Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)

Segundo-Arizmendi, N.; Hernández-Baltazar, E.; Villegas , O. &Torres-Angeles , O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia) . *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41*(3), 17-26.

e-uaem Espacio de Formación Multimodal

Revisión Bibliográfica

Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)

Bacteriophages as an alternative in the treatment of bacterial infection diseases (Phage Therapy)

Nallelyt Segundo A.[1], Efrén Hernández B.[1], Oliver López V.[2], Oscar Torres A.[1]

[1]Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
[2]Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Resumen

Los bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias. Se han aplicado en: Biología Molecular e Investigación Clínica, principalmente en el tratamiento de infecciones bacterianas (Fagoterapia). Los bacteriófagos se han utilizado contra *Pseudomonas, Staphylococcus, Escherichia y Mycobacterium*, resistentes a antibióticos.

Existen compañías que comercializan fagos para terapia en humanos o animales además de otras aplicaciones como sanitizantes. Sin embargo, las farmacopeas mexicana y estadounidense no cuentan aún con un apartado específico para estos productos, por lo que se rigen por el apartado de biológicos.

Los métodos de cuantificación de fagos incluyen técnicas tradicionales como la dilución en placa, o citometría de flujo.

El presente trabajo resalta la importancia actual de los bacteriófagos fundamentalmente en la clínica, donde presentan grandes ventajas para emplearse contra enfermedades causadas por microorganismos resistentes.

Abstract

Bacteriophages are viruses that infect and kill bacteria. They have been applicated in: Molecular Biology and Clinical Research mainly for the treatment of bacterial infections (Phage Therapy). Bacteriophages have been used against *Pseudomonas, Staphylococcus, Escherichia* and *Mycobacterium* resistant to antibiotics.

There are companies which sale phages for human or animal therapy, as well as sanitizing agents. However, Mexican and American Pharmacopeias do not have yet a specific section for these products, thus bacteriophages are regulated by the biologics monograph.

Quantification methods for phages include traditional techniques like dilution in plate or flow cytometry.

This review emphasizes the current importance of bacteriophages basically in the clinical area where there are great advantages in its use for the treatment of diseases caused by drug-resistance microorganisms.

Palabras Clave: bacteriófagos, fagoterapia, resistencia bacteriana.

Keywords: bacteriophages, phage therapy, drug-resistant bacteria.

Correspondencia
Dr. Oscar Torres Ángeles
Laboratorio 9 de la Facultad de Farmacia
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa
C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos. Campus Chamilpa

Tel. / Fax: (01-777) 329 7089
e-mail: oscarta@hotmail.com

Fecha de recepción: 9 de diciembre de 2009
Fecha de recepción de modificaciones: 30 de agosto de 2010
Fecha de aceptación: 9 de septiembre de 2010

Introducción

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias de manera especie específica, consisten fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de DNA o de RNA el cual puede ser de cadena doble o de una sola cadena. El mencionado material genético es protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside[1]. La estructura de los fagos, es determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético fágico, éstas proteínas pueden además proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, laminas básales y/o espículas[2].

La forma en la que se arreglan las proteínas alrededor del material genético del virus, define la complejidad estructural y la forma del mismo, de tal modo que existen fagos icosaédricos, helicoidales o filamentosos[3], como se ilustra en la figura 1.

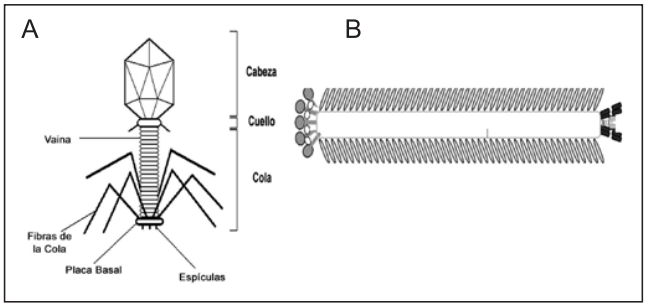

Figura 1. Estructuras proteicas que pueden componer aun bacteriófago. A) Bacteriófago complejo con simetría icosaedrica, B) bacteriófago con simetría filamentosa.

Sin embargo una de las propiedades más asombrosas de estos agentes virales, es que han sido llamados, "la forma de vida más abundante y ubicua en la tierra" [4] ya que se calcula que hay alrededor de 1 X 10^{30} UFP/mL, o más sólo en el agua de mar[5]; sin embargo, éstos han sido aislados desde aguas residuales, hasta muestras de tierra o cieno[6].

Los fagos como todos los virus son parásitos obligados intracelulares, es decir necesitan estar dentro de una bacteria para poder replicarse y en este sentido, los fagos han desarrollado dos ciclos replicativos los cuales han sido esquematizados por el Dr. Kameyma (Figura 2). El primer ciclo replicativo es el denominado lítico lo llevan a cabo los fagos virulentos, en donde se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por los contra receptores del fago, una adsorción del fago a la célula huésped, seguido de la penetración del ácido nucleíco fágico a la bacteria, el desarrollo intracelular de los componentes fágicos y la liberación de progenie viral. El segundo es el denominado ciclo lisogénico, desarrollado por los fagos temperados comprende prácticamente los mismos pasos que el lítico, pero después de la penetración, él ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, no obstante en éste ciclo, el fago tras un proceso de daño grave al material genético de la bacteria, puede salir del cromosoma bacteriano y llevar a cabo un ciclo lítico; este es un modo de infección latente y ocurre con baja frecuencia[2]. El tiempo que tarda la replicación viral es variable, algunos de ellos pueden replicarse en cuestión de minutos (alrededor de 30). En cuanto a la cantidad de virus liberado por bacteria infectada, (tamaño de estallamiento) varía dependiendo de cada caso (50-100).[7]

Cabe destacar que a pesar de que el proceso de replicación fágica tiene un orden (primero se expresan los genes tempranos que sintetizan copias del material genético, posteriormente los genes medios o cuasi-tardíos, que codifican para las proteínas estructurales, y finalmente los genes tardíos, que se encargan de sintetizar las lisinas que rompen la pared celular y liberan la progenie viral). El proceso no se detiene, es decir, al tiempo que

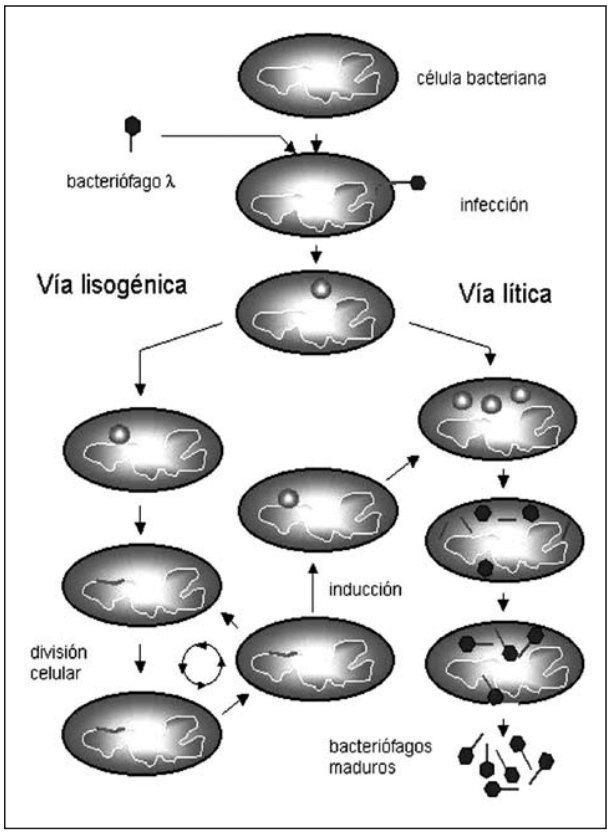

Figura 2. Representación esquemática de las dos alternativas del ciclo replicativo completo del bacteriófago λ (Kameyama).[43]

se sintetizan las lisinas que rompen pared, se están produciendo proteínas estructurales y se esta ensamblando el fago, por lo que al momento del estallamiento de la célula se pueden encontrar viriones (virus completos e infectivos), fragmentos de material genético, cápsides y demás proteínas estructurales vacías y no infectivas[8], como se observa en la figura 3.

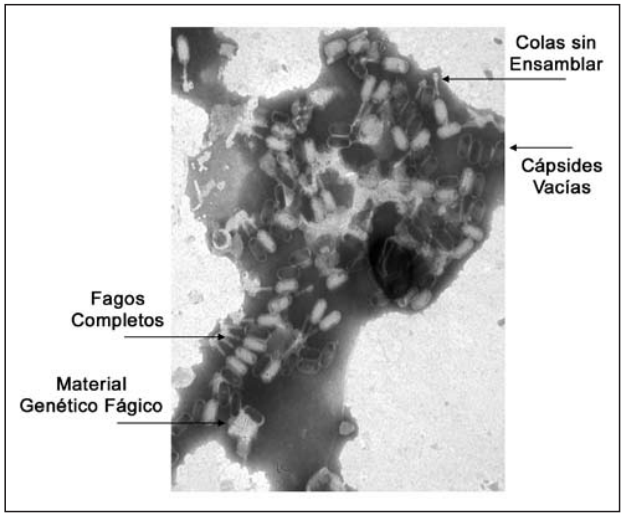

Figura 3. Fotomicrografía electrónica del bacteriófago S_1 tras 90 min. de infección a la bacteria indicadora (*Salmonella typhi T1*). La muestra fue teñida con la técnica de tinción negativa en la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Fotografías tomadas por los autores).

Antecedentes históricos de la fagoterapia: los bacteriófagos fueron observados por primera vez en 1896, cuando Ernest Hankin, un bacteriólogo británico reportó haber observado una marcada actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, en aguas tomadas de los ríos Ganges y Junna en la India y sugirió la existencia de una sustancia no identificada que pasaba a través de poros finos y lábil al calor responsable de éste fenómeno. Dos años después Gamaleya un bacteriólogo ruso observó un fenómeno similar; sin embargo fue hasta 1915, cuando Frederick Twort, un médico bacteriólogo británico, reportó haber observado la presencia de agentes filtrables y fue él quien aventajo la hipótesis de que podrían ser virus, no obstante debido a diversas circunstancias –algunas de ellas financieras- Twort no continuó con sus experimentos, y fue hasta dos años después cuando se consideró a los fagos oficialmente descubiertos cuando el Francocanadiense Félix d´Herelle les dio nombre por primera vez en 1917.[1,9,10]

El descubrimiento de los bacteriófagos, por d´Herelle se desarrolló cuando éste buscaba una vacuna que pudiera combatir la crisis de disentería hemorrágica que se presentó en 1915 en las afueras de Francia. Sobre estos estudios d´Herelle observó que tras aislar lisados libres de bacterias de la materia fecal de los enfermos las bacterias eran destruidas por un agente desconocido, invisible capaz de destruir cultivos de bacterias o producir pequeñas áreas de color más claro cuando las bacterias eran crecidas en confluencia en placas de medio sólido, y publicó sus observaciones en el artículo titulado, "Sobre un microbio invisible antagonista de los bacilos de la disentería."[10, 11]

Sobra decir que fue precisamente d´Herelle quien experimentó por primera vez con la actividad antibacteriana de los fagos, primero en animales aislando fagos a partir de heces de pollos tratando exitosamente una plaga de disentería de pollo y luego en humanos, éstos estudios fueron desarrollados en el Hospital de Enfants-Malades en París en 1919, el mismo d´Herelle tomó una preparación para garantizar la inocuidad antes de administrarle dicha preparación a un niño de 12 años con disentería severa tras lo cual los síntomas del paciente cesaron con sólo una administración del fago, es decir, el niño se recuperó totalmente a los pocos días. De igual manera tres pacientes adultos se recuperaron de la misma enfermedad en sólo 24 horas después de haber ingerido la preparación. Así mismo en 1921 Richard Bruynoghe y Joseph Maisin usaron un tratamiento a base de bacteriófagos para tratar infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus*. El laboratorio comercial de d´Herelle, produjo en París al menos cinco productos a base de fagos, contra varias infecciones bacterianas, las preparaciones llevaron los nombres de: Bacto-coli-phage, Bacto-rhino-phage, Bacto-intestini-phage, Bacto-pyo-phage y Bacto-staphy-phage, los cuales fueron comercializados por la que posteriormente se convirtió en la compañía francesa L´Oreál. Así para 1940 en Estados Unidos Ely Lilly, produjo al menos siete productos de fagos para uso humano. Estas preparaciones consistían de lisados fágicos estériles procedentes directamente de caldos de cultivo bacteriológicos en donde se propagaban los fagos o en gelatina soluble en agua. De hecho durante la Segunda Guerra Mundial los ejércitos de Alemania y la Unión Soviética usaron fagos contra la disentería y el ejército Estadounidense dirigió una investigación sobre fagos, así, la época de 1920 a 1950 se considera cómo la era histórica de la fagoterapia.[10,12]

Sin embargo y pese a los éxitos que consigue d´Herelle en las aplicaciones terapéuticas de los fagos, la eficacia de los productos a base de fagos fue controversial, es decir el tiempo demostró que no se disponía, en ese momento, de medios técnicos adecuados para tratar racionalmente las muestras que contenían fagos, otros problemas con los que se enfrentó la fagoterapia en ese momento fueron: el desconocimiento de la biología de los fagos-pues se llego a afirmar en citas bibliográficas que los fagos eran proteínas de alto peso molecular que se formaban a partir de un precursor originado al interior de la bacteria-, el diseño erróneo de protocolos experimentales, la falta de controles adecuados que demostraran que se empleaban fagos enteramente líticos y no lisogénicos, la presencia de restos celulares bacterianos

en los lisados fágicos, la ausencia de estudios farmacocinéticos que proporcionaran información a cerca de la eliminación de las partículas fágicas, y la aparición de los antibióticos en los 40´s condujeron al abandono del uso terapéutico de los fagos en Occidente[7,10,13]

Por otro lado, las investigaciones con estos agentes fágicos continuó, en varios campos de la ciencia, las cuales se analizan brevemente en el presente trabajo.

Bacteriófagos en la Biología Molecular: la era moderna de los estudios de Biología Molecular con fagos comenzó con los trabajos de Max Delbruck en 1938, rápidamente otros investigadores como Salvador Luria se unieron a él en el estudio de fagos, como vía para comprender las características fundamentales de la vida biológica, de éste modo, se determinó la composición química del virión, (proteínas y material genético), las primeras microfotografías electrónicas de los fagos fueron obtenidas, por Thomas Anderson en 1943. El trabajo con fagos permitió determinar los tipos de mutaciones genéticas, que los genes son segmentos de DNA, la transferencia de genes entre células, mediadas por virus, las enzimas de restricción y modificación, la colinealidad de genes y proteínas, y el DNA de cadena simple del fago ϕX174. A partir de los 60´s las investigaciones con bacteriófagos continuaron mostrando resultados asombrosos como la descripción del RNAm, la naturaleza del código genético, el carácter físico de la recombinación genética, el mecanismo de acción de los factores de transcripción, la recombinación sitio especifica, la descripción de la DNA ligasa, y la anti-terminación como mecanismo de regulación transcripcional, además se describieron nuevas características del mecanismo de replicación , la síntesis discontinua, los fragmentos de Okazaki, el mecanismo de replicación por circulo rodante, y el papel de los cebadores o iniciadores de RNA en la etapa de iniciación de este proceso. Otros estudios con fagos llevan a la identificación de las chaperoninas, a la caracterización de transposones, al hallazgo de genes sobrelapados, a la descripción de la retroalimentación negativa como mecanismo de la regulación transcripcional y el uso de fagos reporteros para el diagnostico medico. Por otro lado, el uso de los bacteriófagos como vectores en la entrega de material genético a bacterias y la producción de proteínas recombinantes, es una técnica que se sigue usando en nuestros días, aunque la variedad de vectores que existe en la actualidad sea mucho muy diversa[1,14]

Biología Combinatoria o "fago-pantalla": en 1982, Renato Dulbecco sugirió que péptidos inmunogénicos derivados de epítopos bien caracterizados de agentes patógenos podrían ser fusionados a las proteínas de la cápside de un fago y la partícula resultante (fago-pantalla, o Phage-Display) podría ser usada como componente principal de vacunas libres de células. En 1985, George Smith demostró que el genoma de los fagos filamentosos podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas fágicas que presentan péptidos fusionados a proteínas de su superficie. Estas observaciones estimularon las investigaciones posteriores en este campo y favorecieron el establecimiento de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas, este tipo de vacunas se han probado en animales y sus resultados han sido beneficiosos.[1,15]

Esta vertiente de fagoterapia ha tenido sus variaciones, por ejemplo el grupo del Dr. Benhar, desarrollo, con un éxito moderado, un bacteriófago que contenía en su superficie moléculas de antibióticos, no péptidos inmunogénicos, basados en la idea de que al reconocer el fago filamentoso al patógeno (*Staphylococcus aerus*) se necesita poco antibiótico para matarlo y que al requerir tan poca cantidad de antibiótico, las reacciones adversas del cloramfenicol se verían reducidas.[16]

Detección e identificación Bacteriana: por muchos años, la especificidad de los fagos para con sus huéspedes bacterianos ha permitido usarlos para la tipificación de bacterias patógenas, los fagos que se unen a las bacterias pueden ser fácilmente identificados por anticuerpos marcados lo que incrementa la sensibilidad de la detección. De igual manera, los fagos se pueden adicionar sobre las muestras de bacterias aisladas de pacientes, donde se produzca una placa lítica (zona clara en una caja con crecimiento confluente de bacterias), existe la bacteria que el fago es capaz de lisar y así es posible conocer la identidad de la bacteria que esta ocasionando la enfermedad. Otra manera de utilizar a los fagos en el diagnostico de las infecciones bacterianas, es adicionando en su genoma la información para la síntesis de la proteína verde fluorescente, la cual es expresada después de la infección de la bacteria blanco.[15]

La situación actual de la fagoterapia: a pesar de que la fagoterapia en los países Occidentales, se vio retrasada de los 50´s a los 80´s. En Rusia, Polonia, Georgia y la India, las investigaciones continuaron. En Georgia, el centro Tbilisi, fundado por d´Herelle y Eliava ha sido el productor de cepas de fagos, en Polonia el Instituto Hirzfield es el que ha proporcionado datos importantes sobre el tratamiento de más de 5500 casos de infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis, y otras) en humanos. La mayor parte de las cuales fueron casos crónicos. Los fagos utilizados para el tratamiento de estas infecciones, se administraron por vía oral, previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina, para proteger a los fagos de la acidez gástrica y posteriormente se comprobaba que los fagos llegaban a torrente sanguíneo, en este trabajo los investigadores Polacos reportaron que el 90% de los pacientes tratados, se recupero satisfactoriamente cesando la supuración y cerrándose las heridas y las fístulas.[1, 13]

En Polonia, el estudio de Slopek y colaboradores aportó nuevos datos que demostraban la efectividad de la fagoterapia, en su estudio, 372 personas con infecciones causadas por *Staphylococcus*,

de los que 151, además tenían alguna otra infección, tras la administración de fagos se encontró que: se obtuvo un 100% de efectividad en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, sin embargo en el caso de úlceras varicosas se logró eliminar la infección en el 75% de los pacientes; se determinó además, que en personas mayores de 60 años la respuesta al tratamiento era menor que en gente más joven, sin embargo al combinar la fagoterapia con los antibióticos, la respuesta en estas personas se incrementó considerablemente.[1]

Por otro lado, mientras en Europa existen innumerables reportes de fagos y fagoterapia desde el descubrimiento de los fagos. En los países occidentales la aparición de cepas bacterianas multiresistentes fue lo que desencadenó que los investigadores retomaran su interés a esta alternativa, no sólo para el tratamiento de infecciones en aves de corral, cabras, acuacultura, plantas y tratamiento de agua contaminada sino para tratamiento en humanos.[17,18] De tal modo que se han usado fagos contra *Pseudomonas, Staphylococcus aerus, Escherichia coli, Enterococcus faecium, Streptococcus pneumoniae, Aeromonas hidrofila y Mycobacterium tuberculosis*, entre muchas otras bacterias resistentes a uno o varios antibióticos como, ampicilina, vancomicina, etc. con diferentes grados de eficacia que van desde el 75 al 95% y en ocasiones el 100%.[19,20,21]

Los fagos han sido administrados por varias vías por ejemplo oral, tópica, intravenosa, intrapleural, utilizando títulos desde 10^5 hasta 10^{11}, sin reportes de complicaciones serias asociadas con su uso, probablemente porque los bacteriófagos son extremadamente comunes en el ambiente, se calcula que en agua no contaminada hay alrededor de 10^8 fagos/mL. En el caso de Occidente la investigación acerca de la fagoterapia se ha incrementado considerablemente, incluso han surgido industrias dedicadas a investigar a cerca del uso terapéutico de los bacteriófagos.[10]

Cabe destacar que las aplicaciones de los bacteriófagos cada vez son mayores, dado que los resultados obtenidos en los experimentos realizados, han sido buenos, su uso se ha extendido a la industria alimentaria, la compañía Intralityx por ejemplo tiene dos productos aprobados por la FDA para su uso en productos de consumo humano (ListShield que actúa específicamente contra *Listeria monocytogenes* y Ecoshield contra *Escherichia coli*), del mismo modo, EBI food Safety, una compañía estadounidense dedicada a la investigación y desarrollo de la fagoterapia, es dueña de la segunda marca de lisados fágicos para la prevención de infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* que fue aprobada por la FDA paras su venta y uso en peces y queso[22].

A decir verdad, la erradicación de patógenos bacterianos mediante fagos, se ha extendido a áreas tan importantes y diversas como:[23]

• Alimentos (Intralytix, EBI Foof Safety, New Horizons)
• Sanitización ambiental (Intralytix, Novolytics)
• Aplicaciones veterinarias (Intralytix, EBI Foof Safety, Novolytics)
• Aplicaciones en humanos (Intralytix, New Horizons, Exponential Biotherapies,
• Novolytics, Phage-biotech, Eliava Institute)[24,25,26,27]

En el caso de la compañía Intralytix en Maryland Estados Unidos, cuenta ya con patentes de preparaciones fágicas veterinarias como PLSV-1™, cuyo blanco es *Salmonella* y INT-401™ contra *Clostridium perfringens*. Asímismo, se cuenta con una preparación de fagos denominada Listshield™ la cual ha sido aceptada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en ingles) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en ingles) para ser usada en la descontaminación ambiental en plantas productoras de alimentos contra bacterias de los géneros, *Campylobacte*r, *Salmonella*, *Escherichia* y *Listeria*.[28] Además cuenta con los siguientes productos:

Ecoshield contra *Escherichia coli* O157:H7
Salmshield contra *Salmonella*
ShigActive contra *Shigella*
SAP 100 contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo a los meticilina resistentes, y vancomicina resistentes.
ABPP-100 contra *Acinetobacter baumannii*

Intralytix como parte de sus investigaciones actualmente estudia el desarrollo de un producto como el generado por el Instituto Tbilisi denominado PhagoBioDerm™, el cual es un polímero de matriz biodegradable a base de poliester amida, impregnado con bacteriófagos para ser usado vía tópica en pacientes con infecciones dérmicas contra cinco microorganismos (*P. aeruginosa, E. coli, Staphylococcus, Streptococcus, Proteus*),[29] y contiene también antibiótico como ciprofloxacino, un anestésico (Benzocaína), y enzimas proteolíticas (quimotripsina o tripsina).

A este respecto es importante destacar que en Europa, tanto el Instituto Tbilisi como Eliava, cuentan ya con un área especializada en la atención a humanos en el tratamiento de éstas enfermedades infecciosas.[30]

De modo tal que los fagos han sido utilizados contra una gran gama de bacterias, como se puede observar en la tabla 1. La investigación sobre fagos se encuentra dispersa por todo el mundo, ver tabla 2, donde se muestran algunas de las ciudades donde existen institutos que trabajan con fagos, así como los productos que han generado.

Regulación de los productos farmacéuticos derivados de bacteriófagos: a la fecha ni la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, ni la USP (United States Pharmacopeia), ni la FDA (Food and Drug Administration), tienen un apartado para

Tabla 1. Géneros bacterianos contra los cuales se han usado bacteriófagos

Género bacteriano	Referencia
Aeromonas	10
Cianobacterias	41
Enterococcus	10
Escherichia	10
Klebsiella	18
Lactococos	18
Mycobacterium	13
Proteus	10
Pseudomonas	10
Salmonella	10
Shigella	10
Staphylococcus	18
Streptococcus	10
Vibrio	10

especificar los requerimientos que debe cumplir un producto farmacéutico a base de bacteriófagos. Sin embargo; las normas que las compañías internacionales siguen, son las mismas tanto en Estados Unidos como en México. Es decir siguen las normas empleadas para productos biológicos tales como:

• Identidad: confirmación de la presencia del virus (o material biológico) como tal o incluido en un medicamento.[31,32,33]
• Seguridad: es decir que los posibles efectos adversos o riesgos del fármaco sean menores que los beneficios que proporciona.[31,32,33]
• Potencia: relaciona la cantidad o dosis administrada y la acción que produce[31,32]
• Título: garantizar la cantidad de unidades formadoras de Placas (fagos) por mililitro de la preparación o forma farmacéutica. En el caso de los bacteriófagos los títulos utilizados han sido de 10^3 a 10^{11} UFC/mL.[10,31,32,33]
• Pureza: grado en el cual las materias primas, los productos intermedios y a granel están exentos de materiales extraños. En el caso de virus esto comprende, restos de bacterias y toxinas bacterianas.[31,32,33]

En el caso de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se exige que los productos biológicos contengan un Límite de Cloruros.[31] En el caso de la FDA, en los productos aprobados debieron asegurar una cantidad de Carbono Orgánico Total.[33]

De manera general, los productos derivados de bacteriófagos requieren pasar por las pruebas diseñadas para productos biológicos, específicamente para vacunas tanto en la Farmacopea Mexicana como la Estadounidense.

Tabla 2. Instituciones de investigación dedicadas a estudiar bacteriófagos y su uso

Institución o Centro de Investigación	Ciudad	Campo
Biochimpharm	Tbilisi (Georgia)	Humano
Biophage Inc.	Montreal (Canada)	Veterinario/humano
Biopharm Pharmaceuticals	Tbilisi (Georgia)	Humano
Exponential Biotherapies	Washington (USA)	-----NM---
Gangagen	Ontario (Canada)	Humano
Hexal Genentech	Holzkirchen (Alemania)	----NM----
Immunopreparat Research Productive Association	Ufa Bashkortostan (Rusia)	----NM---
Intralytix	Baltimore(USA)	Humano, Veterinario, Alimentario, Ambiental
Micropeace	Hawthorn (Australia)	Humano, Ambietal
New Horizons Diagnostics Corporation	Columbia (USA)	Alimentos, Humanos
Novolytics Limited	Coventry (UK)	Ambiental, Veterinaria, Humana
Phage Biotech, Ltd.	Rehovot (Israel)	Humano
Special Phage Services Pty Ltd	Brookvale (Australia)	Humano, Ambiental Animal
Targanta Therapeutics Inc.	St. Laurent (Canada)	---NM---

NM: No proporciona información acerca de la línea en la que usan la fagoterapia

Productos comerciales: a pesar que existen en la actualidad diversos centros de investigación en fagoterapia en el continente americano, éstos no tienen en realidad gran cantidad de productos en el mercado, sin embargo si puede hablarse de que ya hay fagos avalados por la FDA para su uso en la industria alimentaria como es el caso de **LISTEX P100™,** comercializado por EBI, Food Safety, y de **PLSV-1™.** Además de **INT-401™,** comercializado por Intralytix el cual es para uso veterinario.[24,28]

En cuanto a Europa del Este, Sulakvelidze ha reportado la comercialización de formas farmacéuticas a base de bacteriófagos tales como, soluciones oftálmicas, óticas, tabletas, supositorios, spray.[10]

En la tabla 3, se observa una serie de productos que se comercializan actualmente con al menos un bacteriófago en su formulación. Cabe destacar que EA-230 y WPP-201, aún están en estudios clínicos antes de ser liberados a la venta.[24]

Tabla 3. Productos con Fagos que han sido comercializados en los últimos años, en distintos países no Europeos

Compañía	Nombre Comercial	Agente
Intraltytix (Estados Unidos)	LMP-102 Ecoshield SPLX-1, PLSV-1 INT-401	*Listeria Escherichia Salmonella Clostridium*
Biophage Pharma Inc, (Cánada)	DT 40.2	*Salmonella* typhimurium (cerdos)
Exponential Biotherapies (Estados Unidos)	EA-230 Listex	LPS como antiinflamatorio *Listeria* (FDA)

Ventajas y Desventajas de los bacteriófagos: a pesar de que los bacteriófagos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, existen argumentos que han retrasado su uso comercial. Dentro de las cuales destacan los expuestos en la tabla 4.

Enzibióticos o endolisinas: los fagos han diseñado básicamente dos vías para liberar la progenie viral de su huésped bacteriano, los bacteriófagos filamentosos son liberados por extrusión sin matarlas, (por ejemplo: M13, fd y f1)[34], mientras que los no filamentosos inducen la lisis del huésped, dado que estos fagos contienen enzimas líticas altamente evolucionadas que inducen la lisis de la pared celular del huésped, las cuales han sido llamadas enzibióticos o endolisinas. La lisis de las bacterias es el resultado de un daño abrupto en la pared celular que se puede dar por una de dos vías[35]:

i) La inhibición de la síntesis de peptidoglicano (PG) originado por una sola proteína, (bacteriófagos de RNA o DNA de cadena sencilla).[34]
ii) La unión enzimática de las lisinas al peptidoglicano de la pared celular, llamado sistema de explosión por lisina. (Fagos de doble cadena de DNA).[34]

Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso de la fagoterapia

Ventajas	Desventajas
Pueden lisar a células resistentes a antibióticos	Su espectro de acción es muy limitado (son especie-específicos)
Son específicos. Es decir no dañan la biota normal del paciente.	Dificultad para desarrollar formas farmacéuticas sólidas.
No generan reacción con los anticuerpos neutralizantes	Dificultad de entrega de fagos
El tratamiento puede ser preventivo	Pueden producir altos niveles de endotoxinas en infecciones causadas por bacterias Gram-negativos.
En muchos casos sólo se requirió de una dosis única de lisado fágico para observar la disminución de la infección en el paciente	Son eliminados rápidamente por el sistema inmune
	Dificultad para registrar propiedad intelectual

Las endolisinas, son codificadas por el genoma fágico durante la ultima fase del ciclo lítico para degradar el péptidoglicano, el principal componente de la pared celular, y facilitar la liberación de los viriones, las lisinas pueden distinguirse de otras enzimas líticas codificadas por las bacterias.[12,34] En algunos casos las lisinas son componentes integrales de los viriones fágicos, que digieren la pared celular para facilitar la inyección del genoma fágico a la célula huésped, un ejemplo de lo anterior es el bacteriófago T4.[34]

Es justamente esta capacidad de digerir la pared celular, por la que se ha considerado a las endolisinas como una nueva clase de agentes antibacterianos, ya que también son especificas y pueden lisar a patógenos sin dañar la microflora, por lo que en los últimos años se ha tratado de caracterizar y purificar endolisinas recombinantes para el tratamiento de enfermedades infecciosas, contra diferentes patógenos como, *Pseudomonas aeruginosa,* incluso se ha demostrado la capacidad de algunas lisinas de penetrar y lisar biofilms de bacterias tan resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aereus.*[34,36,37]

Las endolisinas se producen en forma de un solo polipéptido que contiene al menos dos dominios funcionales, un dominio catalítico el cual se une a peptidoglicano y un modulo de unión a la pared celular (CWBM, por sus siglas en ingles) que puede unirse de manera especie especifica a carbohidratos epítopos en la pared celular, sin embargo recientemente se ha mostrado que la lisina PlyC del fago C1 de estreptococos es una enzima multimérica compuesta de 8 módulos de unión a la pared celular por cada subunidad catalítica[37,38,39]

Clasificación de las endolisinas: como ya se mencionó, el principal componente de la pared celular es el peptidoglicano (también conocido como mureína), éste se compone de un polímero de amino-azúcares, N-acetilglucosamina y N-acetil ácidomuramico, unidos por enlaces glucosidicos, β-1,4 y una cadena de tetrapéptidos, unido al grupo lactil del ácido muramíco por enlaces peptidicos, los tetrapeptidos adyacentes pueden unirse por un enlace interpeptidíco en las bacterias Gram-negativas, o por un puente interpeptido, en las bacterias Gram-positivas. En las bacterias Gram-positivas, la pared mide de 15-80 nm de grosor y consiste de muchas capas de peptidoglicano asociadas con ácidos teicoicos, mientras que en las bacterias Gram-negativas es relativamente delgada midiendo 10nm y se compone de una sola capa de peptidoglicano alrededor de la membrana de la bacteria.[34]

Dependiendo de la especificidad de la enzima, las endolisinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su capacidad catalítica como N-acetilmuramidasas (lisozima), endo-β-N-acetilglucosaminidasas, y transglicosilasas líticas, las cuales se unen al azúcar del peptidoglicano, endopeptidasas, las cuales se unen a los péptidos y N-acetilmuramoil-L alanina amidasas, la cual corta en el enlace entre el azúcar y el péptido.[34]

Las endolisinas normalmente poseen solo un tipo de actividad hidrolítica; sin embargo se han encontrado hasta el momento cuatro enzimas que poseen dos unidades catalíticas independientes en el fago B30 de *Streptococcus agalactiae*, (con actividad muramidasa y endopeptidasa), en el fago ϕ11 de *Staphylococcus aerus* (endopeptidasa y amidasa), además del fago de *S. agalactiae* NCTC 11261 (endopeptidasa y amidasa) y finalmente el fago *Staphylococcus warneri M* (con actividad de endopeptidasa y amidasa), por último la lisina T7 la cual tiene actividad de amidasa y juega un papel importante en la regulación transcripcional mediante la unión a RNA polimerasa.[12,34]

Se ha demostrado además que las proteínas una vez purificadas no sólo conservan su actividad catalítica intacta, si no que algunas amplían el espectro de microorganismos que son capaces de lisar. Se ha observado por ejemplo que algunas enzimas pueden incluso lisar a esporas germinativas de bacterias como las de *B. anthracis* y es justamente por esta razón por las que les denominaron enzibióticos, pues son enzimas con actividad antibacterial. Cabe destacar que el interés por esta nueva alternativa contra bacterias patógenas se ha extendido a su investigación en áreas como: la eliminación bacteriana de mucosas membranales, el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, biocontrol bacteriano en alimentos y la protección de plantas contra bacterias fitopatógenas; demostrando su seguridad en diferentes estudios.[12,34]

Dadas estas características de las endolisinas fágicas, algunos investigadores se han dado a la tarea de usarlas a éstas y no al fago completo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas, de hecho hay estudios *in vitro* e *in vivo* que usan diferentes preparaciones de enzibióticos ya sea solos o con la adición de un antibiótico clásico los cuales se han empleado en cultivos celulares, y administrado en ratones por vía intranasal, intraperitoneal o intravenosa, donde se ha observado el decaimiento del titulo bacteriano desde 4 o 5 unidades logarítmicas, hasta la eliminación total de las bacterias en los animales de prueba.[12]

Métodos actuales para cuantificación de fagos: en la actualidad el método para cuantificar bacteriófagos por excelencia es la titulación, sin embargo, existen distintos métodos alternativos para tratar de conocer títulos virales, las cuales pueden dividirse en técnicas que determinan partículas virales infectivas y las que determinan partículas virales totales, dentro de las que determinan partículas infectivas están[40]:

-Punto final de dilución: consiste en realizar una serie de diluciones que permiten determinar el titulo viral infectivo/mL de solución. Lo que se mide en este ensayo es la dilución a la cual los virus pueden infectar al 50% de las células en cultivo.

-Dilución en placa: esta técnica es la más usada en cuanto a fagos se refiere, también se le conoce como, vaciado en placa, consiste en inocular una monocapa de bacterias y ponerlas en contacto con el virus. Esta técnica es muy sensible ya que teóricamente un placa lítica es iniciada por una sola partícula viral infecciosa, por lo que al contar el número de placas se puede saber el número de partículas fágicas infectivas. Los títulos, entonces se cuantifican como sigue:

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{Número\ de\ placas \times Factor\ de\ dilución}{Volumen\ de\ la\ alícuota}$$

- Citometría de flujo: la citometría de flujo es un método que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Este método puede procesar millares de células en algunos segundos con la ventaja de detectar cambios en cada una de ellas. Esta técnica es muy conveniente porque es posible detectar el cambio en la morfología de las células una vez que han sido infectadas.[32]

Por otra parte las técnicas que detectan partículas virales totales, son:

- ELISA: esta técnica de inmunoensayo, usa anticuerpos monoclonales dirigidos a una parte de la cápside del virus, al reconocer el anticuerpo la cápside, el cual puede estar marcado con un cromóforo que puede emitir una señal cuantificable que permita determinar la presencia de cápsides en la muestra a analizar.[40]

- Microscopía electrónica: es una técnica que permite el conteo directo, sin embargo para poder llevar a cabo esta técnica se necesitan ciertos requerimientos, como una concentración alta de partículas fágicas, disponibilidad de un microscopio electrónico y de un analista calificado.[40]

- Cromatografía de líquidos usando una columna de intercambio aniónico: esta es una técnica novedosa que genera resultados con alto grado de exactitud, sin embargo igual que la técnica anterior, requiere de la disponibilidad de un cromatógrafo, un analista calificado, altos títulos fágicos y tiene un costo elevado.[40]
Sin embargo y a pesar que cada técnica presenta ciertas ventajas en cuanto a la rapidez con la que se pueden cuantificar las partículas virales, llevarlas a cabo representa alto costo y presentan en general baja especificidad.

Conclusiones

A pesar de que los bacteriófagos fueron descritos desde 1896, fue hasta 1917 que d´Herelle les dio nombre y empezó a utilizarla como terapia en enfermedades infecciosas, desde entonces la fagoterapia ha demostrado ser una alternativa viable en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias resistentes a antibióticos.

En el campo de la biología molecular, los bacteriófagos se han empleado como herramientas para determinar: la naturaleza de los genes, los tipos de mutaciones genéticas, la transferencia de genes entre células mediada por virus, las enzimas de restricción, la descripción del RNAm, el mecanismo de acción de los factores de transcripción, la recombinación sitio específica, la descripción de la DNA-ligasa, la existencia de los fragmentos de Okazaki, el mecanismo de replicación "el círculo rodante", el papel de los cebadores, la antiterminación como mecanismo de regulación transcripcional, la entrega de material genético en forma de vectores y la producción de proteínas recombinantes entre otras.

En los últimos años, la resistencia a antibióticos, en la década de los 60´s propició, que los investigadores regresaran la vista a la fagoterapia, de manera que se han usado fagos para combatir a bacterias tanto Gram-positivas (*Streptococcus pneumonie* entre otras*)*, como Gram-negativas *(Pseudomonas aeruginosa,* etc.*)* mostrando eficacia en el tratamiento de varias enfermedades. Es por esta razón por la que se han desarrollado centros de investigación a nivel mundial al grado que en el este de Europa ya se cuenta con formas farmacéuticas a base de fagos y en Estados Unidos existen dos compañías que ya venden fagos en preparaciones (lisados fágicos con aditivos) que están ya aprobados por la FDA para su comercialización. Las compañías Intralytix y Exponential Biotherapies, venden productos a base de fagos para fagoterapia contra infecciones en humanos y para evitar la contaminación de quesos en la industria alimentaria; sin embargo, ni en Estados Unidos, ni en América Latina, existen formas farmacéuticas sólidas que puedan ser administradas por vía oral, por lo que esta puede ser un área de oportunidad para desarrollar nuevas investigaciones en el área fagoterapéutica.[18]

Pero la investigación de la fagoterapia no termina allí, desde hace algunos años, se investiga la posibilidad de usar a las endolisinas causantes de la lisis bacteriana (enzibióticos) no a los fagos completos como una alternativa de tratamiento.

A pesar de que ya haya productos en el mercado, la normatividad no es específica ya que no existe un apartado para los bacteriófagos en México ni en Estados Unidos, sin embargo las normas para productos biológicos y vacunas virales, en ambos casos, dan las pautas que se deben cumplir para lograr que éstos sean seguros, eficaces, puros y confiables.

En el caso de los métodos actuales de cuantificación de bacteriófagos, la única que mide la cantidad de virus infectivos presentes en una muestra es la técnica microbiológica de vaciado en placa. Esto quizá pueda ser un nicho de oportunidad para la investigación científica, puesto que con el auge en la fagoterapia, resulta imperante tener métodos de cuantificación rápidos y confiables.[19]

Referencias

1. Vispo N., Puchades, Y., 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 18:135-147.
2. Mathur M., Vidhani S., Mehndiratta, P., 2003. Bacteriophage Therapy: An alternative to convencional antibiotics. *Journal API*, 51:593-596. Clark J., March, J., 2006. *Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. Trends in Biotechnology,* 24 (5):212-218.
3. Clark J., March, J., 2006. Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends in Biotechnology*, 24 (5):212-218.
4. Sergei, N., Konstantin, S., 2008. The elusive object of Desire: Interactions of bacteriophages and their host. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2):86-93.
5. Mann, H., 2005. The third age of phage. *Plas Biology*, 3(5):182.
6. Weber-Dabroska, B., Mulczyk, M., Gòrski A., 2000. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute´s experiance. *Archivum Inmunologiae Therapy Experimentals,* 48(6):547-551.
7. http://www.biophagepharma.net/index.php?option=com_content&task=view&id=27&Itemi=53. Consultado el 2 de Mayo del 2009.

8. Renato Dulbecco, 1996. Multiplicación y genética de bacteriófagos En: B., Davis, D Dulbecco. R., Eisen N., H., Ginsberg, S., H. (eds.), *Tratado de Microbiología*. 4ª ed., Ed. Masson, Barcelona, pp. 760-780.
9. García, E., López., R., 2002. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterápia,* 15(4):306-312.
10. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, G., 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(3):649-659.
11. Lozano, S., 2006, Félix D´Herelle: Aportes a biografía de un pasteurizado en México (1904-1911): *Revista Electrónica Latinoamericana de Estudios Sociales, Históricos y Culturales de la Ciencia y la Tecnología*, 1(1) 1-15.
12. Hermoso, J., García, J., García, P., 2007. Taking aim on bacterial pathogens: form phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*. 10:461-467.
13. López, G., 2005. Bacteriófagos: de la biología molecular a su uso terapéutico. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, VIII(13):61-102.
14. Wilson, R., Kameyama, L., Zhou, J., Guarneros, G., Donald, L., 1997. Translational repression by transcripcional elongation factor. *Genes & Developmet*, 11:2204-2213.
15. Clark, J., March, J., 2004. Bacterial virases as human vaccines? *Expert Review of Vaccines*, 3:463-476.
16. Yacoby, I., Shamis, M., Bar, H., Shabat, D., Benhar, I., 2006, Targetting antibacterial agents by using drug-carrying filamentos bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemiotherapy*, 6(50): 2087-2097.
17. Coates, A., Hu, Y., 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152:1147-1154.
18. Ronda, C., Vázquez, M., López, R., 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuacultura. *Revista AquaTIC*, 18:3-10.
19. Gill, J., Carson, M., Leslie, K., Griffiths, M., Sabour, P., 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lacting diary cattle. *Antimicrobial Agents and Chemiotherapy,* 9(50), 2912-2918.
20. Mitchel, S., Rouf, M., 1983. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hidrophila* bacteriophages. *Applied and Enviromental Microbiology*, 5(45):1670-1676.
21. Wattanabe, R., Matsimoto, T., Sano, G., Ishii, G., Kazuhiro, T., Summiyama, J., Sakurai, S., Matzuzaki, S., Imai, S., Yamaguchi, K., 2006. Efficacy of bacteriophages therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseusomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemiotherapy,* 2(51): 446-452.
22. http://foodprocessing-technology.com/contractors/quality_control/ebi/. Consultada el 10 de marzo del 2009.
23. http://phageinternational.com/phagetherapy/companies.html. Consultada el 10 de marzo del 2009.
24. http://www.biophagepharma.net/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=42. Consultado el 10 de marzo del 2009.
25. http://www.gangagen.com/disclaimerframe.htm. Consultado el 10 de marzo del 2009.
26. http://www.hexal.de. Consultado el 10 de marzo del 2009.
27. http://www.novolytics.com.uk/tecnology.html. Consultado el 10 de marzo del 2009.
28. http://intralytix.com/Intral_Human.htm. Consultado el 10 de marzo del 2009.
29. http://www.phage-biotech.com/links.html. Consultado el 10 de marzo del 2009.
30. http://www.academic.evergreen.edu/projects/phage. Consultado el 10 de marzo del 2009.
31. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1996, Séptima Edición.
32. United States Pharmacopea, 2007, 30th Edition. Monograph 1041 (versión electrónica).
33. Food and Drug Administration, HHS, (2009). Code of Federal Regulations Title 21 §172.785.
34. Borysowski, J., Weber-Daroska, B., Górski, A., 2005. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine*, 231 (4): 366-377.
35. Thomas, G., Wang, I., Struck K. Young, R. 2002. Braking free: "Protein antibiotics and phage lysis. *Research in Microbiology*, 153 (2002) :493-501.
36. Sun, W., Tan, Y., Jia, M., Hu., X., Rao, X., Hu, F., 2010. Funtional characterization of endolysin gene encoged by *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PaP1. *African Journal of Microbiology Research*, 4(10):933-939.
37. Sass, P., Bierbaum, G., 2007. Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ12 and ϕ12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aereus. Applied and Enviromental Microbiology*, 73(1): 347-352.
38. Nelson, D., Schuch, R., Chahales, P., Zhu, S., Fischetti, V. 2006. Ply C: A multimeric bacteriophages lysine. *Proc. Natl. Acad. Science*, 103:10765-10770.
39. Nascimento, J., Guerreiro, M., Fernándes, S., Sáo-José, C., Almeida, S., 2008. Nissin-Triggered activity of Lys44, the secreted endolysin from *Oenococcus oeni* phage fOg44, *Journal of Bacteriology.* 190(1) 457-461.
40. Vergara, B. I. 2008, Validación Parcial de un Método Analítico para Cuantificar Partículas Adenovirales totales por HPLC, tesis de Licenciatura Facultad de Farmacia UAEM, 10-30.
41. Whitney, S., Cartmell, E., Avery, L., Stephenson, T., 2005, Bacteriophages potential for application in wasterwater process. *Science of the Total Environment*., 339:1-18.