

Introducción

A nuestro alrededor existe un “micromundo” que no podemos apreciar a simple vista, en el que pueden encontrarse distintos tipos de microorganismos. La diversidad del mundo microbiano en los diferentes ambientes que nos rodean (suelo, aire, alimentos, nuestro cuerpo) incluye microorganismos beneficiosos y otros causantes de enfermedades (virus, bacterias patógenas, hongos, protozoos). Las bacterias beneficiosas son las responsables de la fermentación de algunos alimentos y también las que habitan en nuestro tracto gastrointestinal, en nuestro sistema respiratorio o en nuestra piel, entre otras. Por su parte, las bacterias patógenas tienen especial relevancia debido a su capacidad de producir infecciones en humanos y animales, algunas de las cuales pueden llegar a provocar la muerte.

Recientemente, el tratamiento de estas infecciones se ha convertido en un serio problema debido a la ineficacia de la mayor parte de los antibióticos utilizados en clínica y veterinaria. Cabe señalar, no obstante, que la resistencia a antibióticos es un fenómeno natural que tiene lugar cuando

la presencia de un antibiótico en determinados ambientes elimina las bacterias sensibles, pero favorece la selección de bacterias resistentes al mismo. La resistencia puede deberse a una mutación en el material genético del microorganismo y transmitirse a las bacterias descendientes (transferencia vertical), o proceder de la incorporación de material genético foráneo de bacterias de la misma u otra especie (transferencia horizontal). Sin embargo, dicha resistencia se ha visto incrementada por el uso incorrecto de los antibióticos, así como por su inclusión durante un largo tiempo en los piensos de los animales de granja para facilitar su engorde.

Hemos llegado así a un escenario en el que el porcentaje de bacterias resistentes es tan elevado que el tratamiento con antibióticos no permite en muchos casos la eliminación de la infección. El problema es de tal magnitud que informes recientes confirman la muerte anual de 33.000 personas en la Unión Europea y 700.000 en el mundo como consecuencia de infecciones bacterianas que en el pasado podían evitarse con tratamiento antibiótico.

Poco después del descubrimiento del primer antibiótico (penicilina) por Alexander Fleming en 1928, se inició una búsqueda exhaustiva de compuestos naturales con actividad antibiótica que fueran capaces de matar todo tipo de bacterias patógenas causantes de infecciones, que tuvo su edad de oro a mediados del siglo XX cuando se descubrieron varias familias de antibióticos. Posteriormente, el descubrimiento de antibióticos se ralentizó enormemente, comercializándose solamente un antibiótico natural nuevo en el siglo XXI, aunque además se han diseñado antibióticos sintéticos, análogos a los descubiertos previamente.

La facilidad de las bacterias para transmitir genes de resistencia a antibióticos ha dado lugar a la acumulación de multirresistencias en numerosas cepas de distintas especies bacterianas. Ante esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido unas directrices para restringir el uso de estos compuestos, y ha elaborado una lista de bacterias patógenas frente a las cuales es más urgente la búsqueda de nuevos antimicrobianos efectivos. Dicha lista incluye tres grados de prioridad:

- Prioridad 1 (crítica), dentro de la que se encuentran *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos.
- Prioridad 2 (elevada), que incluye *Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina; *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina y con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina; *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina; *Campylobacter* spp. y *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas, y *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a fluoroquinolonas y cefalosporinas.
- Prioridad 3 (media), que abarca *Haemophilus influenzae*, resistente a ampicilina y *Shigella* spp., resistentes a fluoroquinolonas.

En este contexto de multirresistencia a antibióticos, una de las posibles alternativas a los mismos en la que se está llevando a cabo una intensa investigación científica son los bacteriófagos (fagos), los cuales son virus que infectan bacterias, siendo totalmente inocuos para humanos, plantas, animales y el medioambiente. Su morfología,

junto con su particular forma de multiplicación, diversidad y abundancia, los convierten en microorganismos interesantes por sus aplicaciones biotecnológicas y por el papel que juegan en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas naturales.

Los fagos fueron descubiertos a principios del siglo XX por los científicos Frederick Twort y Félix d'Herelle, y utilizados entonces con éxito en el tratamiento de infecciones en humanos. Tras esta época inicial, su uso y estudio quedó restringido a los países de Europa del Este debido al descubrimiento y posterior edad dorada de los antibióticos.

Los virus bacterianos poseen una estructura relativamente sencilla, formada por proteínas y ácidos nucleicos, pero muestran morfologías muy variadas y ciclos de vida de complejidad diferente. La mayor parte están constituidos por una cabeza que contiene el ácido nucleico (ADN o ARN) y una cola tubular y placa basal, la cual está implicada en el contacto del fago con la bacteria en el momento de la infección. Han sido aislados en todo tipo de hábitats, incluidos los ambientes extremos (alta temperatura, alta salinidad, fondos oceánicos). Todas estas características, además de los datos de las secuencias genéticas, han permitido realizar una clasificación cada vez más precisa de estos virus.

Los bacteriófagos, como cualquier otro tipo de virus, son parásitos intracelulares que necesitan infectar una bacteria para multiplicarse en su interior. En general, pueden llevar a cabo dos ciclos de vida diferentes (lítico y lisogénico). Tras realizar un ciclo de vida lítico, los nuevos fagos son liberados al exterior mediante la lisis (rotura) de la bacteria, provocando así su muerte. Son los agentes moduladores de

las poblaciones microbianas y, por lo tanto, los encargados de mantener el equilibrio de los ecosistemas naturales.

Debido a su particular forma de multiplicación y al hecho de provocar la muerte de la bacteria, los fagos pueden ser utilizados como agentes antimicrobianos. Poseen además varias ventajas con respecto a los antibióticos, como alta especificidad, actividad frente a bacterias resistentes a antibióticos y autorreplicación. Además, los fagos pueden ser utilizados como antimicrobianos en cualquier ecosistema en que se encuentre su bacteria hospedadora. De esta forma, podrían convertirse en sustitutos o complemento de los antibióticos actualmente en uso, pudiendo ser utilizados también como biocidas o desinfectantes.

Por otra parte, cabe señalar que los bacteriófagos sintetizan ciertas proteínas, las cuales, por sí mismas, tienen la capacidad de matar a las bacterias (por eso se las ha denominado *enzibióticos*) y, por lo tanto, pueden ser utilizadas con este fin tras su purificación en el laboratorio.

En el sector hospitalario, los bacteriófagos pueden ser utilizados tanto para prevenir como para tratar infecciones en humanos (terapia fágica). Su aplicación es habitual en Rusia y en las antiguas repúblicas soviéticas (por ejemplo, Georgia), y también en Polonia. En Occidente, sin embargo, el tratamiento de infecciones con fagos queda restringido a pacientes individuales, y solo como uso compasivo, es decir, cuando no existen otras posibilidades para salvar la vida del paciente o simplemente para aliviar su sufrimiento. A pesar de la falta de una regulación clara, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos en diferentes países con resultados prometedores.

El sector ganadero también está afectado por infecciones producidas por bacterias patógenas resistentes a los

antibióticos, lo que ocasiona graves pérdidas económicas. Por lo tanto, el uso terapéutico de los bacteriófagos también podría contribuir a reducir este problema y, al mismo tiempo, a minimizar el vertido de antibióticos al ambiente. La mayor parte de los ensayos realizados en el sector se han centrado en combatir enfermedades intestinales y sistémicas en pollos y cerdos.

La agricultura es otro sector en el cual los fagos pueden utilizarse para la prevención o tratamiento de enfermedades bacterianas en vegetales de interés agronómico. Su utilización como sustitutos de ciertos productos fitosanitarios que se aplican habitualmente a las cosechas evitaría la dispersión de compuestos nocivos en el medioambiente. También pueden utilizarse para el biocontrol de bacterias alterantes o patógenas en la materia prima durante su almacenamiento postcosecha. En este sentido, existen en el mercado numerosos productos basados en fagos, y considerados biopesticidas, cuya aplicación está permitida, por ejemplo, en Estados Unidos, siendo distintas empresas americanas pioneras en la producción de los mismos.

La seguridad alimentaria también puede verse beneficiada por la potencial utilización de bacteriófagos en cada etapa de elaboración del producto dentro del concepto “de la granja a la mesa”. De esta manera, tanto bacteriófagos como enzibióticos podrían ser utilizados como bioconservantes de alimentos, pero también como desinfectantes de las instalaciones industriales, o incluso en el desarrollo de sistemas de identificación de contaminación bacteriana en los alimentos. Además de los estudios realizados en el laboratorio con diferentes matrices alimentarias contaminadas

deliberadamente con distintos patógenos, en las que se han utilizado fagos para combatir la contaminación con notable éxito, existen en el mercado algunos productos destinados a combatir *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* o *Salmonella enterica*, que han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos). En el caso de Europa, a estos productos se les considera coadyuvantes tecnológicos que no pueden ser detectados en el producto final, siendo pues su uso muy restrictivo.

La intensa investigación científica que se está llevando a cabo, favorecida por las técnicas ómicas disponibles, ha facilitado enormemente el aislamiento, identificación y clasificación de los bacteriófagos. Todos estos datos son imprescindibles para conocer sus características, lo que condicionará el uso racional de los mismos. Por ejemplo, hoy en día es posible el aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras ambientales con relativa facilidad, lo que permite llevar a cabo estrategias dirigidas a detectar aquellos bacteriófagos que sean capaces de eliminar una bacteria determinada. El análisis del material genético de estos fagos permite además la selección de aquellos que sean más interesantes desde el punto de vista de su eficacia y seguridad. En este contexto, es necesario determinar las condiciones óptimas y las dosis necesarias para eliminar la bacteria patógena en una determinada aplicación. Además, la utilización de mezclas de fagos parece ser la estrategia más eficaz para evitar la posible aparición de bacterias resistentes a los bacteriófagos. Dichas mezclas serán potencialmente capaces de infectar a todas las bacterias de interés y, además, evitarán la supervivencia de los posibles resistentes.

Como último paso en la caracterización de los bacteriófagos es fundamental garantizar que sean completamente inocuos y, además, que muestren su eficacia, no solo en el laboratorio, sino también en la situación en la que se vayan a aplicar posteriormente. Con este propósito, es necesario emplear distintas técnicas de laboratorio, además de ensayos en animales de experimentación, y finalmente, en el caso de que la preparación fágica vaya a ser destinada al tratamiento de infecciones bacterianas en humanos, es preciso llevar a cabo ensayos clínicos controlados.

La gran variedad de aplicaciones comerciales de los bacteriófagos ha hecho que cada vez más empresas biotecnológicas estén interesadas en la fabricación de productos basados en fagos. Por ello, se están estudiando actualmente diferentes sistemas para producir y purificar los bacteriófagos a gran escala, hacer formulaciones más estables y con las propiedades adecuadas para ser aplicadas en el entorno en que se desea eliminar a la bacteria patógena. Con objeto de producir fagos a gran escala es necesario el uso de biorreactores, en los que se inocula también la bacteria hospedadora del fago. En la actualidad se están diseñando métodos adecuados de producción y purificación para facilitar y abaratar el proceso de comercialización de los mismos.

Una vez producido el fago en grandes cantidades, es preciso definir la formulación más adecuada (geles, cremas, aerosoles, pastillas...) que permita mantener la vida útil durante un largo periodo, además de favorecer la aplicación del producto fágico. Cada una de estas presentaciones conlleva un estudio previo para determinar que

los compuestos requeridos en estas formulaciones sean compatibles con la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos.

También es necesario mencionar que la novedad que supone el uso de bacteriófagos como antimicrobianos tiene como contrapartida el hecho de que en muchos países la legislación vigente todavía no contempla su aplicación, lo que ralentiza su utilización. Por ello, dependiendo del tipo de aplicación y del país, los requerimientos actuales para su uso son diferentes. Se hace patente, pues, la necesidad de adaptación de las leyes ante la situación de urgente necesidad de nuevos tratamientos frente a infecciones bacterianas. Es necesario tener en cuenta que la aprobación de un producto para ser utilizado en terapia humana es un proceso largo y costoso, en el que es preciso superar varias fases de investigación preclínica y clínica. Además, los resultados han de ser evaluados por las agencias correspondientes, que asesorarán a las autoridades para su aprobación.

La comercialización de productos fágicos se enfrenta a numerosos retos como, por ejemplo, la necesidad de que los tratamientos sean personalizados para cada paciente, o la falta de ensayos clínicos ya realizados. Además, existen numerosas trabas legales a la administración de productos fágicos. De hecho, en Europa solamente se contempla la aplicación de fagos con fines terapéuticos, y solo como tratamiento compasivo, en algunos países como Bélgica o Francia, mientras que en el resto de países de la Unión Europea no hay regulación al respecto. En el polo opuesto se encuentran países como Georgia y Polonia, donde la terapia fágica está perfectamente regulada.

Finalmente, queremos resaltar la clara necesidad de nuevas alternativas a los antimicrobianos actuales, lo que nos hace pensar que los bacteriófagos pueden tener un papel relevante en un futuro cercano, pero para ello es imprescindible el apoyo a esta línea de investigación.