km18p el que resultó más activo al lisar mayor cantidad de bacterias y ofrecer un mayor rango de huéspedes. Este fago aumentó la tasa de supervivencia de las células epiteliales del pulmón humano 24 horas después de ser incubadas con la bacteria. El fago produjo la eliminación bacteriana y la protección de las células pulmonares sin afectar al crecimiento de estas⁴⁸.

En Rusia, donde esta terapia lleva utilizándose años, se realizó un estudio en los que se trató con fagos a 42 pacientes ingresados en cuidados intensivos (UCI), los cuales el 87,5% presentaban existencia de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Se administró de forma repetida un cóctel de fagos de manera terapéutica o profiláctica y se evaluaron los resultados 24 horas después de la dosis final del tratamiento. Dos o tres semanas más tarde, se volvieron a analizar los resultados detectándose anticuerpos anti-fago. Esto demostró que la administración repetida no resulta más eficiente que la dosis única e incluso, las dosis repetidas, pueden generar una respuesta inmune hacia los fagos⁴⁹.

5.3.5 Pseudomona aeruginosa

Las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* resistente a antibióticos son una prioridad para la investigación de nuevas terapias debido a la alta incidencia, a la posible cronificación y a la elevada mortalidad de las infecciones. Afecta mayoritariamente a pacientes inmunocomprometidos como a aquellos con quemaduras graves, fibrosis quística, diabetes y en tratamiento con quimioterapia. Es responsable de infecciones oportunistas en piel, tejidos blandos, abscesos, tracto urinario, meningitis, huesos y articulaciones⁵⁰. En los diferentes ensayos se estudiaron la actividad de los fagos como agentes antimicrobianos, tanto en terapia monofágica como en cóctel y en administración conjunta con antibióticos.

Este primer ensayo investigó la eficacia de la utilización de bacteriófagos en el esputo de pacientes con fibrosis quística (FQ) para combatir la infección de *P. aeruginosa*. Se tomaron muestras de esputo de 58 pacientes con FQ de las cuales 48 presentaban dicha bacteria. A las muestras se aplicó un cóctel de 10 fagos no seleccionados específicamente lo que generó una disminución significativa en el número de bacterias en comparación con las que no habían sido incubadas y, además, se observó un aumento considerable en el número de fagos. Con este

estudio se probó la eficacia del cóctel de fagos y se estudió la posible mejora si se utilizase un cóctel personalizado para las cepas concretas de los pacientes pues potenciaría el tratamiento⁵¹.

Otro estudio analizó el empleo del fago OMKO1 para aumentar la sensibilidad de los antibióticos en el tratamiento de una infección de injerto aórtico. Se basa en que dicho fago utiliza como sitio de unión la proteína porina M (OprM) de la membrana externa de los sistema de eflujo de *P. aeruginosa*. El bacteriófago provoca una presión de selección haciendo que las bacterias desarrollen resistencia al fago, esto produce un incremento en la sensibilidad y eficacia de los antibióticos administrados por un flujo de salida ineficiente de estos. Este estudio se realizó en un paciente sometido a cirugía de reemplazo aórtico con injerto en el que se originaron recurrentes infecciones por *P. aeruginosa* productora de biofilms. Finalmente se propuso la utilización de fagos como alternativa terapéutica. Se le administró el fago OMKO1 junto al antibiótico ceftazidima dando como resultado un efecto sinérgico, aumentando la sensibilidad al antibiótico y reduciendo las biopelículas^{52,53}.

En un último ensayo se evaluó la eficacia de la proteína de fago PA-PP para el tratamiento de úlceras del pie diabético. La actividad de dicha enzima se analizó por zimografía, espectrofotometría y microscopía electrónica de barrido de alto voltaje (SEM-LV) donde se demostró la eficacia antimicrobiana para la cepa PAR50 de *P. aeruginosa*. Además, se administró junto al antibiótico piperacilina incrementando la eficacia del tratamiento por un efecto de sinergia entre ambos. La proteína PAP-PP también se une a la porina M (OprM) mencionada en el anterior estudio siendo una parte importante en la producción de resistencias a fagos y en la llamada «resensibilización antibiótica»⁵⁰.

5.3.6 *Enterobacter spp.*

Dentro del género *Enterobacter spp.* podemos destacar la especie *E. cloacae* para el estudio de la terapia de fagos. Esta especie es un patógeno oportunista resistente a los β -lactámicos causante de infecciones nosocomiales. Generalmente afecta a pacientes inmunocomprometidos produciendo endocarditis y bacteriemia pudiendo ocasionar incluso la muerte. Se han realizado pocos ensayos acerca del empleo de bacteriófagos para combatir las infecciones originadas por dicha bacteria puesto que es un patógeno emergente^{54,55}.

El único estudio encontrado se basa en la caracterización del fago vB_EclM_CIP9 frente a *E. cloacae*. Este fago se aisló a partir de aguas residuales, fue cultivado, incubado, purificado y visualizado a través de microscopía electrónica para analizar su morfología y posterior secuenciación del genoma. Esto sirve como punto de partida para su posterior aplicación en ensayos *in vitro* o *in vivo*⁵⁵.

TERAPIA DE FAGOS VS ANTIBIÓTICOS				
FAGOS			ANTIBIÓTICOS	
	VENTAJAS	INCONVENIENTES		
SEGURIDAD	<ul style="list-style-type: none"> Composición: ácidos nucleicos y proteínas → baja toxicidad Auto-amplificación y Auto-limitación → Dosis menores y mayor intervalo entre administraciones 	<ul style="list-style-type: none"> Cápside proteica → interacciones con el sistema inmune 	<ul style="list-style-type: none"> Necesidad de elevadas dosis → daños en tejidos Reacciones adversas → anafilaxia, nefrotoxicidad, alteraciones GI... 	
ESPECIFICIDAD	<ul style="list-style-type: none"> Adsorción a receptor específico → infección de una especie o cepa Inocuo para células eucariotas 	<ul style="list-style-type: none"> Necesidad de identificación exacta del agente etiológico 	<ul style="list-style-type: none"> Ataque a un amplio espectro de bacterias → alteración microbiota intestinal (diarrea, candidiasis...) 	
	CÓCTELES DE FAGOS (Administración simultánea de fagos)	<ul style="list-style-type: none"> Mayor espectro de actividad Disminución de resistencias → no desarrollo de resistencia a todos los fagos 	<ul style="list-style-type: none"> Resistencia cruzada → evitar con fagos que se adsorban a distinto receptor Procesos largos de elaboración y purificación Baja predicción características farmacocinéticas y farmacodinámicas 	
	ENZÍMAS LÍTICAS (Degradación de pared celular, cápsula y membrana celular)	<ul style="list-style-type: none"> Potente lisis bacteriana No toxicidad frente células eucariotas Rápida velocidad de acción Escasa probabilidad de desarrollo de resistencias Penetración y eliminación de biofilms (polisacáridos despolimerasas) 		
	PENETRACIÓN DE BIOFILMS (Los biofilms aumentan la supervivencia y patogenicidad de las bacterias)	<ul style="list-style-type: none"> Infección de las capas más externas y propagación hacia las más internas Degradación sustancias poliméricas extracelulares (EPS) → polisacáridos despolimerasas → penetración y eliminación biofilms 		<ul style="list-style-type: none"> Altas dosis para atacar a las bacterias de los biofilms → daños en tejidos Alta probabilidad de reanudar crecimiento bacteriano después del tratamiento
	INGENIERÍA GENÉTICA	<ul style="list-style-type: none"> Aumentar capacidad terapéutica → Inserción de nuevas funciones Disminuir inmunogenicidad 		
USO COMBINADO CON ANTIBIÓTICOS	<ul style="list-style-type: none"> Aumenta la eficacia del tratamiento → sinergia fago- antibiótico (PAS) Aumento de la sensibilidad hacia el antibiótico → presión selectiva del fago Disminuye aparición de resistencias → fármacos con distinto mecanismo de acción 			
RESPUESTA INMUNE	<ul style="list-style-type: none"> Eliminación total de la infección → «sinergia de inmunofágicos» 	<ul style="list-style-type: none"> Proteínas de superficie inmunogénicas Anticuerpos anti-fagos → disminución de actividad de fagos 	<ul style="list-style-type: none"> Anafilaxia 	
DESARROLLO DE RESISTENCIAS	<ul style="list-style-type: none"> Resensibilización antibiótica → fagos presión de selección → aumento de sensibilidad a antibióticos 	<ul style="list-style-type: none"> Alteración o pérdida de receptores Secreción de moléculas que evitan adsorción al receptor Sistema CRISPR → eliminación de ADN viral Sistema de exclusión de superinfección → impiden inyección ADN viral Sistema de infección abortiva 	<ul style="list-style-type: none"> Gran aumento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos 	

Tabla 1. Resumen de ventajas y limitaciones de los bacteriófagos frente a los antibióticos

6. CONCLUSIONES

Tras el análisis realizado en el presente trabajo podemos considerar la terapia de fagos como una alternativa al tratamiento con antibióticos tanto a corto como a largo plazo. A pesar de que el uso de bacteriófagos en la práctica clínica humana aún es limitado y se encuentra en fase de investigación, los diversos estudios abordados en este trabajo sobre su aplicación en las bacterias ESKAPE traen consigo nuevas expectativas terapéuticas para combatir aquellas infecciones resistentes a los antibióticos.

Después del estudio de las ventajas y limitaciones teóricas que poseen dichos bacteriófagos se ha evaluado cada una de ellas por medio de los ensayos clínicos permitiéndonos de esta manera valorar su eficacia y seguridad *in vivo* e *in vitro*.

Teniendo en cuenta los aspectos examinados en los estudios, los fagos demuestran una elevada especificidad y un estrecho rango de hospedadores lo que les hace altamente eficaces y seguros para atacar a su huésped. Sin embargo, en ciertas ocasiones, las bacterias han desarrollado resistencias frente a ellos como en el ensayo de *P. aeruginosa*. Por ello, es necesario la búsqueda de otras opciones de tratamiento como los cócteles de fagos, las enzimas líticas, la modificación por ingeniería genética o la administración conjunta con antibióticos. Cabe destacar entre ellas la terapia combinada de antibiótico y fago puesto que ha resultado altamente efectiva tanto para la resolución de la infección como para la disminución de la aparición de mutantes resistentes.

Considerando los estudios analizados, todas ellas han sido igual o incluso más eficaces que el uso de fagos en monoterapia abriendo de esta forma un amplio abanico de posibilidades para el tratamiento de las infecciones resistentes.

En conclusión, los fagos deben continuar investigándose para abordar el desarrollo de resistencias y la aparición de respuesta inmune. Pese a esto, los estudios realizados suponen un avance sustancial en la fagoterapia considerándose así una alternativa prometedora y eficaz frente al uso tradicional de los antibióticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Armstrong Michelle, Burrows Lori.L. Bacteriophages 2.0 — an old solution to a modern problem - ID Hub [Internet]. [cited 2020 Apr 11]. Available from: https://www.id-hub.com/2019/11/21/bacteriophages-2-0-old-solution-modern-problem/?utm_source=Adestra&utm_medium=email&utm_term=&utm_content=Bacteriophages 2.0 — an old solution to a modern problem
2. Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. Vol. 7, Antibiotics. MDPI AG; 2018.
3. Prada-Peñaranda C, Holguin-Moreno A-V, González-Barrios A-F, Vives-Florez M-J. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. Univ Sci [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2020 May 19];20(1):43. Available from: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/8410>
4. Sinha A, Maurice CF. Bacteriophages: Uncharacterized and Dynamic Regulators of the Immune System. Mediators Inflamm. 2019;2019.
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. 2017;8(3):162.
6. Romero-Calle D, Benevides RG, Góes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. Vol. 8, Antibiotics. MDPI AG; 2019.
7. Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice DTF, Stanton CR, Rose J, et al. Bacteriophages in natural and artificial environments. Vol. 8, Pathogens. MDPI AG; 2019.

8. Ganeshan SD, Hosseinidoust Z. Phage therapy with a focus on the human microbiota. Vol. 8, Antibiotics. MDPI AG; 2019.
9. Reina J, Reina N. Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy? Vol. 31, Revista Espanola de Quimioterapia. Sociedad Espanola de Quimioterapia; 2018. p. 101–4.
10. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. Bacteriophage. 2011 Mar;1(2):111–4.
11. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—A quick guide. Vol. 8, Antibiotics. MDPI AG; 2019.
12. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J. Bacteriophage therapy. Vol. 45, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology (ASM); 2001. p. 649–59.
13. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. Vol. 32, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology; 2019.
14. Morrisette T, Kebriaei R, Lev KL, Morales S, Rybak MJ. Bacteriophage Therapeutics: A Primer for Clinicians on Phage - Antibiotic Combinations. Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther [Internet]. 2020 Feb 13 [cited 2020 May 19];40(2):153 - 68. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/phar.2358>
15. Moghadam MT, Amirmozafari N, Shariati A, Hallajzadeh M, Mirkalantari S, Khoshbayan A, et al. How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. Vol. 13, Infection and Drug Resistance. Dove Medical Press Ltd.; 2020. p. 45–61.
16. Wright RCT, Friman VP, Smith MCM, Brockhurst MA. Resistance evolution against phage combinations depends on the timing and order of exposure. MBio. 2019;10(5).
17. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre A-S, Lavigne R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. Curr Protein Pept Sci. 2013 Jan 21;13(8):699–722.
18. Fischetti VA. Development of phage lysins as novel therapeutics: A historical perspective. Viruses. 2018 Jun 7;10(6).
19. Bolocan AS, Upadrasta A, De Almeida Bettio PH, Clooney AG, Draper LA, Ross RP, et al. Evaluation of phage therapy in the context of enterococcus faecalis and its associated diseases. Viruses. 2019 Apr 1;11(4).
20. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. Curr Med Chem. 2015 Jun 15;22(14):1757–73.
21. Saldaña Lucio C. Efecto de la aplicación de bacteriófagos sobre biofilms mixtos. 2015 Jul [cited 2020 May 19]; Available from: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/32356/6/TFM_CasandraSaldanaLucio.pdf
22. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nat Biotechnol. 2014;32(11):1141–5.
23. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. Nat Biotechnol. 2014;32(11):1146–50.
24. Park JY, Moon BY, Park JW, Thornton JA, Park YH, Seo KS. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against Staphylococcus aureus. Sci Rep. 2017 Mar 21;7.
25. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. PLoS One. 2007 Aug 29;2(8).
26. Rodriguez-Gonzalez RA, Leung CY, Chan BK, Turner PE, Weitz JS. Quantitative Models of Phage-Antibiotic Combination Therapy. mSystems. 2020 Feb 4;5(1).
27. Van Belleghem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. Vol. 11, Viruses. MDPI AG; 2019.

- 28.** Dąbrowska K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. Vol. 39, Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 2000–25.
- 29.** Nilsson AS. Phage therapy-constraints and possibilities. Vol. 119, Upsala Journal of Medical Sciences. Informa Healthcare; 2014. p. 192–8.
- 30.** Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Vol. 5, Virulence. Taylor and Francis Inc.; 2014. p. 226–35.
- 31.** Cui Z, Guo X, Feng T, Li L. Exploring the whole standard operating procedure for phage therapy in clinical practice. Vol. 17, Journal of Translational Medicine. BioMed Central Ltd.; 2019.
- 32.** La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [cited 2020 May 19]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- 33.** Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. Front Microbiol. 2019;10(APR).
- 34.** Bhardwaj SB, Mehta M, Sood S, Sharma J. Isolation of a novel phage and targeting biofilms of drug-resistant oral enterococci. J Glob Infect Dis. 2020 Jan 1;12(1):11–5.
- 35.** Khalifa L, Shlezinger M, Beyth S, Hourri-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Beyth N, et al. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. Vol. 8, Journal of Oral Microbiology. Co-Action Publishing; 2016.
- 36.** Bolocan AS, Upadrasta A, De Almeida Bettio PH, Clooney AG, Draper LA, Ross RP, et al. Evaluation of phage therapy in the context of *enterococcus faecalis* and its associated diseases. Viruses. 2019 Apr 1;11(4).
- 37.** Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Immun. 2002;70(1):204–10.
- 38.** Gutiérrez D, Fernández L, Rodríguez A, García P. Are phage lytic proteins the secret weapon to kill *staphylococcus aureus*? Vol. 9, mBio. American Society for Microbiology; 2018.
- 39.** Tkhilaishvili T, Wang L, Tavanti A, Trampuz A, Di Luca M. Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Bacteriophage Formulations, Staphylococcal Bacteriophage and PYO Bacteriophage, Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Prevention and Eradication of Biofilm Formation and Control of a Systemic Infection of *Galleria mellonella* Larvae. Front Microbiol. 2020 Feb 7;11.
- 40.** Morris JL, Letson HL, Elliott L, Grant AL, Wilkinson M, Hazratwala K, et al. Evaluation of bacteriophage as an adjunct therapy for treatment of peri-prosthetic joint infection caused by *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2019;14(12).
- 41.** Cobb LH, Park JY, Swanson EA, Beard MC, McCabe EM, Rourke AS, et al. CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection. PLoS One. 2019;14(11).
- 42.** Domingo-Calap P, Beamud B, Vienne J, González-Candelas F, Sanjuán R. Isolation of four lytic phages infecting *Klebsiella pneumoniae* K22 clinical isolates from Spain. Int J Mol Sci. 2020 Jan 2;21(2).
- 43.** Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyles L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. Vol. 69, Journal of Medical Microbiology. Microbiology Society; 2020. p. 176–94.
- 44.** Bao J, Wu N, Zeng Y, Chen L, Li L, Yang L, et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-

resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2020 May 19]; 9(1):771-4. Available from:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1747950>

45. Anand T, Virmani N, Kumar S, Mohanty AK, Pavulraj S, Bera BC, et al. Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Jun 1;21:34–41.

46. Wu Y, Wang R, Xu M, Liu Y, Zhu X, Qiu J, et al. A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Front Microbiol*. 2019 Dec 3;10.

47. Yin S, Huang G, Zhang Y, Jiang B, Yang Z, Dong Z, et al. Phage Abp1 Rescues Human Cells and Mice from Infection by Pan-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2017 [cited 2020 May 19];44:2337-45. Available from:

www.karger.com/cpbwww.karger.com/cpb

48. Shen GH, Wang JL, Wen FS, Chang KM, Kuo CF, Lin CH, et al. Isolation and Characterization of ϕ km18p, a Novel Lytic Phage with Therapeutic Potential against Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2012 Oct 5;7(10).

49. Isler B, Doi Y, Bonomo RA, Paterson DL. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jan 1;63(1).

50. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Drab M, Strus M, Gamian A. Identification and characterization of phage protein and its activity against two strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).

51. Sausseureau E, Vachier I, Chiron R, Godbert B, Sermet I, Dufour N, et al. Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 May 19];20(12):O983–90. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15600490>

52. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution (N Y)*. 2018;60–6.

53. Chan BK, Sstrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2016 May 26;6.

54. Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun*. 1998;66(2):645–9.

55. Wang K, Tamayo MG, Penner T V., Cook BWM, Court DA, Theriault SS. Characterization of the *Enterobacter* Phage vB_EclM_CIP9. *Microbiol Resour Announc*. 2020 Mar 26;9(13).

Figura 1. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2020 May 19];212(6):279–85. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/mja2.50355>

Figura 2. Saldaña Lucio C. Efecto de la aplicación de bacteriófagos sobre biofilms mixtos. 2015 Jul [cited 2020 May 19]; Available from:

http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/32356/6/TFM_CasandraSaldanaLucio.pdf

Figura 3. Romero-Calle D, Benevides RG, Góes-Neto A, Billington C. Bacteriophages as alternatives to antibiotics in clinical care. Vol. 8, *Antibiotics*. MDPI AG; 2019.

Figura 4. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Curr Med Chem*. 2015 Jun 15;22(14):1757–73.

Figura 5. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—A quick guide. Vol. 8, *Antibiotics*. MDPI AG; 2019.

Figura 6. Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. Vol. 7, *Antibiotics*. MDPI AG; 2018.