

Bacteriófagos: terapia alternativa para el control de infecciones bacterianas

Bacteriophages: alternative therapy to control bacterial infections

Hazel Álvarez-Cabalceta¹;  <https://orcid.org/0000-0001-9291-9230>

Oscar Salas-Ocampo²;  <https://orcid.org/0009-0008-0296-9313>

1. Licenciada en Microbiología y Química Clínica, Laboratorio Clínico Hospital La Anexión, CCSS; halvacaba@hotmail.com
2. Licenciado en Microbiología y Química Clínica, Laboratorio Clínico del Hospital La Anexión, CCSS; odavid2690@gmail.com

Recibido 07 de octubre de 2020. Aceptado 12 de noviembre de 2020.

RESUMEN

La creciente prevalencia y extensa diseminación de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos alrededor del mundo, sumado al escaso desarrollo de nuevos antibióticos a partir de la década de los 70, requiere de la creación de nuevas estrategias para controlar infecciones bacterianas. Dentro de las terapias alternativas se encuentra el uso de bacteriófagos, entidades que más abundan en el medio ambiente, en costas, ecosistemas terrestres y en cuerpo de animales y plantas. El estudio de los bacteriófagos ha retomado interés por su eficiencia y seguridad en su uso para el control de infecciones bacterianas. En la presente revisión se detallan antecedentes históricos que llevaron al descubrimiento y desarrollo de esta alternativa; asimismo, se explican sus mecanismos de acción y, por último, se detalla el estado del arte.

Palabras claves: Bacteriófagos; terapia de fagos; infecciones bacterianas.

ABSTRACT

The increasing prevalence and widespread dissemination of multi resistant pathogenic bacteria to antibiotics around the world, coupled with the limited development of new antibiotics from the 1970s, requires the creation of new strategies to control bacterial infections. Among the alternative therapies is found the use of bacteriophages, entities that are very abundant in the environment, in coasts, terrestrial ecosystems and in the body of animals and plants. The study of bacteriophages has resumed interest in their efficiency and safety in their use for the control of bacterial infections. In this review are detailed historical antecedents that led the discovery and development of this alternative therapy; also, are explained its mechanisms of action and, finally, are explained the state of art.

Key words: Bacteriophages; phage therapy; bacterial infections.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes en el medio ambiente. Se encuentran principalmente en aguas costeras, sedimentos marinos, ecosistemas terrestres y en el cuerpo de animales e insectos; tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de aislar y de propagar, y han evolucionado para matar cepas bacterianas específicas. Pueden dividirse en 13 familias y 30 géneros, y se cree que en el planeta hay 10 bacteriófagos por cada bacteria (1).

Para entender y analizar mejor la aplicación de los bacteriófagos como alternativa novedosa para el control de infecciones bacterianas, es importante conocer su historia, la cual data de miles de años atrás.

Desde la antigüedad se ha reportado que las aguas de los ríos poseen la habilidad de curar infecciones como la lepra. Sin embargo, fue hasta 1896 que el bacteriólogo británico Ernest Hanbury Hankin observó que en los ríos Ganges y Yamuna había una actividad microbida contra *Vibrio cholerae* y sugirió que una sustancia desconocida era la responsable

de limitar la epidemia. En 1898, un bacteriólogo ruso llamado Gamaleya observó un fenómeno similar con *Bacillus subtilis*. En 1910, el microbiólogo canadiense Felix d'Herelle observó por primera vez el fenómeno bacteriofágico, cuando en el laboratorio vio que existían zonas redondas sin crecimiento bacteriano en cultivos de agar; seis años más tarde propuso el nombre de bacteriófagos, es decir, "que comen bacterias". En 1914, Frederick Twort, un bacteriólogo británico, argumentó que el fenómeno que se observaba podía ser causado por un virus. En 1917, d'Herelle empezó a probar bacteriófagos en pacientes humanos en París y demostró su seguridad al ser ingeridos, así como su eficacia al ser administrados a un niño de 12 años y luego a tres pacientes más con disentería, en quienes cesaron totalmente los síntomas a las 24 horas y después comenzaron a recuperarse (2).

En 1921, Bruynoghe y Maisin publicaron en Bélgica el primer artículo sobre el uso clínico de fagos, producto de una investigación realizada en la que utilizaron bacteriófagos para tratar furúnculos cutáneos y carbúnculos inyectando fagos específicos contra *Staphylococcus sp.*, logrando demostrar una mejoría clínica durante las primeras 24 horas, con reducción de la hinchazón y el dolor.

En 1925, Bordet propuso el fenómeno de lisogenia, basándose en el hecho de que los bacteriófagos podían infectar bacterias sin inducir lisis. Posteriormente, Frank MacFarlane también trabajó en lisogenia y confirmó la naturaleza viral de los fagos, además de su interacción con el hospedero. Tiempo después, con la llegada de la microscopía electrónica, el alemán Helmut Ruska observó por primera vez partículas de fagos adheridos a una membrana bacteriana. Un año más tarde, Luria y Anderson en Estados Unidos describieron que algunos fagos tenían una cabeza redonda no homogénea con una cola delgada y detallaron los pasos de la lisis bacteriana que causan (3).

En general, los bacteriófagos pueden ser clasificados morfológicamente y en familias. En primer lugar, se encuentran los fagos con cola, los cuales son ubicuos, con ADN doble banda y comprenden las familias *Myoviridae* con una cola contractil, *Siphoviridae* con cola larga y no contráctil, y *Podoviridae* con cola corta. Todos los fagos con cola poseen una cápside icosaédrica y una cola helicoidal vacía constituida por subunidades. Los fagos poliédricos son icosaédricos o casi-icosaédricos; se dice que tienen una simetría cúbica y comprenden familias de virus que contienen lípidos y son ADN doble banda, como *Microviridae*, *Corticoviridae* y *Tectiviridae*; así como familias que contienen ARN, como *Leviviridae* y *Cystoviridae*. Los fagos filamentosos comprenden virus con ADN doble banda, como la familia *Inoviridae*, que incluye géneros con filamentos largos (*Inovirus*) o bastones cortos (*Plectovirus*), por lo que son muy heterogéneos. Por último, los fagos pleomórficos, representados por la familia *Plasmaviridae*, poseen envolturas de lipoproteínas y contienen un ADN doble banda desnudo sin cápsula (4).

MECANISMOS DE ACCIÓN

La terapia con bacteriófagos fue utilizada ampliamente para controlar infecciones bacterianas una década antes del descubrimiento de la penicilina. Los bacteriófagos pueden realizar un ciclo de vida virulento, llamado lítico, o uno temperado. En el ciclo de vida virulento provocan una rápida lisis que lleva a la muerte bacteriana, por lo que posee gran importancia en la parte terapéutica. Por otro lado, en el ciclo de vida temperado los fagos se encuentran en un estado quiescente, en el que los llamados prófagos se replican cuando el genoma bacteriano se replica y así las células hijas heredan el ADN viral. En el caso de la terapia con bacteriófagos, los bacteriófagos temperados poseen poca aplicación (5).

En el ciclo de vida lítico, el virus se une a la bacteria hospedera mediante receptores específicos en la superficie, que incluyen proteínas, oligosacáridos, ácidos teicoicos, peptidoglicanos y LPS. Primero se da una unión reversible, que luego se hace irreversible, y se da la transferencia del material genético hacia la célula hospedera. Los fagos poseen en la cola una enzima lítica integral que localmente digiere la pared celular, para facilitar la inyección del genoma; muchas bases presentes en el ADN del fago tienen alteraciones químicas que le ofrecen protección contra el ataque de enzimas intracelulares. Posteriormente, el genoma viral se transcribe en un ARNm viral que direcciona así los procesos metabólicos celulares hacia la producción de nuevos componentes virales. Por último, los virus se ensamblan, produciendo partículas virales dentro de la célula, que con enzimas líticas virales atacan el peptidoglicano, provocando la lisis bacteriana (5).

Estas enzimas líticas, también llamadas lisinas, destruyen la integridad de la pared celular y están destinadas a atacar a uno de los cinco enlaces químicos principales del peptidoglicano. Mediante microscopía electrónica se ha evidenciado que las lisinas forman agujeros en la pared celular, lo que resulta en lisis, debido a que no se logran controlar los cambios en turgencia (6). Las lisinas pueden ser agrupadas según su capacidad catalítica en: muramidasa, glucosaminidasas, NAM-amidasas, endopeptidasas y transglicosilasas líticas. Las muramidasa, glucosaminidasas y transglicosilasas líticas actúan sobre los enlaces entre azúcares, las NAM-amidasas hidrolizan el enlace amida que conecta la cadena de azúcar con el péptido constituyente del peptidoglicano y las endopeptidasas son peptidasas de enlaces específicos entre péptidos (7).

ESTADO DEL ARTE

La terapia bacteriofágica en la medicina moderna enfrenta numerosos obstáculos. Uno de los principales problemas es que los fagos individuales tienen un espectro de acción muy estrecho, que les impide ser efectivos contra un amplio rango de bacterias. Además, las bacterias puedan generar resistencia a fagos mediante mecanismos extra e intracelulares, como la resistencia a la adsorción por pérdida de receptores

para el fago o, bien, por la síntesis de barreras físicas, como cápsulas, que esconden los receptores. Las bacterias que forman biofilms o cápsulas también están asociadas a una mayor resistencia a bacteriófagos; estudios recientes han demostrado que se pueden atacar estas células con mayor eficiencia utilizando fagos modificados genéticamente para entregar enzimas de quórum-quenching o depolimerasas (1, 8, 9).

Existen mecanismos de inmunidad a las infecciones por fagos mediados por sistemas denominados CRISPR/cas, que son análogos funcionales de los sistemas de ARN de interferencia de células eucariotas. La mayoría de los loci CRISPR incluyen un conjunto de genes codificantes de proteínas llamadas cas; la proteína cas1 está universalmente identificada en todos los sistemas CRISPR/CAS y se ha establecido que es una ADN endonucleasa/integrasa metalo-dependiente; estos hallazgos permiten proponer que la función de cas1 pueden estar implicada en el reconocimiento y/o ruptura de ADN extraño e integración de espaciadores en el locus de CRISPR. Al ocurrir una infección, segmentos de ADN viral son incorporados al genoma bacteriano entre repeticiones palindrómicas separadas de forma regular. Luego se da la expresión de CRISPR, la cual involucra la transcripción de secuencias de CRISPR y el subsecuente procesamiento a pequeños ARN guía. Por último, la interferencia de CRISPR efectuada por los ARN guía pequeños forma un complejo con las proteínas cas, que por medio de unión y/o degradación elimina los blancos invasivos (10).

Otra desventaja ligada a la utilización de los fagos como terapia clínica es que el proceso de manufactura implica múltiples pasos. Deben existir niveles de control de calidad durante la producción, la purificación y la formulación, por lo que su comercialización se torna complicada, en especial si se considera que en muchos casos se necesitan tratamientos multifágicos. Por otro lado, la presencia de endotoxinas liberadas durante la lisis celular en las preparaciones puede llevar a inflamación sistémica y aumento en la mortalidad y morbilidad en los pacientes. Finalmente, los bacteriófagos administrados pueden inactivarse por medio del sistema inmune del paciente, incluyendo al sistema retículo endotelial (8).

A pesar de lo anterior, los bacteriófagos también poseen una serie de ventajas. En primer lugar, los fagos son las entidades vivientes que más abundan en el planeta, por lo que su aislamiento no es inusual. El rango estrecho de hospederos puede implicar una ventaja, porque en caso de una terapia, no se vería afectada la flora normal, sino solamente el patógeno que se quiere combatir (11).

Tampoco se han encontrado efectos secundarios en la aplicación de fagos a seres humanos. Sarker y colaboradores realizaron un estudio aplicando fagos T4 vía oral a adultos voluntarios sanos, a quienes posteriormente se les midieron parámetros vitales, función renal y hepática, hematología y complicaciones gastrointestinales, y no observaron un parámetro consistente que sugiriera un efecto adverso en la terapia bacteriófágica (12).

Por otra parte, se han realizado numerosos estudios clínicos para evaluar la eficacia y la seguridad de la terapia bacteriófágica en humanos, pero estos no se han hecho bajo rigurosos estándares ni con los controles adecuados que requiere un análisis clínico. A pesar de ello, en los últimos años se han publicado reportes de terapia bacteriófágica controlada en países como Estados Unidos, Suiza e India. Además, en Polonia y Bélgica se realizan tratamientos experimentales en humanos bajo la Declaración de Helsinki, y en Georgia y Rusia es considerado como un tratamiento estandarizado (13).

En el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental de Wrocław, en Polonia, desde 1948 se inició una colección de bacteriófagos contra diversas cepas bacterianas, incluyendo aquellas multiresistentes. Entre el 2008 y el 2010, 157 pacientes fueron admitidos para terapia fágica en la Unidad de Terapia Fágica de dicho instituto, con infecciones en tracto urinario y genital, de tejidos, ortopédicas y respiratorias; a estos pacientes se les administraron fagos contra *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* y/o *Stenotrophomonas*, durante 12 días y hasta 12 semanas. La efectividad de la terapia fue evaluada mediante resultados provenientes de cultivos celulares, intensidad de los síntomas y opinión de especialistas médicos. Al final, se observó una respuesta inadecuada a la terapia en 92 pacientes (60,1 %) y una buena respuesta en 61 pacientes (39,9 %); en particular, hubo una erradicación y/o recuperación en 28 de ellos (18,3 %) (13).

Por otro lado, en el 2009, Wright y colaboradores publicaron un ensayo clínico controlado, aleatorio y doble ciego, que mostró la eficacia y la seguridad de usar bacteriófagos para tratar otitis crónica causada por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. En total, participaron 24 pacientes adultos con una variedad de condiciones, como cirugía de mastoides, perforaciones crónicas y otitis externa; a ellos se les administró una mezcla de seis bacteriófagos distintos o un placebo de glicerol y buffer fosfato salino, y se les evaluó a los siete, 21 y 42 días postratamiento. A 12 pacientes se les administró el coctel de bacteriófagos, mientras que a los otros 12 el placebo. Los pacientes completaron una Escala Análoga Visual (VAS) donde se tomaron en cuenta cuatro parámetros: malestar, picazón, humedad y olor, clasificándolos desde "ninguno de los parámetros" hasta "peor que nunca" en una escala de cero a 100 %; todos los pacientes tratados iniciaron el día cero con una VAS de 100 %. Al día 42 se observaron indicadores de mejoría en el grupo tratado con bacteriófagos, donde todos los pacientes mejoraron excepto uno; tres de los pacientes tuvieron una mejoría completa, con una reducción de la VAS de más del 80 % y la reducción media fue del 50 %. En el grupo placebo ningún paciente mostro mejoría del 80 % y la media de reducción fue del 20 %. En los 12 pacientes del grupo tratado con fagos no se tuvo recuentos de *P. aeruginosa* los últimos 10 días del estudio; además, en dos de esos pacientes no se detectó la bacteria en ninguno de los días posteriores al tratamiento; sin embargo, esta sí se detectó en todos los pacientes placebo (14).

Durante ese mismo año, Rhoads y colaboradores publicaron un ensayo clínico en fase I, aleatorio y doble ciego, para demostrar la seguridad al realizar la terapia bacteriofágica en humanos. En este caso participaron 42 pacientes con piernas ulceradas crónicas, de los cuales 39 completaron todo el ensayo. Las úlceras fueron tratadas por 12 semanas utilizando un coctel con ocho bacteriófagos, llamado WPP-201, que contenía fagos contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. Al final del estudio no se pudo observar un efecto significativo en la curación de la úlcera, pero tampoco se encontró ningún efecto adverso luego de la administración de los fagos (15).

CONCLUSIONES

La terapia con bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas arroja resultados prometedores; sin embargo, se ha evidenciado que su efectividad aumenta cuando se combina con antibióticos. La información recopilada deja en evidencia que faltan muchas investigaciones *in vivo* para demostrar su verdadera eficacia en pacientes o en poblaciones bacterianas multirresistentes, por lo que no se puede afirmar que sea efectiva para el control de enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Para la doctora Jendry María Díaz Angulo, directora del Laboratorio Clínico del Hospital La Anexión, por fomentar la investigación y la mejora continua del servicio.

DECLARACIÓN SOBRE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores manifestamos que durante la redacción del manuscrito no han incidido intereses o valores distintos a los que usualmente tiene la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kilcher S, Loessner MJ. Engineering bacteriophages as versatile biologics. *Trends Microbiol.* 2019; 27(4): 355-367.
2. Golkar Z, Bagasra O, Pace D. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 8(2):129-136.
3. Wittebole X, De Roock S, Opal S. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014; 5(1): 226-235.
4. Ackermann H. Bacteriophage electron microscopy. *Adv Virus Res.* 2012; 82(1): 1-32.
5. Hanlon G. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Ag.* 2007; 30(2):18-128.
6. Fischetti V. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11(5): 393-400.
7. Hermoso J, García J, García P. Taking aim on bacterial pathogen: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10(5): 461-472.
8. Lu T, Koeris M. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(5): 524-531.
9. Hyman P, Abedon S. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol.* 2010; 70(10): 217-248.
10. Szczepankowska A. Role of CRISPR/cas system in the development of bacteriophage resistance. *Adv Virus Res.* 2012; 82(1): 289-338.
11. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010; 28(12): 591-595.
12. Sarker S, McCallin S, Barreto C, Berger B, Pittet A, Sultana S, Krause L, Huq S, Bibiloni R, Bruttin A, Reuteler G, Bruessow H. Oral T4- like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology.* 2012; 434(2): 222-232.
13. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawelczyk Z, Rogoz P, Klak M, Wojtasik E, Gorski A. Clinical aspects of phagetherapy. *Adv Virus Res.* 2012; 83(1): 73-121.
14. Wright A, Hawkins C, Anggard E, Harper D. 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): 349-357.
15. Rhoads D, Wolcott R, Kuskowski M, Wolcott B, Ward L, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care.* 2009; 18(6): 237-240.