

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE FARMACIA**

**USO DE ENZIMAS LITICAS CODIFICADAS POR FAGOS  
(ENZIBIÓTICOS) COMO UN NUEVO ENFOQUE  
TERAPÉUTICO PARA LA LUCHA CONTRA  
INFECCIONES BACTERIANAS**

**MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**NATALIA DIAZ QUIRÓS**

**TUTOR: DENNIS JIMENEZ VARGAS**

**SEDE, ARANJUEZ**

**MARZO, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer a Dios por guiar mi camino y fortalecer mi espíritu, llevándome a cumplir mis metas.

Dedico mi tesis con todo mi amor y cariño a mis amados padres Idali Quirós Sandoval y Gerardo Diaz Garbanzo, por el sacrificio y esfuerzo, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles, siempre han estado ahí brindándome su comprensión, cariño y amor.

A mi hijo, Matías, por la paciencia y comprensión que me ha tendido en todo este tiempo, de estudio, pero además por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

A mi tutor Dennis Jiménez por los aportes, la guía, confianza brindada y su tiempo de entrega para que esta tesis tuviera buenos resultados.

A todos mis hermanos y familia parte importante de mi vida, que estuvieron siempre presentes a mi lado brindando su apoyo incondicional, y además compartieron alegrías, tristezas y muchas palabras de aliento durante este proyecto.

Agradezco a la familia Padilla Quesada por el apoyo brindado durante estos años de esfuerzo, a Marlene Quesada por cuidar, de mi hijo cuando tuve que estudiar e ir a clases durante toda la carrera, por todo el amor que le da y por ser como una segunda madre para mí.

**GRACIAS TOTALES**

## **Pensamiento**

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:

La voluntad"

**Albert Einstein**

## CONTENIDO

<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
Planteamiento del problema.....	15
Objetivos.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos.....	18
Justificación.....	18
Antecedentes.....	21
Internacionales.....	22
Nacionales.....	25
Proyecciones.....	26
<b>CAPÍTULO II: MARCO DE REFERENCIA.....</b>	<b>27</b>
Bacterias.....	27
Microbioma humano.....	28
Infecciones Bacterianas.....	30
Antibióticos.....	32
Historia.....	32
Definición.....	34
Clasificación de los Antibióticos y Mecanismo de Acción.....	35
Efecto antimicrobiano.....	36
Tinción de Gram.....	37
Mecanismo de acción.....	37
Resistencia Bacteriana a Antibióticos.....	40
Mecanismos de resistencia de las bacterias en los principales grupos de antibióticos	44
Betalactámicos.....	44

	11
Quinolonas.....	45
Tetraciclinas.....	
45 Amino.....	
45	
Glucósidos.....	45
Macrólidos y Lincosamidas.....	46
Causas de resistencia.....	
46	
Bacteriófagos.....	48
Definición.....	
48	
Historia de la Bacterofagoterapia.....	
49	
Biología de los fagos.....	51
Enzimas líticas.....	54
Enzibióticos.....	55
Ventajas.....	57
Desventajas.....	58
<b>CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>59</b>
Enfoque.....	59
Diseño.....	60
Fuente de información.....	60
Criterios de exclusión e inclusión.....	60
Cuadro de Categorías.....	61
Procedimiento de recolección y análisis de datos.....	62
Fases.....	
62	
Cronograma.....	
64	
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
66	
Incidencia Epidemiológica de Infecciones Bacterianas y Resistencia Bacteriana.....	66
Mecanismos de Resistencia bacteriana a antibióticos.....	80

Factores que influyen en el progreso de resistencia bacteriana en la población.....	80
Factores relacionados al paciente.....	82
Factores relacionados al microorganismo.....	82
Factores relacionados al fármaco.....	84
Endolisinas codificadas por Bacteriófagos (Enzibióticos).....	85
Desarrollo actual de los Enzibióticos.....	106
Comparación entre Bacterofagoterapia y antibióticos.....	108
Propuesta para el desarrollo de un enzibiótico quimera.....	119
Proteínas ingenierizadas.....	119
Estructura terciara de la lactoferrina.....	121
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>126</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>129</b>

### Contenido de tablas

Tabla 1. Historia de Antibióticos -----	34
Tabla 2. Bacterias que presentan resistencia innata a los antibióticos. -----	44
Tabla 3. Mecanismos de resistencia de las bacterias a antibióticos. -----	46
Tabla 4. Tabla de Categorías -----	64
Tabla 5. Frecuencia de Localización de sepsis en UCI y UCIM. -----	74
Tabla 6. Resistencia antibacteriana total expresada en porcentaje de bacterias Gram positivas, en los servicios a pacientes críticos del hospital “Doctor Salvador Allende, en Cuba. -----	75
Tabla 7. Resistencia antibacteriana total expresada en porcentaje de bacterias Gram negativas. -----	76
Tabla 8. Emergencia Surgimiento de la Resistencia bacteriana a antibioticos en Estados Unidos en el año 2001. -----	86
Tabla 9. Pruebas in vitro e in vivo del neumococo frente a Murein- Hidrolasas solas y combinadas. -----	109
Tabla 10. Comparación del uso profiláctico y/o terapéutico de fagos y antibióticos. -----	113

### Contenido Ilustraciones

Ilustración 1. Microfotografía electrónica de un virus.....	49
Ilustración 2. Comparación entre ciclo lítico y ciclo lisogénico. ....	53
Ilustración 3. Distribución mensual de los aislamientos de <i>Salmonella spp</i> de origen humano, confirmados en el CNRB, según año, enero 2008 - diciembre 2010 en Costa Rica. ....	68
Ilustración 4. Distribución mensual de los aislamientos no invasivos de <i>H. influenzae</i> no invasivos, confirmados en el CNRB, según año, enero 2008- diciembre 2010 en Costa Rica. ....	70
Ilustración 5. Resistencia a los Antibióticos en <i>H. influenzae</i> no invasivos. CNRB, 2010. ....	71
Ilustración 6. Diferencia en Estructura de Gram Negativa y Gram Positiva .....	76
Ilustración 7. Factores que influyen en la resistencia bacteriana. ....	81
Ilustración 8. Ciclo de vida de un bacteriófago. ....	86
Ilustración 9. Modo acción de una endolisina fagica. ....	88
Ilustración 10. <i>S. aureus</i> en ausencia y presencia de endolisina. ....	90

Ilustración 11. Curva de crecimiento de la cepa de <i>Enterococcus faecium</i> EN 470 en presencia y en ausencia del bacteriófago $\Phi$ BE2. -----	91
Ilustración 12. El tratamiento con Lisina Cpl-1, elimina la colonización y previene el desarrollo de otitis media. -----	94
Ilustración 13. Estructura tridimensional del enzibiótico Cpl-1. -----	96
Ilustración 14. Reconocimiento de la pared celular bacteriana por Cpl-1.-----	97
Ilustración 15. Estructuras Cristalinas de enzimas Líticas. -----	99
Ilustración 16. Efecto bactericida de Cpl-1 y Cpl-7. -----	101
Ilustración 17. Modificación del enzibiótico Cpl-7 para aumentar su eficacia. -----	102
Ilustración 18. Comparación de los Enzibióticos, Cpl-1 y Cpl-7 y Cpl-7S. -----	103
Ilustración 19. Diferentes proteínas quiméricas construidas a partir de Cpl-1 y Cpl-7S -----	104
Ilustración 20. Estructura nativa del dominio lítico CHAPK de la endolisina LysK del bacteriófago K de <i>Staphylococcus aureus</i> -----	111
Ilustración 21. Dominio Lítico CHAPK de la endolisina LySK -----	112
Ilustración 22. Estructura de dominio LysF1 sh3b en PDB -----	113
Ilustración 23. Estructura de dominio LysF1 sh3b en Chimera -----	114
Ilustración 24. Estructura del dominio LysF1 SH3b.....-----	115
Ilustración 25. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de Peptidoglicano hidrolasa ALE-1 -----	116
Ilustración 26. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de Peptidoglicano hidrolasa ALE-1 -----	117

Ilustración 27. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de peptidoglicano hidrolasa ALE-1 en azul N-terminal y en rojo C-terminal. -----	118
Ilustración 28. Estructura Terciaria de la lactoferrina. -----	122

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se presenta una primera sección introductoria.

### **Planteamiento del problema**

Las bacterias son organismos que se encuentran en todas partes, en nuestro cuerpo y hasta en los objetos de uso diario; hemos aprendido a utilizar bacterias beneficiosas para nuestra salud, como las que producen insulina humana por ingeniería genética, o las que forman nuestra flora intestinal. No obstante, algunas bacterias pueden ser altamente perjudiciales, causándonos problemas de salud, desde un simple dolor de garganta, hasta la muerte. A pesar de que nuestro sistema inmunológico

reconoce estos organismos como agentes extraños y los combate, las bacterias son capaces de burlar al sistema inmune y provocar infecciones.

El científico británico Alexander Fleming, descubrió la penicilina como un antibiótico en el año 1928, a partir de un hongo del género *Penicillium*. Sin embargo, desde aquellas épocas se preveía que eventualmente las bacterias iban a desarrollar resistencia ante cualquier antibiótico debido a la adaptación (como parte del proceso evolutivo) y la capacidad de las bacterias de sobrevivir en ambientes adversos. Solo unos cuantos años después de la comercialización de la penicilina, ya algunas cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus* se habían convertido en patógenos resistentes a este antibiótico, causando frecuentes infecciones hospitalarias (González, 2014).

Así, a lo largo de los años las bacterias han podido evadir el efecto de algunos antibióticos, dificultando las posibilidades para combatirlos con los medicamentos actualmente disponibles. Por esto, la industria farmacéutica ha desarrollado antibióticos con diferentes mecanismos de acción, entre los que se puede mencionar el bloqueo de la síntesis de proteínas en las bacterias, y la destrucción de la pared celular de estos organismos. Empero, una vez que se empiezan a usar en la terapéutica, rápidamente se seleccionan cepas resistentes al antibiótico (Center for Adaptation Genetics and Drug Resistance, Tufts University School of Medicine, 1998).

La bacteria puede adquirir esta resistencia por mutaciones en sus genes, proceso natural y aleatorio que puede resultar en un microorganismo más resistente a un antibiótico que su antecesor. Estas mutaciones pueden provocar un cambio en los

mecanismos celulares afectados por el antibiótico, de manera que se vuelven insensibles a los tratamientos. Además, aquellas bacterias que presentan la resistencia pueden transmitirla a otras, inclusive de especies diferentes (Center for Adaptation Genetics and Drug Resistance, Tufts University School of Medicine, 1998).

Para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias, los plásmidos, fragmentos extra cromosómicos de ADN, pueden funcionar como vectores para este flujo de información genética. Los plásmidos pueden ser transmitidos entre bacterias de la misma o diferente cepa, así como a otras especies, e incluso a otros géneros. Así, cada nueva progenie llega a ser resistente y se convierte en un potencial donador de rasgos de resistencia a innumerables bacterias de un medio. (Bochicchio, Lievano, Oechler, Soberon, 2009).

La aparición de estas súperbacterias ha resultado del uso, a veces desmedido e inadecuado, de los antibióticos, ya sea por malas dosificaciones, periodos de tratamiento inconclusos y automedicación; además en muchos de los casos por mal manejo de información. Pero, no podemos imaginar un mundo sin antibióticos para tratar infecciones, y, debido a que muchos han dejado de ser efectivos, necesitamos herramientas novedosas para combatir estas patologías.

Un posible acercamiento para resolver este problema se basa en el uso de enzimas antibióticas codificadas por fagos, conocidas como *Enzibióticos*, moléculas que resultan prometedoras, y por ende, investigarlas permitirá descubrir su capacidad

antibiótica y su acción como estrategia segura para incentivar luego la producción de nuevos Fármacos.

A razón de lo anterior, surge una incógnita por analizar ¿pueden ser vistas las enzimas líticas codificadas por fagos como un nuevo enfoque terapéutico contra las infecciones bacterianas?

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Examinar el uso potencial de las enzimas antibióticas codificadas por fagos como nueva herramienta para la lucha contra infecciones bacterianas.

### **Objetivos Específicos**

Describir la resistencia a antibióticos, presente en las bacterias que causan infecciones en los humanos.

Explicar la acción de enzimas líticas codificadas por fagos sobre las bacterias para afectar su supervivencia.

Analizar los dominios proteicos funcionales de las enzimas antibióticas para el desarrollo de posibles proteínas fusión que maximicen la actividad antibiótica.

## **Justificación**

El cuerpo humano posee una capacidad natural de luchar contra la invasión microbiana, por medio de mecanismos naturales de defensa. La primera línea de defensa está constituida por la denominada inmunidad innata o inespecífica, que incluye la piel, la conjuntiva de los ojos y las membranas mucosas que protegen a los epitelios respiratorios, digestivos y genitourinarios. Debido a esta capacidad natural del cuerpo humano de luchar contra la invasión microbiana, en el siglo pasado se descubrieron sustancias naturales, sintéticas y semisintéticas antimicrobianas, *i.e.* antibióticos, que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de los microbios, y que han sido utilizados

en la práctica clínica. (Boucher, Talbot, Bradley, Edwards, Gilbert, Rice, Scheld, Spellberg y Bartlett, 2009).

De esta manera los antibióticos se convirtieron en el principal recurso de la medicina para tratar las infecciones bacterianas *in vivo*. No obstante, transcurridos pocos años de su uso, se describió que en ocasiones ocurría el fracaso terapéutico debido al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias; los propios antibióticos actúan como selectivos para la aparición de cepas bacterianas resistentes a los mismos (Boucher *et al.*, 2009).

Las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos se han convertido en un problema de salud mundial. Estudios llevados a cabo en Estados Unidos, muestran que las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a los antibióticos causan más muertes al año que el VIH. En México, más del 70% de las infecciones producidas por cepas perniciosas de la bacteria *Escherichia coli*, corresponden a cepas resistentes a penicilina, ampicilina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol (Adam, 2008).

Las bacterias existen desde hace muchos años atrás y el hombre ha utilizado los antibióticos por un periodo de no más de 100 años, seleccionando bacterias de una u otra forma cada vez más resistentes sin poder mantener un ritmo adecuado de fabricación de antibióticos nuevos y eficaces para contrarrestarlas. (Boucher *et al.*, 2009).

Según Peña (2016), a pesar de que los laboratorios farmacéuticos han descubierto una gran cantidad de antibióticos, menos del 1 % ha llegado a las farmacias,

y, por lo tanto, es conveniente continuar con la investigación de nuevos antibióticos. En 1998 había en el mercado mundial 20 nuevos antibióticos, principalmente producidos por hongos filamentosos y actinomicetos. Sin embargo, el desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos por las agencias oficiales de Estados Unidos y Europa se ha limitado en los últimos años; dado el alto costo de los desarrollos, compañías conocidas, como Abbot, Merck y Roche, han abandonado la investigación.

Una de las alternativas para solventar esta problemática mundial se presenta en las enzimas antibióticas, o Enzibióticos, las cuales permiten eliminar de forma eficaz los patógenos. Estas enzimas poseen la ventaja de ser de alta especificidad, permitiendo destruir un solo tipo de bacteria, a diferencia de los antibióticos comunes que destruyen incluso bacterias beneficiosas para el organismo. Además, utilizan mecanismos de acción distintos, permitiendo generar nuevos y eficaces antibióticos. (Muro, 2008).

Según Diez (2016): “Los Enzibióticos, llamados también enzimas líticas, eliminan de forma rápida y específica los patógenos”. Estas enzimas son codificadas por fagos, virus que infectan y matan únicamente a las bacterias, y una vez dentro de la bacteria, producen una lisis de la pared celular bacteriana, llevándola a su muerte. Debido a la capacidad de los bacteriófagos de lisar a sus bacterias hospedadoras, su amplia distribución y especificidad, han sido propuestas como una herramienta para controlar los patógenos causantes de una variedad de infecciones bacterianas.

Ayala (2017) menciona la existencia de otras enzimas con capacidad antibiótica, dentro de las que destacan las lactonasas, que inhiben la comunicación celular; las lisozimas, que degradan ciertas moléculas presentes en la pared celular de

las bacterias; las lactoperoxidasas, que generan moléculas pequeñas muy reactivas que pueden desactivar a las células bacterianas; las lactoferrinas, que pueden secuestrar elementos esenciales para la supervivencia de las bacterias como el hierro, entre muchas otras. Cabe destacar que la lisozima es producida por los animales, y además está presente en secreciones como lágrimas, leche humana y moco. La lactoperoxidasa y la lactoferrina las podemos encontrar también en la leche de humanos y vacas.

Actualmente, a diferencia de los agentes químicos, no se encuentran compuestos de carácter biológico que sean reconocidos, capaces de eliminar de forma rápida y eficaz las bacterias. (Diez, 2016). Debido al preocupante surgimiento de bacterias multirresistentes (súperbacterias), se hace necesaria la búsqueda e investigación de nuevas alternativas a los antibióticos, para superar los obstáculos de resistencia actuales. La terapia con enzimas líticas puede hacer frente en la lucha contra las súperbacterias, controlando de esta forma la proliferación de enfermedades infecciosas bacterianas.

## **Antecedentes**

Los antecedentes que a continuación se presentan hacen referencia a una recopilación de información obtenida por diferentes medios, en su mayoría bases de datos con artículos e investigaciones científicas, así como trabajos realizados por diferentes autores vinculados con la temática del uso de enzimas líticas codificadas por fagos (Enzibióticos) como nuevo enfoque terapéutico para la lucha contra infecciones bacterianas.

En el 2010, Segundo y colaboradores, en su revisión bibliográfica, hacen referencia al francocanadiense Felix d'Herelle, quien en el año de 1917 acuñó el nombre de bacteriófago, también llamado fago, haciendo oficial su descubrimiento. Además, experimentó por primera vez con la actividad antibacteriana de estos compuestos en animales, aislando fagos a partir de heces de pollos, tratando una plaga de disentería de pollo, y luego, en París, en el año 1919, experimentó con humanos, en este último caso, un niño de 12 años con disentería severa; tras una sola administración del fago, los síntomas cesaron. De igual manera, tres pacientes adultos se recuperaron de la misma enfermedad en sólo 24 horas después de haber ingerido la preparación de un coctel de fagos. Así mismo, en 1921 Richard Bruynoghe y Joseph Maisin, usaron un tratamiento a base de bacteriófagos para tratar infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus*.

## **Internacionales**

Un artículo realizado por Veiga (2007), plantea que es necesario buscar constantemente nuevas herramientas terapéuticas en la lucha continua contra los microorganismos causantes de enfermedades; además, menciona que el término enzibiótico es una palabra híbrida, resultante de “enzima” y “antibiótico” con referencia a los fagos: es decir, virus que atacan y lisan bacterias; como conclusión se menciona el enorme potencial e importancia de los Enzibióticos en la lucha contra enfermedades causadas por bacterias.

En el Laboratorio de Patogénesis Bacteriana de la Universidad Rockefeller en Nueva York, se realiza una Investigación Bibliográfica; Fischetti (2010) afirma que “son enzimas muy evolucionadas producidas por bacteriófagos para digerir la pared celular bacteriana para la liberación de la progenie del fago. En las bacterias Gram-positivas, pequeñas cantidades de lisina recombinante purificada añadida externamente producen una lisis inmediata que causa la muerte en bloque de la bacteria objetivo”. Las lisinas se han utilizado con éxito en una variedad de modelos animales para controlar las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, que se encuentran en las superficies de la mucosa y los tejidos infectados. Su especificidad para el patógeno sin perturbar la flora normal, la baja probabilidad de resistencia bacteriana y su capacidad para matar a los patógenos colonizadores en las superficies de las mucosas, una capacidad que antes no estaba disponible, las convierte en anti infecciosas ideales en una época de creciente resistencia.

Ruiz, (2015) presenta en su tesis doctoral, un estudio en el que se documentan todos los pacientes con resistencia al *Staphylococcus* de la meticilina, mediante pruebas clínicas en los cuatro periodos de la investigación, dando como resultado la presencia endémica de 3 clones mayoritarios de *Staphylococcus* en 1999-2004 (ST125-IVc, ST228I y ST22-IVh); además, por primera vez, se describe un plásmido de multiresistencia conjugativo, portador de los genes *cfr*, *ant(4')-Ia*, *tet(L)* y *dfrK* en *S. aureus* y *S. epidermidis* que determinan la resistencia a la linezolidina y a otros antibióticos.

“Uno de los últimos reservorios sin explotar en la naturaleza para la identificación de nuevos antimicrobianos son los bacteriófagos, los asesinos naturales de las bacterias. Capaces de degradar la capa de Peptidoglucano en diferentes etapas de su ciclo de infección. Las endolisinas degradan la pared celular bacteriana al final del ciclo de infección, causando la lisis del huésped para liberar la progenie viral” (Gerstmans, Rodríguez, Lavigne, & Briers, 2016).

Los autores anteriormente referenciados muestran información relevante de las endolisinas recombinantes, las cuales se han aplicado con éxito en diferentes campos como antibacterianos; adicionalmente, menciona con gran importancia el desarrollo de novedosos antimicrobianos denominados Artilysin, los cuales puede atravesar la membrana externa de los Gram negativos y llegar hasta el peptidoglucano, donde ejercen su acción, por lo que se concluye que estos antimicrobianos son candidatos ideales para una alternativa a los antibióticos.

En el 2016, Martínez, en su artículo, menciona el preocupante y creciente desarrollo a las resistencias bacterianas, y lo que se ha hecho para buscar alternativas terapéuticas en patologías por microorganismos bacterianos, la naturaleza, junto con la combinación de propiedades ventajosas de estas proteínas, como son la especificidad de sustrato, modularidad y robustez enzimática hacen previsible que, en un futuro próximo, se pueda pensar en diseñar enzimas a la carta frente a diferentes patógenos.

Regland, hace referencia al mecanismo que lleva la bacteria a la muerte, ocurriendo por la hidrólisis del peptidoglicano mediante la lisozima; se menciona además que las lisozimas de tipo convencional tipo c, también son altamente catiónicas y pueden matar ciertas bacterias independientemente de la actividad hidrolítica de Peptidoglicano, como reflejo de la carrera de armamentos en curso entre el huésped y los microorganismos invasores. (Regland, 2017).

## **Nacionales**

A nivel nacional, en un trabajo de graduación, realizado en la Universidad de Costa Rica por Salas,(2015) se hace referencia a la investigación de la extensa diseminación de bacterias multiresistentes alrededor del mundo y el declive en el desarrollo de nuevas estrategias para controlar infecciones bacterianas; se menciona además las alternativas disponibles, entre las que se mencionan, bacterias predadoras, bacteriocinas, materiales nano estructurados avanzados, terapia fágica y los péptidos antimicrobianos.

Según la búsqueda de antecedentes nacionales para la investigación, lo cual corresponde a las diferentes universidades y trabajos realizados en Costa Rica respecto al tema de Enzibióticos, se demuestra que nadie ha trabajado en recopilar información sobre Enzibióticos como una nueva alternativa para tratamientos antimicrobianos; no se halla la suficiente información para abarcar todos los antecedentes nacionales, ya que el

abordaje e importancia de la bacterofagoterapia, quedó estancado con la aparición de los antibióticos, por lo que está en proceso de investigaciones, estudios y publicaciones.

### **Proyecciones**

Generar un aporte investigativo al campo de la farmacia a nivel industrial, hospitalario e incluso comunitario. Además, brindar información relevante de importancia para el desarrollo de nuevos productos que puedan eliminar bacterias de forma eficaz.

## **CAPÍTULO II: MARCO DE REFERENCIA**

El siguiente capítulo fundamenta el Marco de referencia en el cual se encontrarán conceptos básicos y complementarios, lo cual proporcionara al lector una idea más clara del tema.

## **Bacterias**

Ibarra y Adid (2014) mencionan lo siguiente sobre las bacterias:

Las bacterias son células de tamaño variable cuya longitud es en micras, por lo tanto, son los seres vivos más pequeños del planeta. Estas tienen una estructura menos compleja que se diferencia mucho de los virus, que necesitan estar dentro de otra célula para su desarrollo.

La pared celular es parte fundamental en la bacteria, ésta se sitúa alrededor de la membrana celular proporcionando rigidez, flexibilidad, soporte y protegiendo la bacteria de una posible ruptura. Funciona como un medio de intercambio de solutos entre el exterior e interior celular. (Diez, 2016).

El conocimiento de la composición bioquímica de las diferentes estructuras bacterianas, junto al conocimiento del metabolismo bacteriano, permite hoy la comprensión del mecanismo de acción de los diferentes antibióticos. Estos avances en genética bacteriana permiten un mejor desarrollo a nivel de biología celular con mejores diagnósticos e investigaciones científicas. (Pérez y Mota, 2000)

Es importante tomar en cuenta que las bacterias han protagonizado un rol muy importante en nuestras vidas, más en el área de salud y en la industria farmacéutica, estando constantemente en investigación, aunque la mayoría de estos genes son patógenos, en nuestros organismos se encuentran bacterias que no son dañinas, denominadas flora bacteria normal.

## **Microbioma humano**

Hay una cantidad de microorganismos que colonizan y forman comunidades en el cuerpo humano, se encuentran en diferentes partes del cuerpo, como boca, piel, ojos, tracto urinario, vagina, intestino, y reciben el nombre de Microbioma. Estos microorganismos se benefician del cuerpo humano, pues obtienen oxígeno y nutrientes, pero también prestan apoyo, como por ejemplo ayudan a la digestión, producen vitaminas y protegen contra la colonización de otros microorganismos patógenos. El microbioma no es igual en todas las personas, varía en cada uno y la colonización se hace durante toda la vida, así la flora de un recién nacido es diferente a la de un adulto y anciano e influyen los hábitos, dieta, vida sexual, niveles hormonales, etc. (Uzcátegui, 2016)

A pesar de ser muchos estos huéspedes, no ocupan mucho espacio, pues son mucho más pequeños que nuestras células, se considera que nos habitan más de 40 mil especies de bacterias. De hecho, no hay modo en que los humanos podamos vivir saludablemente si no es en simbiosis con las bacterias benéficas, este equilibrio recibe el nombre de Eubiótica. La interacción de nuestras bacterias con el sistema inmunológico genera varios procesos de los cuales depende la correcta actividad de nuestra defensa inmune a lo largo de las mucosas intestinales. Recordemos que ahí tiene lugar el 80% de la actividad de nuestro sistema inmunológico; la alteración de esta actividad de defensa a lo largo del tubo intestinal se asocia con diversas patologías, sobre todo con algunas enfermedades autoinmunes. (Sierra, 2014).

La composición de las comunidades de microorganismos (microbiota) ha resultado ser sorprendentemente diversa y abundante. Además, los microbios no solo pueden variar de una parte a otra del cuerpo sino de una persona a otra; por ejemplo, los individuos de una misma comunidad comparten tipos similares de bacterias en su saliva, sin embargo, las bacterias de la piel son muy dispares entre dos personas que viven cerca y, en la cavidad oral, pueden ser diferentes las bacterias de un diente a otro diente, de una cara a otra y, determinadamente, la Microbiota Supragingival de la Microbiota Subgingival. El Metagenoma del microbioma humano podría contener 8 millones de genes codificantes de proteínas, es decir, 360 veces más que el genoma de los seres humanos. El reto es asignarles funciones a todos ellos, aclaran los científicos. Algunos de esos microbios han evolucionado a la vez que las personas, ayudándolas a sobrevivir y mejorando sus funciones vitales. Otros, por el contrario, están vinculados a enfermedades. (Zerón, 2014).

### **Infecciones Bacterianas**

A lo largo de su vida un individuo puede estar expuesto a muchos agentes infecciosos, la supervivencia y la patogenicidad de los microorganismos en el huésped están influenciadas por su capacidad de evadir o resistir la inmunidad protectora. (MedlinePlus, 2018). Las bacterias infecciosas se reproducen rápidamente dentro del

cuerpo y pueden provocar enfermedades. Muchas despiden sustancias químicas llamadas toxinas, que pueden dañar los tejidos y causar infecciones como amigdalitis Estreptocócica, tuberculosis e infecciones de las vías urinarias.

“Los agentes infecciosos pueden diferir mucho en sus patrones de invasión y colonización, así como en la inmunogenicidad de sus antígenos, por lo tanto, una respuesta inmune efectiva contra microorganismos distintos puede requerir la activación de distintos tipos de mecanismos efectores, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa”. (Chabalgoity, Pereira y Rial, 2008) La infección surge cuando el patógeno invade las células del cuerpo produciendo, por lo general, una infección que conducirá a una respuesta inmunológica, si ésta es rápida y eficaz, la infección quedará eliminada o contenida con tal rapidez que no se producirá la enfermedad.

Algunas veces la infección conduce a la enfermedad, el cual será un estado de infección marcado por síntomas. La enfermedad puede surgir cuando la inmunidad es baja o está dañada, cuando la virulencia del patógeno (su capacidad de dañar las células del huésped) es alta, y cuando la cantidad de patógenos en el cuerpo es muy grande (The College of physicians of Philadelphia, 2018). Dependiendo de la enfermedad infecciosa, los síntomas pueden variar considerablemente; así, la fiebre es una respuesta usual a la infección; una temperatura del cuerpo más elevada puede intensificar la respuesta inmunológica y generar un ambiente hostil para los patógenos. La inflamación ocasionada por un aumento en el fluido del área infectada es un signo de que los glóbulos blancos atacan y liberan sustancias que tienen que ver con la respuesta inmunológica (Chabalgoity, 2008).

Las infecciones pueden afectar solo una parte del cuerpo (una infección local) o todo el cuerpo (una infección sistémica). Los abscesos y las infecciones del tracto urinario son ejemplos de infecciones locales. Las infecciones sistémicas graves pueden tener efectos potencialmente mortales, como sepsis o shock séptico. (Tunkel y Alpert, 2018). Después de invadir el cuerpo, los microorganismos deben multiplicarse para causar infección, comienza una multiplicación en la que los organismos interfieren con las defensas del cuerpo, causando incluso infecciones crónicas.

Tunkel y Alpert (2018) afirman:

“La invasión de la mayoría de los microorganismos comienza cuando se adhieren a las células en el cuerpo de una persona. Esta unión es un proceso muy específico, que implica conexiones de candado y llave entre el microorganismo y las células del cuerpo. Ser capaz de adherirse a la superficie de una célula permite a los microorganismos establecer una base desde la cual puede invadir los tejidos”. Los microorganismos que al principio no tienen formas de bloquear las defensas del cuerpo a veces las desarrollan con el tiempo, por ejemplo, algunos microorganismos, después de estar expuestos repetidamente a un antibiótico determinado, se vuelven resistentes a esa droga.

Existen varias medidas para prevenir las infecciones bacterianas, como lo podrían ser algunas de nuestra rutina diaria, ejemplo de ello, el lavado de manos que resulta ser sencillo, pero es un método que previene el desarrollo de microorganismos de una persona a otra; sin embargo, uno de los más utilizados es el antibiótico, el cual incluso se administra como profilaxis antes de contraer la infección.

## Antibióticos

### Historia

Cuadro informativo de las fechas más importantes en la historia de los antibióticos, el cual menciona los principales pioneros en temas de antimicrobianos y su avance en el desarrollo e investigación.

Tabla 1. Historia de Antibióticos

1900-1915	<b>Ehrlich</b> concibe la idea de usar compuestos químicos de síntesis como "balas mágicas" selectivas hacia microorganismos, pero inofensivas para las personas o animales superiores. En 1909 descubre que el salvarsán es efectivo contra la sífilis. Acuña el término "quimioterapia".
1929	<b>Fleming</b> descubre la penicilina, el primer antibiótico natural, pero fracasa en su intento de purificarlo.
1932-1935	<b>Domagk</b> siguiendo los pasos de Ehrlich, descubre la acción del rojo de prontosilo (la primera sulfamida) sobre el neumococo y otros Estreptococos in vivo.
1940	<b>Chain y Florey</b> purifican la penicilina.  <b>Woods</b> descubre el mecanismo de acción de las sulfamidas. Estamos en plena "Edad de oro de la Quimioterapia de síntesis".
1944	<b>Waksman</b> , un microbiólogo de suelos, ha iniciado una búsqueda de microorganismos productores de antibióticos. Descubre la estreptomycin. Comienza la época dorada de los antibióticos (quimioterápicos naturales), y la búsqueda racional rinde decenas de nuevos antimicrobianos procedentes de Actinomicetos, otras bacterias y hongos.

Fuente: Basualdo, Coto y Torres. (2006).

A partir de 1929, cuando Fleming descubrió por accidente el primer antibiótico, la penicilina, al observar en una placa de cultivo que una bacteria no pudo sobrevivir en presencia de un hongo llamado *Penicillium notatum*, comenzó desde este momento el estudio de la Penicilina, y la investigación de compuestos antimicrobianos. Es en este periodo cuando inicia la llamada época de los antibióticos y desde esa fecha, se produjo un incremento de forma exponencial en la creación de nuevas clases de agentes antimicrobianos. La introducción de estos antibióticos generó una reducción significativa en la morbilidad y mortalidad debida a enfermedades infecciosas y prolongó la esperanza de vida de la población (Flores, Leal y Escamilla, 2014).

Desde la generalización del empleo de estos compuestos en la década de los años cincuenta han sido una de las estrategias más eficaces que ha proporcionado resultados a lo largo de los años en el tratamiento y prevención de enfermedades, sin embargo, el uso y abuso de estos agentes antimicrobianos, ha conducido a su vez a un aumento de la resistencia de las bacterias.

### **Definición**

Según la definición descrita por, Lorenzo *et al.* (2008) “Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos”.

En un principio, el término antibiótico solo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias u hongos que van a resultar tóxicos para las bacterias, se emplea recientemente para denominar compuestos producidos por síntesis químicas o semisintéticos. Es necesario mencionar que los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción, por lo que se pueden encontrar distintas clasificaciones. (Lorenzo *et al*; 2008)

### **Clasificación de los Antibióticos y Mecanismo de Acción**

Debido a que los antibióticos poseen muchas propiedades, la clasificación es diversa, pero se originan aspectos distintivos que han permitido agruparlos. En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la actividad del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifican por su estructura química, espectro de acción y efecto antimicrobiano, según la tinción de Gram y mecanismo de acción.

### **Estructura Química**

Según su propiedad química similar puede haber diferentes familias, algunas de ellas son B- Lactámicos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, glucopeptidos, Macrólidos. (Lorenzo *et al*; 2008).

### **Espectro de Acción**

El espectro de acción o actividad es la cantidad de clases distintas de microorganismos sobre las que puede actuar un antibiótico.

***Espectro Amplio:*** Pueden actuar sobre las bacterias, hongos o protozoos, interfieren en el crecimiento de más de uno de ellos o en distintas especies bacterianas. En estos se encuentran las tetraciclinas, cloranfenicol, y algunos Betalactámicos.

***Espectro intermedio:*** Este grupo de antibióticos actuarán frente a un número más reducido e incluso limitado de bacterias o especies, lastimosamente en este espectro se engloban la mayoría de antimicrobianos; los que destacan son macrolidos y amino glucósidos.

***Espectro reducido:*** Este espectro solo tiene un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies como son los glucopeptidos (Lorenzo et al., 2008)

### **Efecto antimicrobiano**

Según su efecto antimicrobiano, los antibióticos se dividirán en bacteriostáticos y bactericidas. A continuación, se explican detalladamente:

***Bacteriostáticos:*** Estos van a interferir en la propagación de las bacterias, pero no mueren, por lo que al retirar el antibiótico su efecto es reversible en este grupo se encuentran las tetraciclinas, sulfamidas, trimetropim, cloranfenicol, macrolidos y lincosamidas.

***Bactericidas:*** Este grupo de antibióticos a diferencia del anterior provoca la muerte de la bacteria y por consiguiente el proceso es irreversible, en este grupo se encuentran varios antibióticos entre los que se mencionan B- lactamicos, aminoglucosidos, fosfomicina, nitrofurantoina, polipéptidos, quinolonas, rifampicina y vancomicina.

Algunos agentes antimicrobianos pueden ser bacteriostáticos o bactericidas según la existencia de algunos factores como el tipo de germen, el crecimiento celular, el tiempo de contacto, potencia del antibiótico y como en el caso de las tetraciclinas las características del medio. (Lorenzo et al., 2008; Cortes, Machado y Hamilton 2010)

## **Tinción de Gram**

En cuanto a la clasificación de las bacterias de forma general, se toma en cuenta la pared celular bacteriana, es la que da la constancia de su forma y la cual permite registrar sus propiedades de tinción, si ella se expone frente a químicos colorantes, esta nos va a dar la clasificación dependiendo de su coloración, en la tinción de gram, se clasifican como:

**Gram-positivos:** Aquéllos que retienen el colorante y permanecen de color azul después de ser tratados con alcohol. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias ejemplos de ellos son: el estafilococo, estreptococos, *corynebacterium*.

**Gram-negativas:** Son las bacterias que se decoloran completamente con el alcohol y después se colorean en rojo por la safranina. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana algunos ejemplos de ellas son: las *Neisseria meningitidis* y la *Escherichia coli*. (Cortes et al., 2010).

### **Mecanismo de acción**

La clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción es de suma importancia, especialmente cuando deben utilizarse varios agentes antimicrobianos simultáneamente, por lo que podrá clasificarse de la siguiente forma:

### ***Inhibición de la síntesis de la pared celular***

Los antibióticos que se integran en este grupo son generalmente bactericidas en los que se incluyen Betalactámicos, bacitracina, cicloserina, ristocetina, y vancomicina. Se sabe que todas las bacterias menos los micoplasmas poseen una pared celular externa rodeando por completo la membrana celular citoplasmática, y además se comporta como un elemento protector, por lo que cualquier lesión o inhibición de su formación puede conducir a la lisis de la célula causando la muerte. La pared celular está compuesta por un polímero denominado peptidoglicano, cuya síntesis es un proceso bastante complejo, el cual se lleva a cabo en cuatro etapas, dependiendo de la etapa así va a interferir determinado tipo de antibiótico.

En la primera etapa, que es donde se da la formación del precursor en el citoplasma, interfieren antibióticos como la fosfomicina y la cicloserina; en la segunda etapa, que es donde se da el transporte del precursor a través de la membrana, interfiere la bacitracina; en la tercera etapa, la vancomicina y ristocetina. Los antibióticos b-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y Carbapenémicos) interfieren en las reacciones de transpeptidación que se producen en la cuarta y última fase. (Lorenzo et al., 2008; Cortes et al., 2010).

### ***Alteración de la función de la membrana celular***

La membrana plasmática es de gran importancia para que las bacterias cumplan con sus funciones; entre sus propiedades incluye el actuar como barrera de permeabilidad selectiva, controlando de esta forma la composición del medio interno

celular. Esta membrana tiene estructura diferente para las bacterias y los hongos, puede lesionarse por algunos productos. Los antibióticos que actúan en la membrana citoplasmática bacteriana son las polimixinas y antifúngicos polienicos. (Anfotericina B y Nistatina). (Lorenzo et al., 2008; Cortes et al., 2010)

### ***Inhibición de la síntesis proteica***

Forman parte de este grupo los aminoglicosidos, el cloranfenicol, tetraciclinas, macrolidos y lincosamidas, por lo general estos antibióticos tiene función bacteriostática, excepto las aminoglicosidas que son bactericidas. Se pueden dividir en dos grupos, según inhiban la transcripción o la traducción proteica:

**Inhibición de la transcripción:** consiste en la inhibición de la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa ADN dependiente, que lleva a la inhibición de la síntesis del ARN mensajero; éste transmite la información del ADN, que es necesaria para la formación proteica normal.

**Inhibición de la traducción:** se logra mediante la unión de la molécula del antibiótico a la subunidad 30S o 50S del ribosoma bacteriano. (Lorenzo et al., 2008; Cortés et al., 2010).

### ***Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos***

Los antibióticos que se encuentran en este grupo inhiben de forma selectiva a la enzima ARN polimerasa, la cual depende del ADN, este cataliza la transcripción de la información genética contenida en el ARN mensajero, por lo que se convierte en un

bactericida bastante fuerte. Dentro de los antibióticos que se encuentran en este grupo están las fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifampicín, novobiocín y los nitroimidazoles. (Cortes et al., 2010).

### **Resistencia Bacteriana a Antibióticos**

Harbarth, Theuretzbacher & Hackett. (2015) afirma:

“La resistencia bacteriana a antimicrobianos es una característica de muchos agentes patógenos causantes de diferentes enfermedades, por lo que las estrategias de contención deben adaptarse a las necesidades de los programas de control y tratamiento relacionados con enfermedades específicas. El preocupante y creciente desarrollo de las enfermedades infecciosas, juntamente con la aparición de resistencia a los antimicrobianos, ha hecho que desde hace muchos años se piense en nuevas alternativas terapéuticas”

La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos es un problema de salud pública, desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, los microorganismos han sido capaces de evadir su acción; un ejemplo que ofrece muestras evolutivas de resistencia, es la bacteria *Staphylococcus aureus*, que en 1946 presentaba la mayoría de sus cepas sensibles a la penicilina, por otro lado, en los últimos 25 años la comunidad ha adquirido microorganismos resistentes a múltiples fármacos, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp*, *Shiguella spp*, *Vibrio cholerae*,

*Streptococcus pneumoniae*, que, al aumentar, causan infecciones y dejan en claro que la resistencia a los fármacos constituye un problema de salud pública extremadamente grave. Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos. (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

### **Resistencia natural y adquirida a antibióticos**

Los antimicrobianos poseen una fuerte presión selectiva sobre las poblaciones de bacterias, favoreciendo a aquellos microorganismos que pueden ser capaces de resistir a determinada droga. Basualdo et al. (2006) mencionan en su libro dos definiciones de importancia:

Cepa insensible: es en la cual el fenotipo permite “resistir” de forma natural al determinado antibiótico. La base de esta insensibilidad suele ser alguna estructura de la bacteria que actúa como barrera (por ejemplo, la membrana externa de Gram-negativas, que dificulta el paso de muchos agentes antibacterianos).

Cepa resistente: Es una variante surgida por cambios genéticos a partir de un fenotipo originalmente sensible.

### **Resistencia natural**

Es la que está asociada a ciertas características propias de la bacteria en una misma especie o género, presentes en el cromosoma bacteriano frente a un determinado antibiótico; todos los integrantes de la misma especie son resistentes al fármaco, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, naturalmente resistente a las cefalosporinas. Son cepas insensibles. (Basualdo et al; 2006; Ramírez, 2016.)

### **Resistencia adquirida**

Esta resistencia afecta a algunas bacterias de una misma especie o cepa pero no a la totalidad; se logra en el transcurso del tiempo por dos mecanismos básicos: debido a la mutación en un gen cromosómico ya existente en el genoma, llamada resistencia cromosómica o por la adquisición de material genético extra cromosómico, transferidos de una bacteria a otra en forma horizontal mediante los mecanismos de transferencia horizontal genética, ya sea la transformación, la conjugación o la transducción, en los cuales también participan los elementos móviles, tales como los plásmidos, los transposones, las islas genómicas móviles y las secuencias de inserción (Basualdo et al; 2006; Ramírez, 2016).

Tabla 2. Bacterias que presentan resistencia innata a los antibióticos.

<b>Antibióticos</b>	<b>Cepas resistentes</b>
Penicilina	<i>Pseudomonas spp</i>
Cefalosporinas	<i>Enterococcus spp</i>

Carbapenemes	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Amino glucósidos	Bacterias anaeróbicas,
Macrolidos	Enterobacteriaceae
Tetraciclinas	<i>Pseudomonas spp.</i>
Glucopéptidos	Todas las bacterias gram negativas

Fuente: (Cabrera *et al.*; 2007)

Cabrera *et al.* (2007); Ramírez, (2016) mencionan lo siguiente sobre los mecanismos de resistencia de transferencia genética:

**Transducción:** Transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago o genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano durante su fase de ensamblaje encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano, pero se conserva el genoma viral, se habla de transducción especializada.

**Conjugación:** Transferencia de material genético, contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que le van a transferir resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes.

**Transformación:** Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe e incorpora a su genoma.

**Transposición:** Movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes unidos en equipo para expresión de un promotor en particular.

### **Mecanismos de resistencia de las bacterias en los principales grupos de antibióticos**

La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Existen diferentes tipos de resistencia según sea el tipo de antibiótico. En su tesis monográfica, Jalinas (2016), menciona mecanismos de resistencia a antibióticos:

Tabla 3. Mecanismos de resistencia de las bacterias a antibióticos.

Antibiótico	Mecanismo de resistencia de la bacteria al antibiótico
<b>Betalactámicos</b>	Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para hacerse resistentes a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas diana (PBPs), alteración de la membrana externa y producción de enzimas inhibidoras (betalactamasas). (Jalinas, 2016)

<b>Quinolonas</b>	La resistencia está relacionada con la diana principal de acción, la topoisomerasa II o girasa y fundamentalmente en la subunidad A del ribosoma. (Jalinas, 2016)
<b>Tetraciclinas</b>	Aunque existe resistencia por modificación enzimática codificada por transposones, el mecanismo de resistencia más importante en enterobacterias es por expulsión activa y en gram positivos y en Algunos gram negativo como Neisseria, Haemophilus, Campylobacter y Bacteroides, por producción de proteínas citoplásmicas que impiden la unión de la molécula al ribosoma.  En general la resistencia es cruzada para todas las tetraciclinas. (Jalinas, 2016)
<b>Amino Glucósidos</b>	La inactivación enzimática mediada por plásmidos representa el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias, Pseudomona, estafilococos y enterococos, pero existen otros mecanismos como alteraciones en la permeabilidad de la membrana y mutaciones cromosómicas. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los amino glucósidos.

<p><b>Macrólidos</b></p> <p><b>Lincosamidas</b></p>	<p>Estos grupos de antibióticos por ser hidrofóbicos atraviesan mal la membrana externa por lo que los bacilos gram negativos presentan resistencia natural, aunque modificaciones en las nuevas moléculas como azitromicina parecen disminuir este hecho. Existen además mecanismos de exclusión activa, también la producción de enzimas transferasa puede determinar resistencia de estafilococos para lincomicina y clindamicina.</p>
---	---

Fuente: Jalinas (2016). Resistencia bacteriana en cultivos de pacientes ingresados en el Hospital Humberto Alvarado de Masaya en el periodo de enero de 2014 a enero de 2015.

### **Causas de resistencia**

La Resistencia antimicrobiana es un problema de salud mundial, amenaza la capacidad de solucionar con eficacia las diferentes enfermedades o infecciones a las que se expone la población. Cires (2002) afirma que:

“Al analizar las causas que pueden contribuir a la resistencia bacteriana, la prescripción irracional o inadecuada de antimicrobianos representa una determinante apreciable atribuible a factores relacionados con el propio prescriptor, como son las limitaciones en el conocimiento sobre los principios básicos

necesarios para la prescripción de estos agentes por incertidumbre, con relación al diagnóstico del enfermo o por la tendencia del profesional que prescribe a basarse solo en su propia y limitada experiencia personal, sin tomar en consideración la evidencia científica disponible.”

Quizhpe. (2014) menciona otras causas de resistencia a antibióticos:

- Uso inapropiado de los antibióticos en medicina humana y animal.
- En prescripciones erradas para infecciones no bacterianas.
- Prescripciones mal dosificadas.
- Tratamientos incompletos por parte del paciente.
- Falta de compromiso o vigilancia por parte de los organismos encargados en salud pública.
- Escasez de medios de diagnóstico para que el profesional de la salud pueda tomar mejores decisiones a la hora de recetar un antibiótico.
- Deficiencias en investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.

La aparición de estos genes que pueden conferir resistencia a diferentes antibióticos es algo que no podemos evitar, ha formado parte del proceso evolutivo normal del organismo. Es importante comprender las causas y evitar la expresión de dichos genes como resultado del abuso y mal uso de los antibióticos, actuales y futuros. La investigación científica, pues, es un componente esencial en la guerra contra la resistencia antimicrobiana. Sin embargo, no es el único, también se requiere la sensibilización de la población y la aplicación de leyes que garanticen el uso racional de

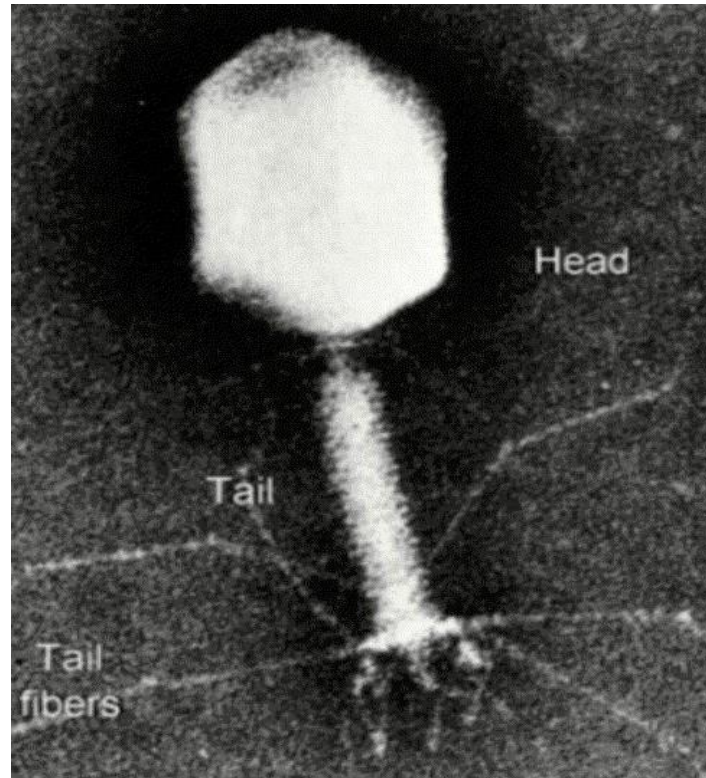
los antibióticos e incentiven el desarrollo de futuros fármacos. Sin ello, por mucho esfuerzo que hagamos, no ganaremos la batalla.

## **Bacteriófagos**

### **Definición**

“Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y lisan bacterias. De manera específica esta especie se constituye fundamentalmente de material genético y proteínas, su genoma puede componerse de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), 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” (Nilsson, 2014). 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. Estas proteínas pueden además proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, láminas basales y espículas.

Ilustración 1 Microfotografía electrónica de un virus, presenta una cabeza con simetría icosaédrica y una cola contráctil, constituida por un tubo central de simetría helicoidal, al que se unen las fibras proteicas.



Fuente: (Nilson, 2014).

### **Historia de la Bacterofagoterapia**

Durante la segunda década del siglo pasado se descubre la bacterofagoterapia, con investigaciones de su existencia por parte del científico alemán Ernest Hankin, quien observó la actividad antimicrobiana sobre el *Vibrio cholerae*; después de este

descubrimiento Nikolay Fyodorovich Gamaleya descubre el mismo fenómeno en *Bacillus subtilis*, sin embargo estos investigadores en ese momento no pudieron explicar con exactitud la naturaleza del agente causante de esta actividad antibacteriana, pero se establece la hipótesis de que esta actividad pudiera deberse a un virus y en 1917 el microbiólogo francocanadiense Felix D' Herelle demostró mediante distintos experimentos que la actividad antimicrobiana se debía a un virus que tenía la capacidad de infectar bacterias (Kropinski, 2009).

El propio D' Herelle determinó el nombre bacteriófago del griego *Phagei, n* que significaba “comer”, término con el que se conoce hasta la actualidad. El descubridor de los fagos puso a prueba la fagoterapia como agente terapéutico para tratar la disentería, observó que los síntomas de la enfermedad desaparecían después de una única administración de la suspensión de los bacteriófagos. La eficiencia de esta terapia fue confirmada un tiempo después de haber tratado a varios pacientes con disentería, los cuales mostraron mejoría y se recuperaron de la enfermedad. La primera publicación se realizó en el año de 1921 por dos científicos Bruynoghe y Joshep Maisin, quienes utilizaron suspensiones de fagos para tratar infecciones en la piel producidas por *Staphylococcus spp.* (Bueno, 2012).

El estudio de la utilización de los bacteriófagos en el tratamiento de enfermedades infecciosas quedó relegado luego del descubrimiento y amplio uso de distintos antimicrobianos. Se da el inicio de la era de los antibióticos, lo cual se trajo abajo la terapia fágica. La eficacia que tenían estos compuestos llevó al abandono de esta terapia e incluso se disminuyeron los fondos en la investigación de este tipo de

virus, sin embargo, la aparición de cepas de bacterias resistentes a un elevado número de antibióticos obliga a investigar nuevas estrategias que en el pasado fueron efectivas (McVay, Velásquez & Fralick ,2007).

No obstante, el uso terapéutico de los bacteriófagos continuó creciendo, principalmente en los países del este de Europa como Polonia, la Unión Soviética y Georgia; en estos países se publicó una gran cantidad de trabajos en sus respectivos idiomas, por lo que resultaron de difícil acceso para la comunidad científica occidental. Actualmente, se han efectuado revisiones de tales publicaciones en idioma inglés; en estos trabajos se detalla el uso de bacteriófagos en el tratamiento de distintas infecciones causadas por agentes etiológicos diversos, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp.*, *Streptococcus spp*. En ellos se describen las vías de administración de los agentes y la evolución de los pacientes, así como la farmacocinética de las suspensiones de fagos. Entre los ejemplos más destacados y recientes de la utilización exitosa de la fagoterapia cabe citar el uso de bacteriófagos específicos en el control biológico de *E. coli* O157, productora de colitis hemorrágica por causa de alimentos (Bueno et al., 2012).

### **Biología de los fagos**

Los bacteriófagos también llamados fagos son virus bacterianos, y como tales son parásitos intracelulares; son capaces de infectar a un grupo específico de células

huéspedes, determinados por interacciones de proteínas que forman la estructura viral, así como de receptores proteicos en la superficie de la bacteria (Kropinski, *et al.* 2009). El primer paso de la infección viral es la adhesión del fago a la célula por medio de las interacciones antes mencionadas, proteína del fago y proteína de pared bacteriana, luego de estos se da la inyección del material genético del fago dentro de la bacteria, este material genético puede ser ARN o ADN, de simple o doble cadena. Una vez dentro de la célula, el ciclo de replicación del fago puede continuar de dos maneras que van a tener consecuencias distintas sobre la viabilidad de la célula infectada, estas dos vías son llamadas ciclo lítico y ciclo lisogénico respectivamente. (Canchaya, Proux, Fournous, Bruttin & Brüssow. 2003)

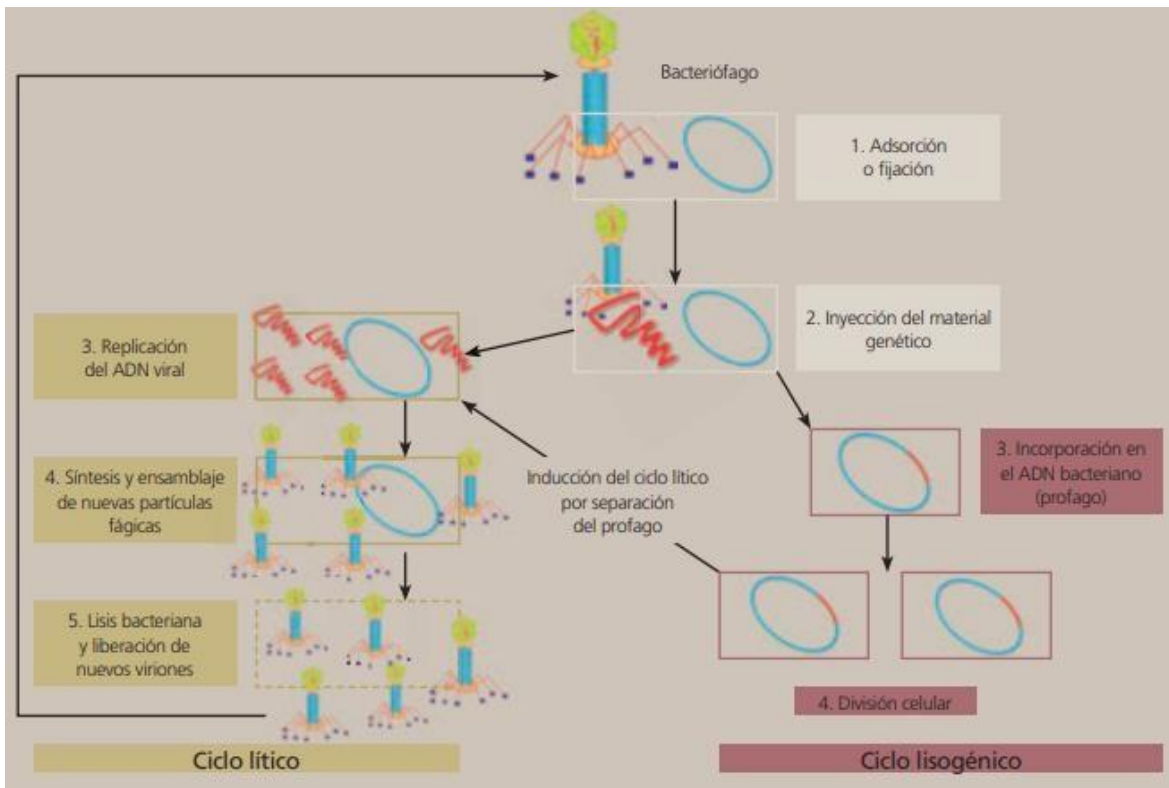
Merril, Scholl & Adhya (2003) afirman: “En el ciclo lítico el material genético del fago utiliza la expresión genética de la célula huésped para generar copias completas de sí mismo. Este ciclo termina con la lisis de la célula infectada y la liberación de las partículas de fagos al medio para comenzar nuevamente el ciclo infectando a otras bacterias.” Generalmente, el ciclo lítico comienza con la expresión de genes virales que inhibe la transcripción de los genes bacterianos y permite la expresión de los genes de bacteriófago.

Además de las enzimas implicadas en la transcripción y traducción, el fago también utiliza la materia prima de su huésped como aminoácidos, nucleótidos y energía en forma de ATP. Al transcurrir el ciclo lítico se van acumulando las proteínas estructurales de la partícula viral y también se generan nuevas copias del genoma. Todos estos procesos dan como resultado el ensamble de las partículas de fagos que

lisan la célula y se liberan al medio; en el ciclo lisogénico el material genético del fago se integra al cromosoma de la célula huésped mediante un evento de recombinación específica de sitio y a partir de ese momento se replica como parte integrante del mismo (Snyder & Champness, 2007).

Kropinski et al (2009) indican que el fago integrado recibe el nombre de profago y se mantiene en estado lisogénico, multiplicándose junto con el ADN bacteriano mientras las condiciones del medio permitan a la célula huésped replicarse eficazmente. En ocasiones, debido al efecto de agentes físicos como el calor, el frío, las radiaciones ultravioletas o agentes químicos como la mitomicina C o una carencia de nutrientes, el profago se escinde del cromosoma bacteriano. Este proceso llamado inducción permite al material genético del fago reingresar al ciclo lítico.

Ilustración 2. Comparación entre ciclo lítico y ciclo lisogénico.



Fuente: (Martínez, 2009)

## Enzimas líticas

Al final del ciclo lítico los fagos terminan liberando la nueva progenie mediante una ruptura abrupta de la pared bacteriana, algo que recuerda mucho a un estallido. La rotura es producida por la acción de las enzimas líticas. Los genes que codifican las enzimas líticas se encuentran localizadas en el genoma del fago. Estas enzimas líticas son mureínhidrolasas altamente evolucionadas, que pueden actuar por dos mecanismos diferentes, o bien inhiben la síntesis del peptidoglicano de la pared, o bien provocan una ruptura en la estructura de la pared. Las enzimas líticas o lisinas se clasifican según su función biológica, pueden ser N-acetilmuramidasa (lisozimas o muramidasa), endobeta-N-acetilglucosaminidasa (glucaminidasa), N-acetilmuramoi-

L-alanina amidasas (NAM-amidasas), endopeptidasas o transglicosidasas líticas (Ronda C, Vázquez M. y López R, 2016).

Las endolisinas son codificadas por el genoma fágico durante la última fase del ciclo lítico para degradar el peptidoglucano, el cual es 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, 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, 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, pues también son específicas y pueden lisar microorganismos patógenos sin dañar la micro flora. (Biswas et al; 2002).

Por ello, en los últimos años se ha tratado de identificar y purificar endolisinas recombinantes para eliminar enfermedades infecciosas causadas por diferentes agentes patógenos, como la *Pseudomonas Aeruginosa*, e incluso se ha demostrado la capacidad de algunas lisinas de penetrar y lisar biopelícula de bacterias tan resistentes a los antibióticos, como el *Staphylococcus aureus*. 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 peptidoglucano, y un módulo de unión a la pared celular, que puede unirse de manera específica a carbohidratos epítomos en la pared celular. (Biswas et al; 2002).

## **Enzimas líticas fágicas como antibióticos**

### **Enzibióticos**

Una interesante alternativa al uso de fagos intactos para combatir a las bacterias patógenas se centra en el empleo de algunos productos fágicos, en concreto las enzimas líticas codificadas por el genoma de los fagos (Ronda et al; 2016). Las enzimas líticas o lisozimas de los fagos se utilizan para destruir la pared bacteriana desde el interior de la célula infectada y así facilitar la liberación de la descendencia fágica al final de la secuencia del ciclo lítico.

El grupo de Vincent Fischetti de la Universidad Rockefeller ha empleado recientemente tales enzimas para prevenir y eliminar microorganismos patógenos de ratones colonizados por estreptococos grupo A y neumococos. En el caso del grupo A se usó una enzima lítica, específica para los grupos A, y para estreptococos, purificada a partir de un extracto crudo de lisado de fago. Estos autores demostraron que 10 ng (1000 U) de enzima purificada eran suficientes para esterilizar un cultivo de 10<sup>7</sup> bacterias en 5 segundos (Clokier, 2009).

Los fagos han diseñado básicamente dos vías para liberar la progenie viral de su huésped bacteriano: los bacteriófagos filamentosos, que son liberados sin matarlas, y los no filamentosos, que por el contrario, inducen la lisis de la pared celular del huésped, porque contienen enzimas líticas altamente evolucionadas; el resultado de un daño abrupto en la pared celular se puede dar por una de dos formas: la inhibición de la

síntesis del peptidoglucano originado por una sola proteína (bacteriófagos de ARN o ADN de cadena sencilla), o la unión enzimática de las lisinas al peptidoglucano de la pared celular, llamado sistema de explosión por lisina, fagos de doble cadena de ADN. (Bigwood, Hudson, Billington, Smith & Heinemann, 2008).

En este tipo de terapia la bacteria será la célula diana y el agente invasor el virus, estos presentan una unión muy específica sobre receptores ausentes en las células del cuerpo humano, los efectos secundarios son menores que en la antibioticoterapia convencional. La flora normal no se ve afectada por este tratamiento, incluso cuando se ha administrado una mezcla de hasta cuatro bacteriófagos. Este tratamiento con fagos y enzimas líticas también es posible combinarlo con bifidobacterias en el caso de pacientes leucémicos, inmunoafectados que presentan disentería, de esta manera los bacteriófagos destruyen los agentes patógenos y por otro lado las bifidobacterias restauran la flora bacteriana normal. (Hermoso J, García J & García P. 2007; Ronda et al; 2016)

Bigwood et al, (2008) afirma:

Por muchos años la especificidad de la bacterofagoterapia, respecto a 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 confluyente de bacterias), entonces está presente la bacteria que el fago es capaz de lisar y así es posible identificarla. Otra manera de utilizar a los fagos en el diagnóstico 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.

### **Ventajas**

- Pueden lisar a células resistentes a antibióticos, aunque su espectro de acción es muy limitado (son especie-específicos).
- Son específicos, es decir, no dañan la flor normal del paciente.
- No generan reacción con los anticuerpos neutralizantes.
- El tratamiento puede ser preventivo.
- Son eliminados rápidamente por el sistema inmunitario.

### **Desventajas**

- Tiene poca estabilidad, por lo que dificulta el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas.
- Pueden producir altos niveles de endotoxinas en infecciones causadas por bacterias Gram negativas.

Se han publicado un gran número de trabajos en los cuales se utilizan enzimas líticas como agentes antimicrobianos. En los mismos, se describe su alta eficacia y su potente y rápido efecto sobre cultivos bacterianos. El estudio de los fagos y de algunos de los productos por ellos codificados, como lo son los enzibióticos, se presentan como un área de investigación prometedora en los próximos años a la hora de desarrollar nuevos mecanismos de antibiosis que son necesarios a causa de la creciente resistencia de las bacterias frente a los antibióticos clásicos. (Bueno, 2012).

### **CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO**

En este capítulo se encontrarán el procedimiento y la información necesaria para desarrollar los objetivos específicos.

## **Enfoque**

La investigación realizada es de tipo Cualitativa, debido a que ha de efectuarse una recolección de datos para su análisis posterior, basándose en revisiones bibliográficas que abarcan información sobre el uso de Enzibióticos codificados por fagos como nuevo enfoque terapéutico en la lucha contra infecciones bacterianas, por lo que no se fundamenta en la estadística, pero sí se caracteriza por planteamientos más abiertos.

Según lo define Hernández, Fernández y Baptista (2014):

El investigador o investigadora plantea un problema, pero no sigue un proceso definido claramente, sus planteamientos iniciales no son tan específicos como en el enfoque cuantitativo y las preguntas de investigación no siempre se han conceptualizado ni definido por completo. En la búsqueda cualitativa, en lugar de iniciar con una teoría y luego “voltear” al mundo empírico para confirmar si ésta es apoyada por los datos y resultados, el investigador comienza examinando los hechos en sí y en el proceso desarrolla una teoría coherente para representar lo que observa.

## **Diseño**

La presente investigación cuenta con un diseño que consiste en revisiones bibliográficas, de tipo fenomenológico, basándose en artículos, libros, investigaciones o estudios que permiten conocer más acerca del tema en estudio.

## **Fuente de información**

Se realiza una serie de consultas de investigaciones internacionales y nacionales que aluden a la temática. Con respecto a los antecedentes internacionales, se indagó en bases de datos de universidades internacionales con acceso al público; en cuanto a los precedentes nacionales, se utilizan las bases de datos de universidades estatales y privadas que imparten la carrera de farmacia.

Concretamente, se consulta la base de datos de la Universidad Internacional de las Américas (UIA), Universidad de Iberoamérica (UNIBE), Universidad Latina de Costa Rica (U Latina), Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED). Además de estas instituciones académicas privadas, se realizó la consulta en la Universidad de Costa Rica (UCR) por ser la única entidad pública que imparte la carrera de farmacia.

## **Criterios de exclusión e inclusión**

En cuanto a los criterios de inclusión se van a tomar en cuenta para la investigación los artículos científicos que se encuentran entre el periodo del 2010 hasta el 2018, los cuales tendrán información sobre la Resistencia a los antibióticos, los mecanismos de acción de los antibióticos, resistencia por parte de las bacterias a estos fármacos, definición de los Enzibióticos, mecanismos de acción de los Enzibióticos, bacteriófagos y sus características. Los criterios de exclusión serán aquellos estudios realizados en los años anteriores al 2010.

## **Cuadro de Categorías**

Tabla 4. Tabla de Categorías

Concepto	Definición
Enzimas	Son el tipo de proteínas más numeroso y especializado, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. (Cremsi ,2002, p. 25)
Función antibiótica	Consiste en controlar y disminuir el número de microorganismos viables. (Según Seija , Vignoli, 2008, p 631)
Infecciones bacterianas	Infecciones causadas por bacterias infecciosas que se reproducen rápidamente dentro del cuerpo y pueden provocar enfermedades. (Medlineplus, 2017).
Resistencia antibiótica	La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos.
Bacteria	Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. (Pérez, Mota, 2008).
Mecanismo de acción	Efecto bioquímico-fisiológico que desarrolla el Fármaco en el organismo. (Montoro, 2012).
Enzibiótico	Enzima con función antibiótica.
Bacteriófago	Los bacteriófagos también llamados fagos son virus bacterianos y como tales son parásitos intracelulares. (Kropinski, 2009).

### Procedimiento de recolección y análisis de datos

En el proceso de recolección y análisis de datos, se cumplirán las siguientes fases:

## **Fases**

### **Fase 1**

Recolección de datos, se realiza una serie de consultas de investigaciones internacionales y nacionales que aluden a la temática. Con respecto a los antecedentes internacionales, se indagó en bases de datos de universidades con acceso al público, además de bases de datos de artículos de gran relevancia. En cuanto a los precedentes nacionales, se utiliza las bases de datos de universidades estatales y privadas que imparten la carrera de farmacia.

### **Fase 2**

Elaboración de la investigación a partir de la información recopilada de forma adecuada para el primer avance y el desarrollo del trabajo donde se plantea la problemática, objetivos, antecedentes y la justificación del problema.

### **Fase 3**

Redacción del marco de referencia, el cual está directamente relacionado con la investigación, desarrollando un conjunto de ideas y teorías para guiar al lector.

### **Fase 4**





científicamente la investigación, la cual hace referencia al uso de enzimas líticas codificadas por fagos como un nuevo enfoque terapéutico en la lucha contra infecciones bacterianas.

El constante desarrollo de enfermedades infecciosas, conjuntamente con la aparición de resistencia microbiana a los antibióticos, han originado que se piense en los fagos como opción terapéutica, por lo que en los resultados se aporta información bibliográfica sobre la problemática a nivel mundial presente en cepas de microorganismos resistentes a antimicrobianos, además de la utilidad de las enzimas líticas y la bacterofagoterapia (enzibióticos) para eliminar procesos infecciosos, como una esperanzadora alternativa a los tratamientos con antimicrobianos disponibles en la actualidad.

### **Incidencia Epidemiológica de Infecciones Bacterianas y Resistencia Bacteriana**

Antes del descubrimiento de los antimicrobianos y la utilización de estos, las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte en el ser humano y continúan siéndolo en gran parte de los países en desarrollo, sin acceso a medicamentos de buena calidad. Así, las infecciones por microorganismos resistentes a los fármacos relacionados con la atención a nivel de salud constituyen una importante causa de muerte en todo el mundo. (López, Gala, Tabares y Fernández. 2017). La resistencia a los antimicrobianos no es una enfermedad; no suele ser un problema de patogénesis, sino de limitación de las opciones terapéuticas. (OMS, 2018).

Las infecciones bacterianas y la resistencia representan una complicación grave y frecuente con alta morbimortalidad, además tiene una incidencia elevada en la

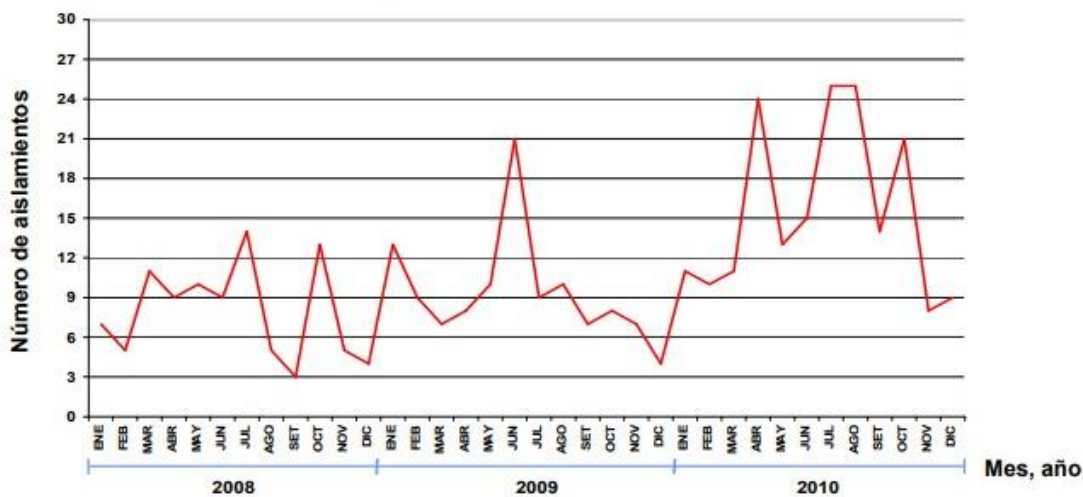
población. A continuación se muestran resultados epidemiológicos obtenidos de diferentes fuentes donde se demuestra desde sus inicios la evolución y desarrollo conforme pasan los años mostrando ser un problema de salud pública sin control.

Boucher *et al.* (2009) afirman: “Después de su descubrimiento en 1942, se empieza el uso de la penicilina como agente terapéutico, y a partir de entonces, se ha transformado en uno de los antibióticos históricamente más utilizados. No obstante, transcurridos pocos años de su uso, se describió que en ocasiones ocurría el fracaso terapéutico debido a la resistencia por parte de las bacterias, mostrando ser un problema que se remonta desde mucho tiempo atrás”.

El Centro Nacional de Referencia en Bacteriología del INCIENSA (CNRB) en Costa Rica, consolidó información sobre la resistencia a los antimicrobianos, generada por la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología, Costa Rica durante el período 2010. Se hace una breve comparación entre lo observado para el período 2010 y los períodos 2008 y 2009. Esta iniciativa también forma parte de los compromisos de la Red Latinoamericana de Vigilancia a las Resistencias Antimicrobianas (RELAVRA), coordinada por OPS / OMS, en la cual Costa Rica participa junto con 19 países latinoamericanos y donde el INCIENSA es el punto focal de país. (Tijerino *et al.*; 2011).

Ilustración 3. Distribución mensual de los aislamientos de *Salmonella spp* de origen humano,

Confirmados en el CNRB, según año, enero 2008 - diciembre 2010 en Costa Rica.



Fuente: CNRB-INCIENSA y Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología, Costa Rica.

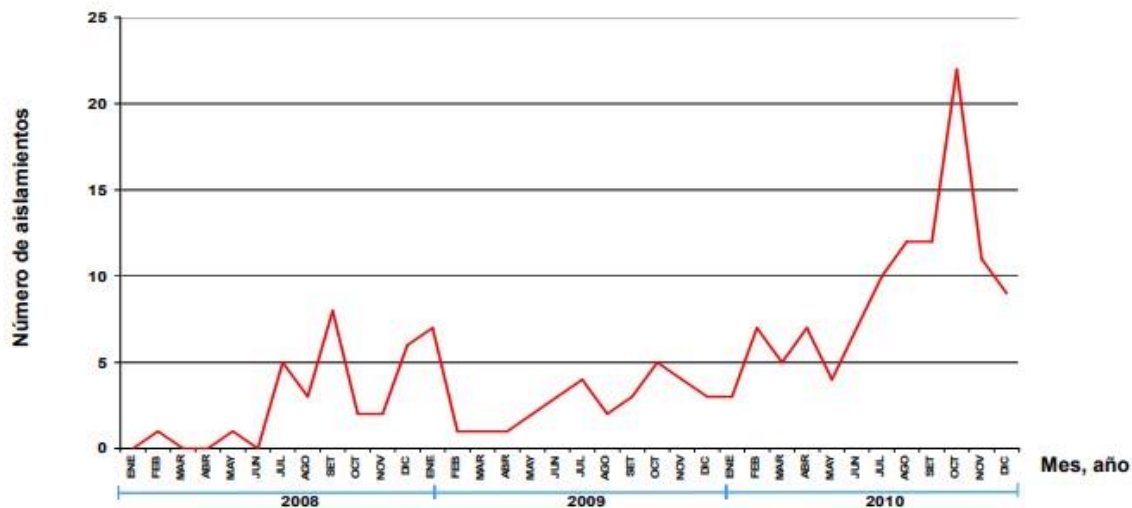
En el período comprendido entre el 1 de enero y el 31 de diciembre del 2010 se contabilizaron en el CNRB en Costa Rica, un total de 186 aislamientos de *Salmonella spp* de origen humano, referidos por establecimientos de salud de las diferentes regiones del país, en comparación con 95 y 113 recibidos en el 2008 y 2009, respectivamente.

La mayoría de los aislamientos (74%) fueron recuperados de heces, y 26% de muestras de origen extra intestinal, como: sangre, orina, abscesos, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, peritoneal o pleural. En el caso de las cepas de

*Salmonella* de origen invasivo (sangre, líquido cefalorraquídeo, pleural y peritoneal), 50% fueron referidas por laboratorios de hospitales regionales, 42% por laboratorios clínicos de hospitales nacionales y especializados, y un 8% por laboratorios de hospitales periféricos.

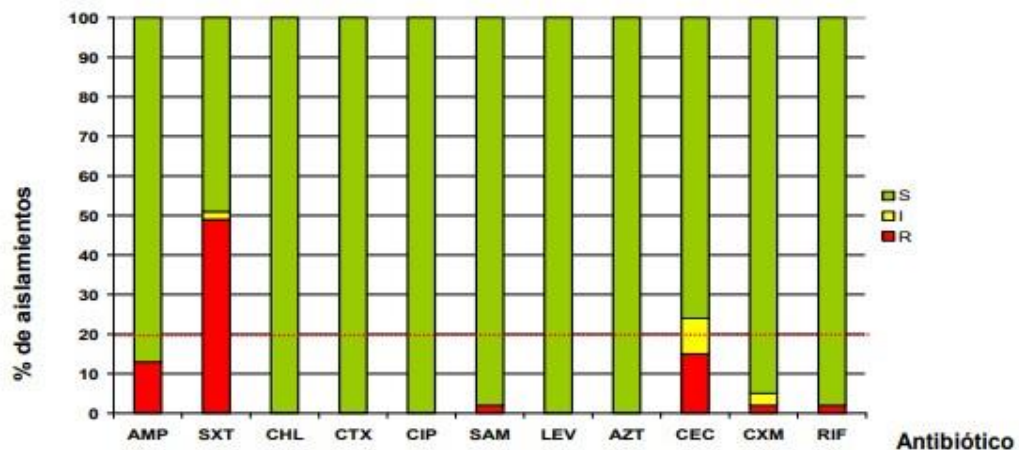
Durante el 2010 en el CNRB se contabilizaron 115 aislamientos de *H. Influenzae* referidos por laboratorios de la Red Nacional, de estos, 8 fueron catalogados como invasivos obtenidos de aislados de sangre y líquido peritoneal y los restantes 107 fueron clasificados como no invasivos, en comparación con 33 (5 invasivos) y 38 (2 invasivos) recibidos en los años 2008 y 2009 respectivamente. En relación con los 107 aislamientos no invasivos, se aislaron de muestras de diferentes orígenes como ótico, ocular, respiratorio y vaginal.

Ilustración 4. Distribución mensual de los aislamientos no invasivos de *H. influenzae*, confirmados en el CNRB, según año, enero 2008- diciembre 2010 en Costa Rica.



Fuente: CNRB-INCIENSA y Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología, Costa Rica.

Estos aislamientos de *H. influenzae* presentaron resistencia a trimetoprim sulfametoxazol (49%), ampicilina (13%), cefaclor (15%), ampicilina sulbactán (2%), cefuroxime (2%) y rifampicina (2%); además se observó sensibilidad intermedia a cefaclor (9%), cefuroxime (3%) y trimetoprim sulfametoxazole (2%); todos los aislamientos fueron sensibles a cloranfenicol, cefotaxime y Ciprofloxacina.



S: sensible, I: intermedio, R: resistente, N: número porcentual de aislamientos analizados.

Fuente: Se incluyen los resultados confirmados por el CNRB para aislamientos enviados por: H. Dr. Max Peralta, H. México, H. Monseñor Sanabria, H. Nacional de Niños, H. San Carlos, H. San Juan de Dios, H. San Rafael de Alajuela, H. San Vicente de Paúl, H. San Vito.

Se observa por medio de estos resultados que la resistencia es un problema presente y la cantidad de aislamientos, de diferentes microorganismos patógenos detectados entre enero 2008- diciembre 2010, ha ido en aumento a nivel nacional, no es posible acabar con la resistencia a los antimicrobianos, pero se debe tomar en cuenta la posibilidad de prevenir este problema realizando una mejor vigilancia, basada en las pruebas de laboratorio a nivel microbiológico para detectar problemas en la evolución de la resistencia y tomar las medidas adecuadas.

Ruíz, *et al.* (2002) reportan en su investigación encuestas epidemiológicas correspondientes a infecciones en los servicios a pacientes críticos del hospital “Doctor

Salvador Allende, en Cuba, en el año de 1997, así como datos recopilados en el archivo nacional de epidemiología y microbiología de Cuba

Tabla 5. Frecuencia de Localización de sepsis en UCI y UCIM.

Localización de sepsis	UCI*		UCIM*	
	Total	%	Total	%
Bacteriemias	86	45,7	13	41,9
Herida quirúrgica	20	10,6	8	25,8
Piel y mucosas	18	9,5	6	19,3
Respiratoria alta	1	0,5	1	3,2
Respiratoria baja	48	25,5	3	9,6
Urinaria	3	1,5	-	-
Venipuntura	9	4,7	-	-
Septicemia	3	1,5	-	-
Totales	188	99,5	31	99,8

Fuente: (Ruiz et al; 2002).

En la localización de las infecciones, se destacó que tanto en la UCI (Unidad Cuidados Intensivos), como en la UCIM (Unidad Cuidados intermedios) las infecciones de mayor frecuencia fueron las bacterianas (45,7% y 41,9 %) respectivamente.

En relación con las bacterias Gram positivas, los porcentajes de resistencia a las drogas mostraron un valor de mayor de resistencia hacia los antibióticos en Tetraciclina con un 90 y 100 % en Unidad de cuidados intensivos y Unidad de cuidados intermedios; en el hospital Salvador Allende, en Cuba, se observaron cifras elevadas frente a Ampicilina, Gentamicina y Amikacina.

Tabla 6. Resistencia antibacteriana total expresada en porcentaje de bacterias Gram positivas, en los servicios a pacientes críticos del hospital “Doctor Salvador Allende, en Cuba.

Antibiótico	Servicios	
	UCI %	UCIM %
Amikacina	70	66.6
Gentamicina	63.3	100
Ampicillín	70	---
Ceporán	50	65.5
Penicilina	43.3	---
Eritromicina	33.3	---
Estreptomina	46.6	---
Tetraciclina	90	100
Cloranfenicol	63,5	33,3

Fuente: (Ruiz et al; 2002).

Con respecto, al conjunto de bacterias Gram negativas se observó una evidente multirresistencia, pues la mayoría de los antibióticos probados mostraron valores por encima del 50%, con un porcentaje mayor en antibióticos como Gentamicina, Estreptomicina, Ampicilina.

Tabla 7. Resistencia antibacteriana total expresada en porcentaje de bacterias Gram negativas en los servicios a pacientes críticos del hospital “Doctor Salvador Allende, en Cuba.

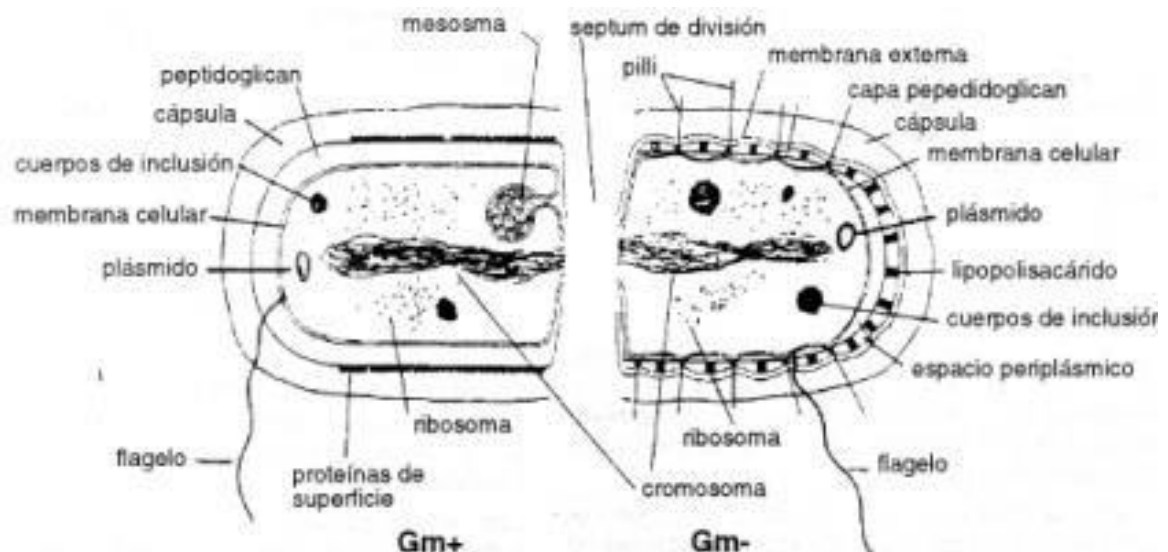
Antibióticos	Servicios	
	UCI %	UCIM%
Amikacina	62,6	80,8
Gentamicina	77,5	88,4
Ampicillín	68,4	79,7
Ceporán	59,7	76
Estreptomicina	77,2	66,6
Piopén	47,7	57,7
Tetraciclina	59,3	89,4
Cloranfenicol	68,9	74,2
Vancomicina	66,6	76,7
Colimicin	53,7	79,7

Fuente: (Ruiz et al; 2002).

Se observa en los resultados epidemiológicos anteriormente mostrados en la tabla 4 y 5, que las infecciones más frecuentes a nivel intrahospitalario son bacterianas en tracto respiratorio bajo heridas quirúrgicas, piel y mucosas; los gérmenes Gram negativos son los de mayor incidencia; entre los más frecuentes y con mayor número de cepas, se encuentran *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Alcaligenes spp.* En cuanto a los porcentajes de resistencia a los antibióticos, tanto para Gram negativas como para Gram positiva, se muestran cifras de resistencias más elevadas para los antibacterianos Amikacina, Gentamicina y ampicilina.

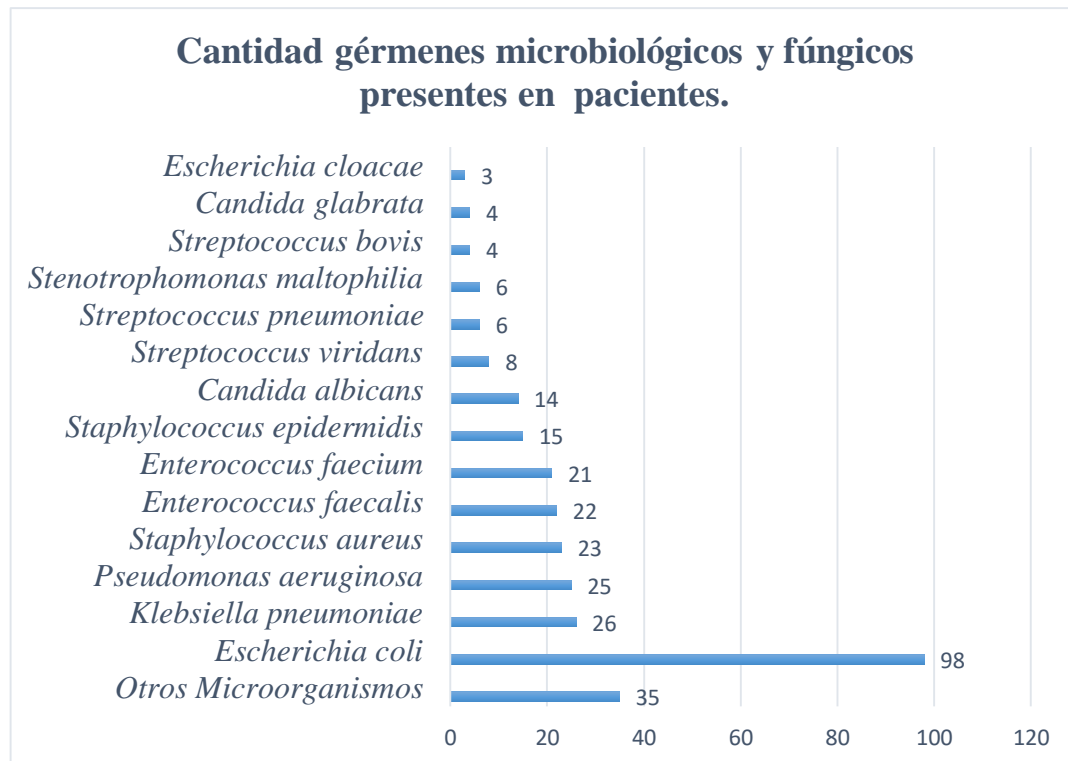
En las Gram negativas se muestra una menor actividad antibiótica, esto quizás se deba a que estas bacterias presentan en su estructura una membrana externa, lo cual no presentan las Gram positivas, por lo que ejerce una notable influencia en la resistencia frente a determinados antibióticos, sobre todo los que actúan en la pared celular. (Mora J. 2012). Son muchas las especies de bacterias Gram negativas que causan enfermedades, teniendo la membrana externa parte de la responsabilidad patogénica del organismo.

Ilustración 6. Diferencia en Estructura de Gram Negativa y Gram Positiva



Fuente: Pirez, Mota. (2000).

En el año 2016, Klímová, Padilla, Ávila, Clemente y Ochoa realizan un investigación epidemiológica de las infecciones bacterianas en un centro de atención terciaria en Madrid, España, en este estudio se evaluaron 329 pacientes con sospecha de infecciones bacterianas, para el análisis se incluyeron 223 enfermos con infección confirmada mediante cultivos microbiológicos positivos, en los que se encontraron un total de 310 microorganismos.



Fuente: Elaboración Propia con base en (Klímová et al; 2016).

Se logran identificar que de los 310 microorganismos presentes en los pacientes con infecciones, 109 de estos pertenecen a Gram positivos y 167 a Gram negativos y un 34 a hongos, y como se puede ver el agente etiológico con más frecuencia, con un total de 98 aislamientos, *Escherichia coli*. Tomando en cuenta la investigación anterior *el E. coli* sigue siendo uno de los organismos que causa con mayor frecuencia infecciones bacterianas en la población.

Además se observó resistencia clínicamente significativa en 101 bacterias; se determinó resistencia en antibióticos como amoxicilina, ácido clavulánico, quinolonas, carbapenemes, vancomicina, y meticilina: “La adquisición de infecciones en el hospital

o asociada a un ingreso reciente, adquiridas en comunidad y el aislamiento en los cultivos de control, se determinan como posibles factores de riesgo para el desarrollo de la infección multirresistente “(Klímová et al; 2016).

Si comparamos los resultados obtenidos en el año de 1997 en las investigaciones epidemiológicas cubanas, los resultados a nivel nacional en el 2010, y los mostrados anteriormente en España en el año 2016, nos indica que conforme pasan los años se sigue dando un aumento de infecciones bacterianas por cepas multiresistentes a antibióticos, especialmente intrahospitalarias, representando una complicación grave y frecuente con una incidencia elevada, como una de las causas más frecuentes de hospitalización y por ende una de las principales razones del progreso de resistencia.

Alós, (2015) menciona : “La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de enfermedades infecciosas, salvando millones de vidas alrededor del mundo, sin embargo, la amenaza creciente de resistencia bacteriana a los antimicrobianos deteriora la eficacia de estos fármacos”.

El incremento de la resistencia microbiana por la utilización de antibióticos a gran escala, sobre todo en nuestros hospitales, ha permitido cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones, dejan prácticamente sin alternativas para el tratamiento de las infecciones. En la actualidad existe multirresistencia en gran número de gérmenes, la resistencia a los antimicrobianos reduce las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades, prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a

utilizar medicamentos costosos, además de alargar el tiempo de hospitalización y aumentar el riesgo de mortalidad. (Serra, 2017).

En el 2017 la OMS realiza una publicación en la que hace referencia a grupos de bacterias multirresistentes de prioridad crítica, que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y, a menudo, letales; han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera y cuarta generaciones (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias Multirresistentes).

Por otro lado se, muestran bacterias que exhiben una farmacoresistencia creciente como el *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, el *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina, *Campylobacter spp.*, resistente a las fluorquinolonas, *Salmonellae* resistente a las fluorquinolonas, la *Neisseria gonorrhoeae* resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas, *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina, el *Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina y la *Shigella spp.*, resistente a las fluorquinolonas. (Gonzales, 2017).

A pesar de la urgencia del problema, la contención de la resistencia a los antibióticos no es un trabajo fácil y los logros conseguidos hasta ahora a nivel nacional y mundial no han sido aún suficientes. La vigilancia, prevención y el control de la resistencia a los antibióticos requieren un esfuerzo, compromiso y colaboración constante entre diferentes grupos del sector público y privado.

### **Mecanismos de Resistencia bacteriana a antibióticos**

Estos mecanismos se adquieren mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal, proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula, entre especies relacionadas o diferentes facilitada por algunos elementos móviles tales como los integrones. Esta transferencia horizontal permite que los mecanismos se trasladen entre diferentes enteropatógenos y que se diseminen rápidamente a nivel mundial. Para cada familia de antibióticos existe más de un mecanismo de resistencia antibiótica descrito, como en el caso de la quinolonas que presentan mutaciones cromosómicas, proteínas que impiden la unión del antibiótico y las bombas de eflujo específicas. En general, los tipos de mecanismos moleculares de resistencia más comunes se encuentran: alteraciones de la permeabilidad, inactivación enzimática y alteraciones en el sitio blanco. (Mosquito *et al* 2017)

Fernández *et al.* (2003) afirma:

“Los mecanismos presentes en bacterias para resistir la acción de los antibióticos se pueden explicar de la siguiente manera; El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas)”.

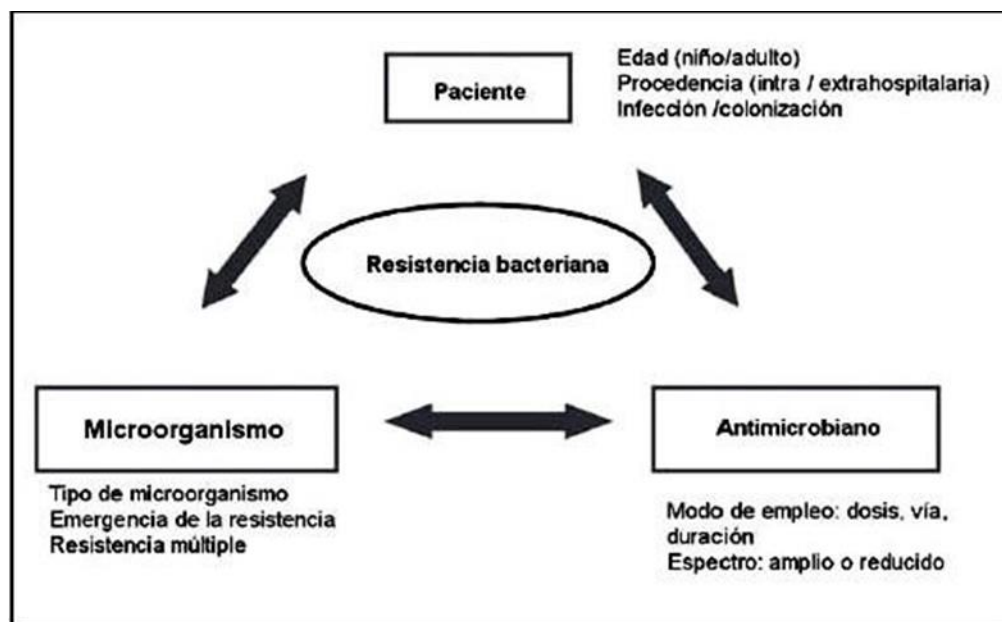
La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma por ejemplo, son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetil transferasa, el caso más típico, el de las betalactamasas, para el grupo de los Betalactámicos. En años recientes la aparición de betalactamasas de amplio espectro dificulta el uso de antibióticos antibetalactamasas tan utilizados como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. (Vignoli, 2008; Fernández *et al* 2003)

Algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas. (Vignoli, 2008)

## Factores que influyen en el progreso de resistencia bacteriana en la población

EL incremento de la Resistencia bacteriana a antimicrobianos ha sido impulsada por un conjunto diverso de factores relacionados , como se muestra en la figura (7), incluyendo la prescripción y venta inapropiada de antibióticos, el uso de antibióticos fuera del sector de salud, factores genéticos intrínsecos de las bacterias y los factores relacionados al paciente.(Hillary, 2016) .

Ilustración 7. Factores que influyen en la resistencia bacteriana.

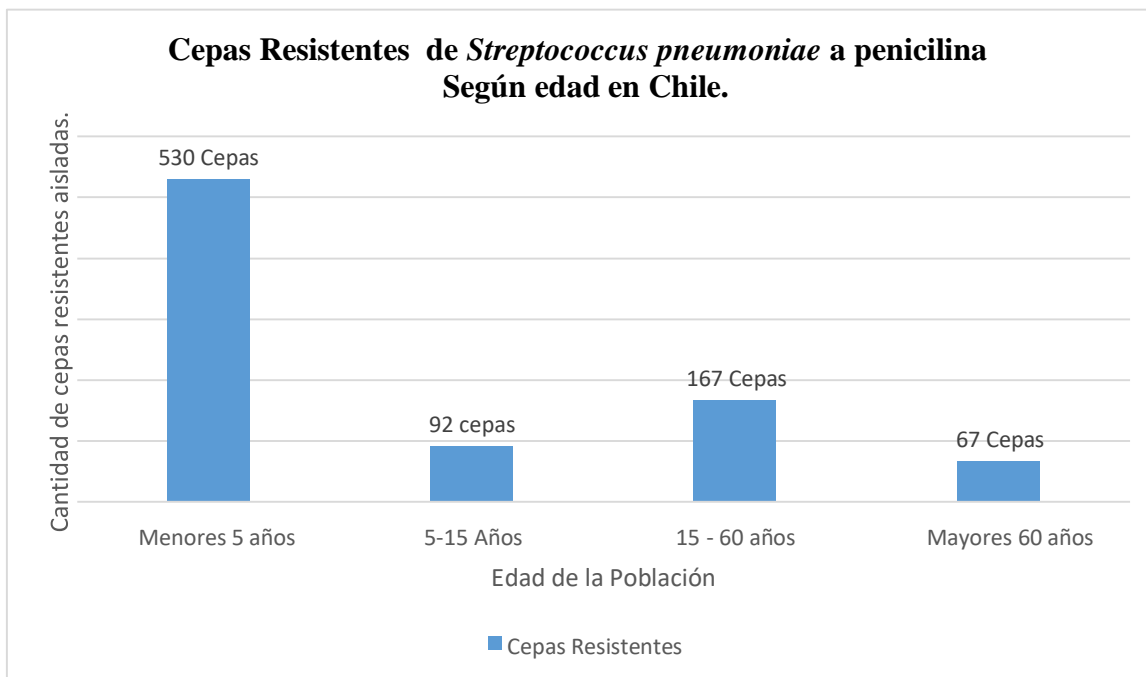


Fuente: (Benavides *et al*; 2005).

## Factores relacionados al paciente

Los factores de resistencia bacteriana a antibióticos son diferentes, según la edad del paciente sea niño o adulto, procedencia, si es ambulatorio u hospitalizado, según el síndrome clínico o localización de la infección. Respecto a la edad del paciente se

observa que a menor edad, existe una mayor probabilidad de adquirir infección. (Benavides *et al*, 2005; García, 2003).



Fuente: Elaboración propia con base en (García, 2003).

### **Factores relacionados al microorganismo**

En estos factores es importante considerar el tipo de microorganismo, como por ejemplo, para un antibiótico como la penicilina, existe variación de la resistencia según la bacteria, en el caso de las Gram Positivas durante el año 2001-2002. *S. aureus* presentó un 90% de resistencia a la penicilina mientras que *S. pneumoniae* un 17%. La resistencia múltiple y el surgimiento de la resistencia son factores importantes a tomar en cuenta, esta última es definida por el aumento del porcentaje de resistencia,

asumiendo que cuando el antibiótico es introducido al mercado su porcentaje de resistencia es cero.

(Benavides *et al*, 2005; García, 2003).

Tabla 8. Emergencia Surgimiento de la Resistencia bacteriana a antibióticos en Estados Unidos en el año 2001.

Microorganismo	Antimicrobiano	% Resistencia	Aumento % de Resistencia al año
<i>S. aureus</i>	Meticilina	42	1.1
<i>S. pneumoniae</i>	Penicilina	23	0.3
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	14.5	0.7
<i>Enterococcus spp.</i>	vancomicina	11	0.6
<i>K. pneumoniae</i>	Ceftazidima	7.4	0.6
<i>E.coli</i>	Ciprofloxacina	6.5	0.5

Fuente: Elaboración Propia con base en (García, 2003).

### Factores relacionados al fármaco

Se debe considerar el modo de empleo de un determinado agente antimicrobiano, las dosis utilizadas, la vía de administración y la duración de la terapia. También se debe considerar el espectro del antibiótico que se está utilizando (amplio o reducido).

Todas estas variables inciden en el desarrollo o selección de la resistencia. (Benavides *et al* 2005; García, 2003).

La Organización Mundial de la Salud, en el 2014, menciona lo siguiente sobre las causas de la resistencia a los antibióticos:

La causa principal de la resistencia a los antibióticos es un uso inapropiado de los mismos. Como apunta el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC, en sus siglas en inglés) el uso inapropiado se produce fundamentalmente de tres formas:

- Prescripción innecesaria de antibióticos para infecciones bacterianas contra las que no tienen ningún efecto.
- Prescripción demasiado frecuente de “antibióticos de amplio espectro”, en lugar de antibióticos específicos seleccionados mediante un diagnóstico más preciso.
- Uso inadecuado por parte del paciente, al no respetar la dosis o la duración del tratamiento, permitiendo que algunas bacterias sobrevivan y se vuelvan resistentes.

La resistencia es una limitación de las opciones terapéuticas. El problema es que se depende de los antimicrobianos para eliminar las infecciones bacterianas; si hubiese métodos terapéuticos alternativos, la resistencia microbiana a los fármacos persistiría, pero dejaría de ser un considerable problema en la salud pública. De hecho, la

resistencia de microorganismos está condicionada por las prácticas asistenciales, por la falta de información y adecuada educación por parte de las organizaciones encargadas de la salud, en particular por el uso excesivo de estos medicamentos en trastornos donde quizás no son necesarios. (Klímová et al; 2016; Benavides et al 2005). Por consiguiente, las estrategias de detección y contención deben adaptarse a las necesidades de los programas de control y tratamiento relacionados con enfermedades específicas.

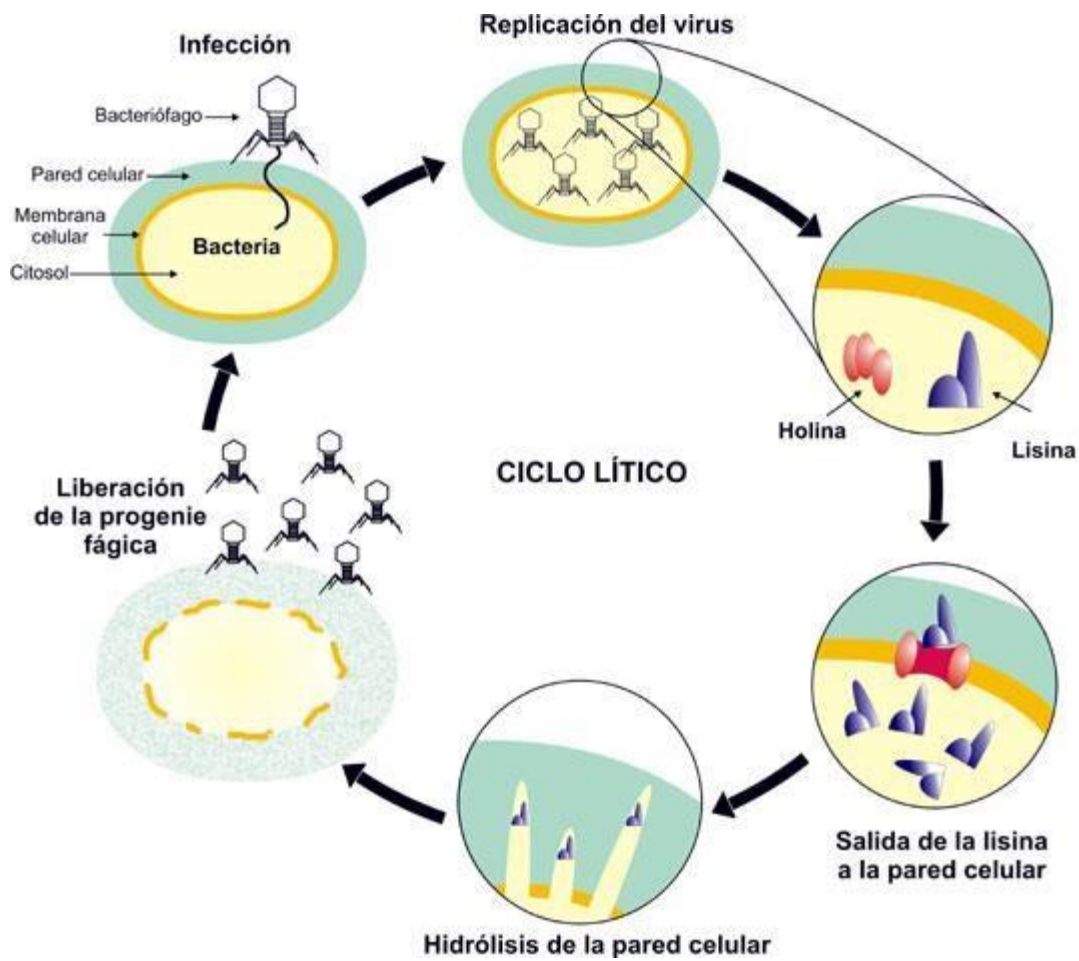
### **Endolisinas codificadas por Bacteriófagos (Enzibióticos)**

Una alternativa en la eliminación de microorganismos patógenos y resistentes, es la utilización de bacteriófagos y endolisinas, conocidas también como enzimas líticas o proteínas fágicas. “Los bacteriófagos son virus muy abundantes en el ambiente, que infectan exclusivamente a las bacterias en su ciclo de multiplicación, provocando la muerte de la bacteria a la que infectan, pudiendo ser considerados como agentes antimicrobianos” (García, P, Martínez B, Obeso J & Rodríguez A. 2008). Se han utilizado en el este de Europa con fines terapéuticos y alternativa al uso de antibióticos, denominada terapia fágica. Más recientemente, estudios avalan la aplicación de los bacteriófagos como agentes de biocontrol en diferentes campos como en la agricultura, tratamiento de aguas residuales y alimentos. (García *et al*; 2008).

En cuanto al modo de acción de las endolisinas fágicas, se indica la estructura de la superficie de una bacteria Gram positiva formada por una membrana citoplasmática y una capa de peptidoglicano o pared celular. Las proteínas fágicas encargadas de la lisis,

holina y endolisina se han representado por círculos rojos y barras azules, respectivamente.

Ilustración 8. Ciclo de vida de un bacteriófago.



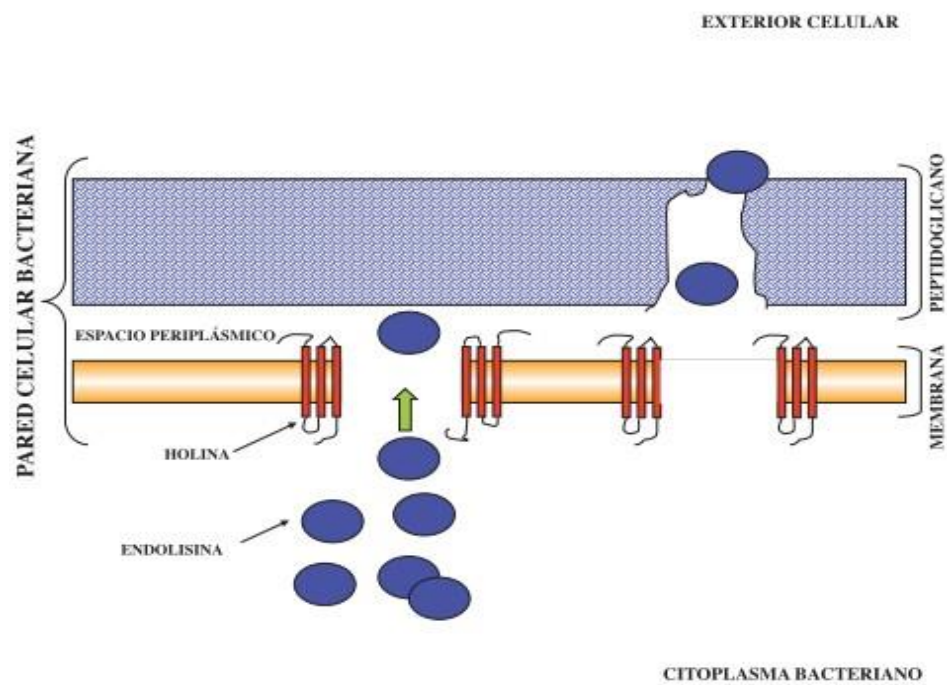
Fuente: (Hermoso, 2008).

Un bacteriófago se encuentra con una bacteria sensible y se une a la superficie de la bacteria, introduce su material genético en el interior de la bacteria sensible. El material genético se replica en el interior de la bacteria generándose multitud de copias. Tras la infección, mediante las proteínas holinas, se unen al peptidoglucano y rompen los enlaces que le dan estabilidad produciendo la lisis y liberación de la progenie fágica.

Se debe tomar en cuenta que no todos los bacteriófagos pueden usarse en la terapia. De las dos grandes clases, líticos y lisogénicos, solo los pertenecientes a la primera pueden ser eficaces. Los segundos, al integrar su genoma en el gen de la bacteria, no le causa la muerte y pueden incluso transferir genes que incrementen la virulencia bacteriana. En el caso de que aparezcan fenómenos de resistencia bacteriana a los bacteriófagos, pueden resolverse más fácilmente que la resistencia a antibióticos, pues basta con cambiar uno o dos genes del virus para resolver este problema (López *et al*; 2017).

Las endolisinas o enzimas líticas, son proteínas codificadas por bacteriófagos con la función de lisar o destruir la bacteria huésped, para permitir la liberación de la progenie viral una vez que ha terminado su ciclo de multiplicación. En este proceso participan dos proteínas, la holina, una proteína pequeña que se adhiere a la membrana de la célula formando poros y la enzima lítica encargada de degradar el peptidoglucano que forma parte de la pared celular bacteriana. Esta desestabilización provoca un desequilibrio osmótico entre el exterior e interior de la misma, provocando la lisis (Monk, Rees, Barrow, Hagens & Harper. 2010).

Ilustración 9. Modo acción de una endolisina fagica.



Fuente: (García *et al*; 2008).

Por su capacidad de lisis en pared celular de las bacterias, y debido al reciente incremento en el número de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, se han propuesto para ellas aplicaciones muy diversas siempre relacionadas con la eliminación

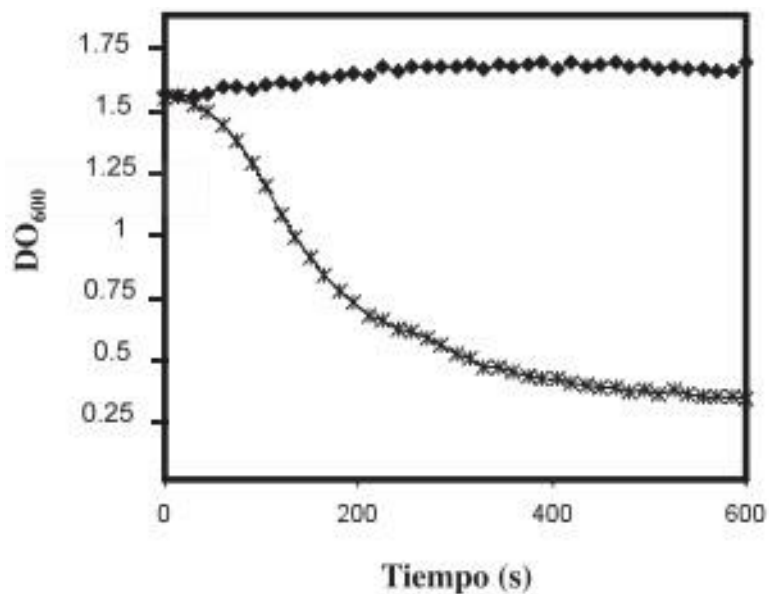
específica o la detección de microorganismos patógenos para el ser humano, animales o alimentos. De hecho, el valor terapéutico de estas proteínas como una alternativa a los antibióticos convencionales ha sido demostrado ya in vivo con el tratamiento eficaz de infecciones bacterianas en modelos de ratón (Borysowski *et al.*, 2006).

El agente *S. aureus* es de gran importancia en muchos estudios como modelo de investigación debido a su capacidad de contaminación en humanos, animales y alimentos. Como agentes antimicrobianos frente a estas bacterias se han centrado los bacteriófagos y las enzimas líticas. (Borysowski *et al.*, 2006).

Para este tipo de aplicación de las endolisinas se ha acuñado el término de enzibióticos, una combinación entre diferentes enzimas fágicas, capaces de eliminar en horas, de forma específica y rápida, las infecciones causadas por el patógeno *Streptococcus pneumoniae* (Diez, 2016). Las proteínas purificadas se emplean en diferentes ensayos in vitro (cultivos bacterianos planctónicos y biofilmes) y los resultados se validan en modelos animales (ratones o embriones de pez cebra).

En el estudio de enfermedades infecciosas y sus tratamientos, es imprescindible la validación de los datos obtenidos *in vitro* mediante el uso de modelos animales de experimentación. Gracias a estos modelos se han podido evaluar diferentes mecanismos implicados en la patogénesis, determinando la eficacia de nuevos compuestos antimicrobianos o posibles candidatos (Diez, 2016)

Ilustración 10. *S. aureus* en ausencia y presencia de endolisina.

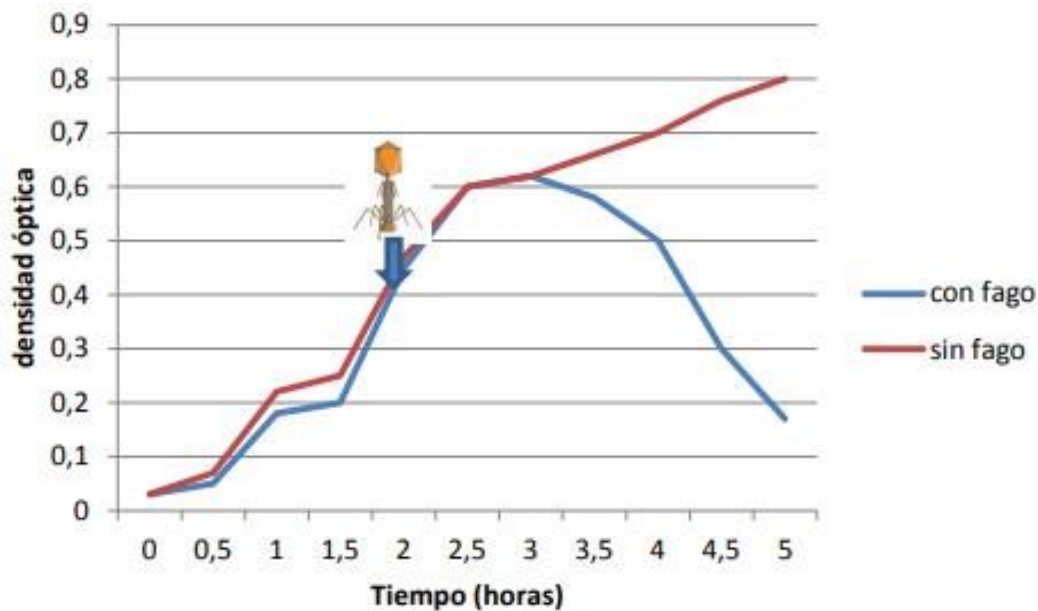


Evolución en la densidad óptica o turbidez de suspensiones de *S. aureus* durante 600 segundos en presencia (x) y en ausencia (♦) de la proteína endolisina. El rápido descenso de la turbidez indica la velocidad a la que las células se rompen en presencia de la endolisina. La densidad Óptica es un método común para estimar la concentración de bacterias en un líquido. Fuente: (García, 2010).

Teniendo en cuenta las características deseables para utilizar a los fagos como agentes terapéuticos, por ejemplo, una rápida cinética de lisis de la pared celular bacteriana, en la investigación realizada por Lopardo (2016) aísla y compara 5 fagos, los cuales fueron denominados siguiendo las normativas taxonómicas internacionales como  $\Phi$ BE1,  $\Phi$ BE2,  $\Phi$ BE3,  $\Phi$ BE4, y  $\Phi$ BE5. Para el aislamiento de los mismos se utilizaron muestras clínicas filtradas y ensayadas sobre cepas de enterococos, tanto resistentes como sensibles a la vancomicina.

La curva de lisis de la cepa de *Enterococcus faecalis* en presencia del fago  $\Phi$ BE2, muestra como el cultivo tratado con dicho fago sufre un descenso en la concentración bacteriana hasta la lisis completa.  $\Phi$ BE2 tuvo un espectro de acción amplio, ya que mostró actividad sobre la mayoría de las cepas de las diferentes especies de enterococos ensayadas en el estudio, entre las que se encontraban tanto cepas resistentes como sensibles a vancomicina. (Lopardo, 2016).

Ilustración 11. Curva de crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecium* EN 470 en presencia y en ausencia del bacteriófago  $\Phi$ BE2.



Fuente: Lopardo, (2016)

.En las ordenadas se observa la densidad óptica (DO) y en las abscisas el tiempo (t) en horas. A las dos horas de inocular el caldo con una colonia de la cepa EN 470 se agregó el bacteriófago y se midieron los cambios de DO. Se utilizó un cultivo sin la presencia del bacteriófago (línea roja) como control positivo de crecimiento. Se observó la caída de la DO un tiempo después de la inoculación de la suspensión viral en el tubo tratado (línea azul) pero no en el tubo no tratado con dicha suspensión (línea roja).

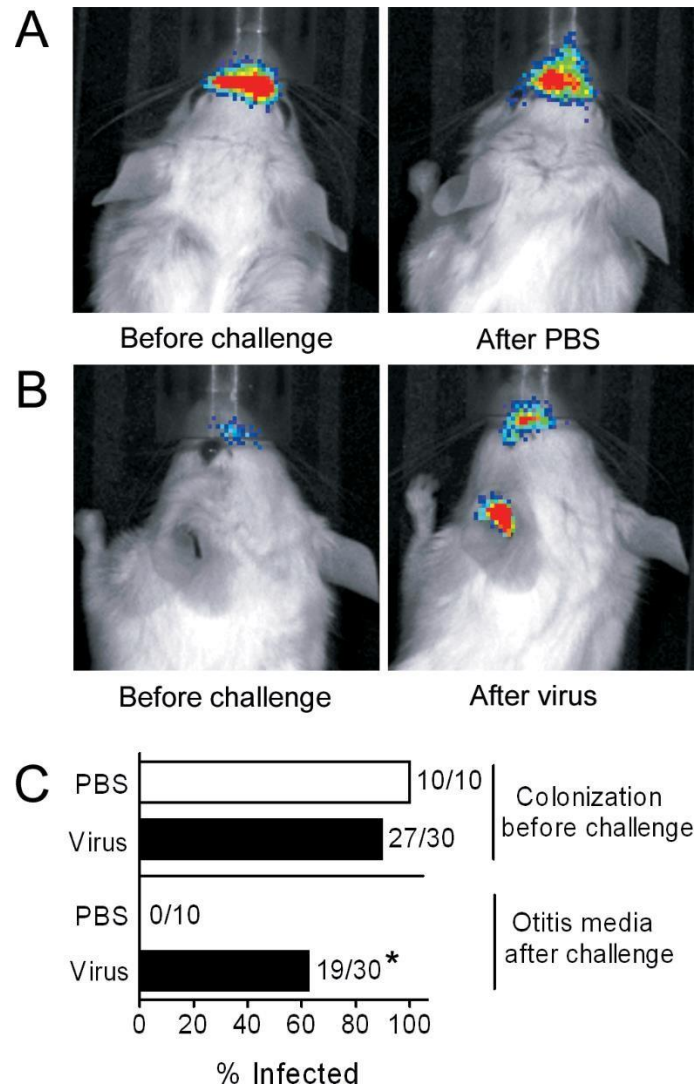
Numerosos grupos de investigación como los dirigidos por el Dr. Pedro García en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) y por el Profesor Vincent A. Fischetti de la Universidad Rockefeller de Nueva York, EEUU, están estudiando lisinas fágicas, tanto de origen natural como de origen sintético, para prevenir infecciones y eliminar de forma específica bacterias patógenas tales como *Streptococcus pneumoniae*

y *Staphylococcus aureus*, entre otras. Por ejemplo, el caso de la enzima de origen sintético Cpl-7, Cpl -1, Cpl- 9 y la Cpl7s y (Hermoso *et al*; 2007).

Aunque la capacidad de un fago endolisina para matar bacterias se informó por primera vez en 1957. Fischetti y colaboradores no demostraron hasta 2001 que las endolisinas recombinantes purificadas pueden usarse como agentes terapéuticos para prevenir o reducir la colonización de las superficies de las mucosas con estreptococos del grupo A en ratones. Esta estrategia se ha extendido y demostrado ser potencialmente útil para controlar la sepsis u otras infecciones producidas por varias bacterias Gram positivas, como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus. Faecium*, *Clostridium perfringens* o estreptococos. (Nelson, Fischetti 2012).

En los últimos años se ha probado que, *in vitro* e *in vivo*, la adición de estas endolisinas purificadas eliminaban streptococcus del grupo A y *Streptococcus pneumoniae* de la nasofaringe de animales colonizados experimentalmente. (Hermoso, 2008). Muy recientemente en el año 2017 en Estados Unidos, se ha descrito un modelo animal que reproduce las infecciones en el oído medio (otitis media). En este modelo, los ratones eran infectados vía infección intranasal primeramente con *Streptococcus pneumoniae* y posteriormente con virus influenza (ya que se supone que la otitis media involucra también virus respiratorios como el influenza). Usando este modelo animal se demostró que la endolisina del fago Cp-1 (denominada Cpl-1,) específica por neumococo, era no solamente capaz de eliminar la colonización con *S pneumoniae*, sino también de prevenir el desarrollo de otitis media en los ratones (Hermoso, 2008; McCullers *et al*; 2017).

Ilustración 12. El tratamiento con Lisina Cpl-1, elimina la colonización y previene el desarrollo de otitis media.



Fuente: (McCullers *et al*; 2007)

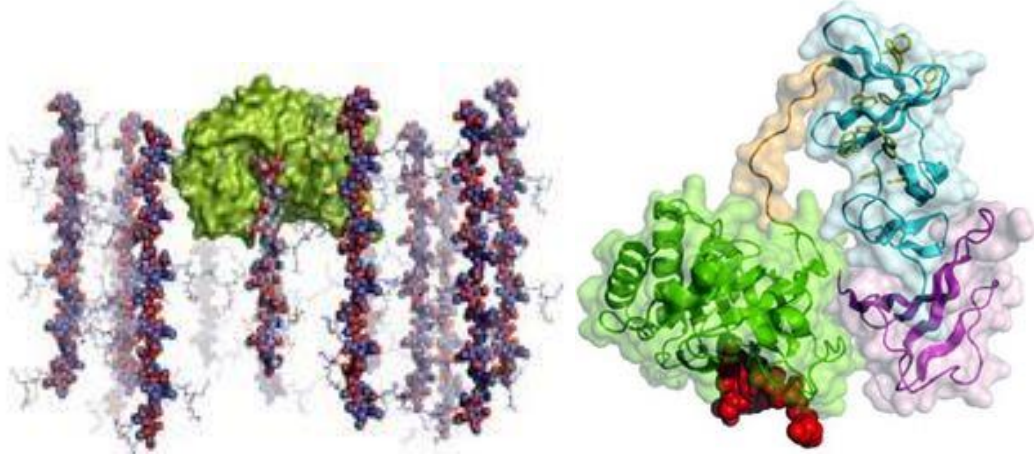
Dentro de las 72 horas de la infección neumocócica, el 100% de los ratones (10/10) se colonizaron visiblemente con bacterias en la parte anterior de la nariz, y el 70% (7/10) desarrollaron otitis media aguda (OMA). Estas infecciones del oído medio se resolvieron mediante imágenes bioluminiscentes, Utilizando este nuevo modelo, se

probó la hipótesis de que la reducción o eliminación de los neumococos colonizadores con Cpl-1 lisina purificada disminuían la otitis media aguda.

Los ratones A y B fueron colonizados por vía intranasal con  $1 \times 10^5$  UFC de *S. Pneumoniae* y siete días más tarde se infectaron con el virus de la gripe. El ratón simulado con tampón enzimático desarrolla otitis media bilateral 24 horas después de la infección con el virus de la gripe, mientras que (B) un ratón representativo tratado con lisina libera los neumococos colonizadores y no desarrolla una infección bacteriana secundaria. Significativamente menos ratones tratados con Cpl-1 permanecieron colonizados 24 horas después y ningún ratón tratado desarrolló otitis media en comparación con animales simulados, en los que se observó otitis media en 80% (McCullers *et al*; 2007)

La estructura tridimensional de la molécula de Cpl-1 presenta dos módulos proteicos bien diferenciados: un módulo de anclaje que permite a Cpl-1 unirse específicamente a las moléculas de colina sólo presentes en la pared del neumococo y otro módulo proteico dotado de una potente maquinaria catalítica de degradación del peptidoglicano (Hermoso, 2008).

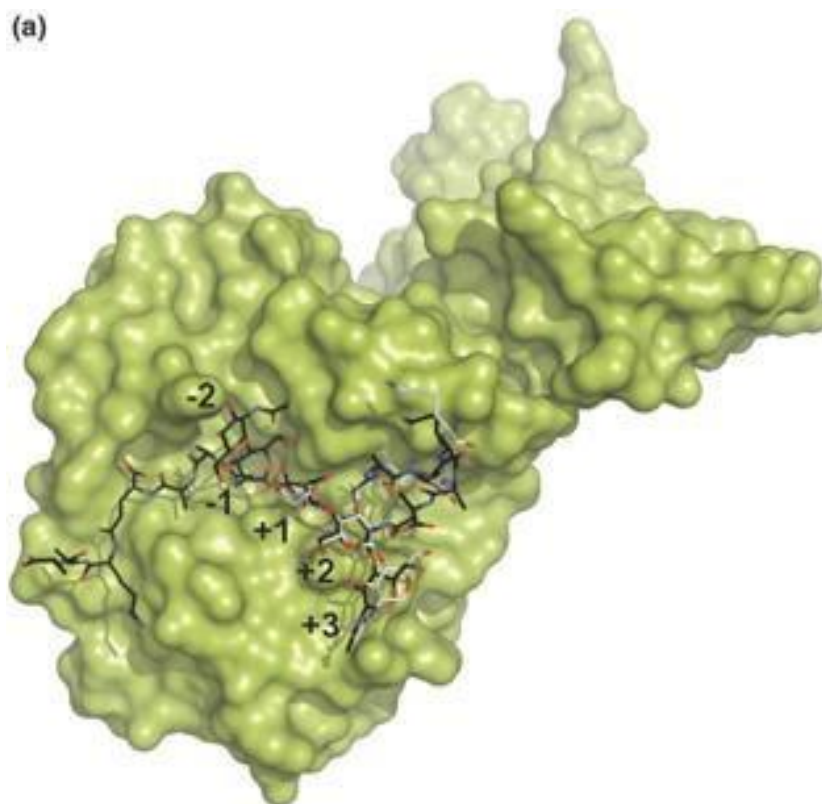
Ilustración 13. Estructura tridimensional del enzibiótico Cpl-1. En verde (A) se representa el módulo catalítico y en azul y morado el módulo de anclaje a la pared. Ambos módulos se encuentran unidos por un conector (naranja). El fragmento del peptidoglicano se representa como esferas rojas. (B) Modelo de interacción de Cpl-1 (en verde) con la pared bacteriana.



Fuente: Instituto de Química-Física "Rocasolano". CSIC, Madrid, España.

De este modo, la información estructural ha permitido esclarecer el mecanismo mediante el cual el enzibiótico se une selectivamente a la pared del neumococo y revela la maquinaria molecular de Cpl-1 implicada en el reconocimiento y degradación de la bacteria. Estos resultados nos han dado, una imagen de cómo Cpl-1 se une y elimina en pocos segundos al neumococo.

Ilustración 14. Reconocimiento de la pared celular bacteriana por Cpl-1. Superposición de las estructuras de peptidoglucanos observadas por cristalografía de rayos X (carbonos en gris) y por cálculo (carbonos en negro).

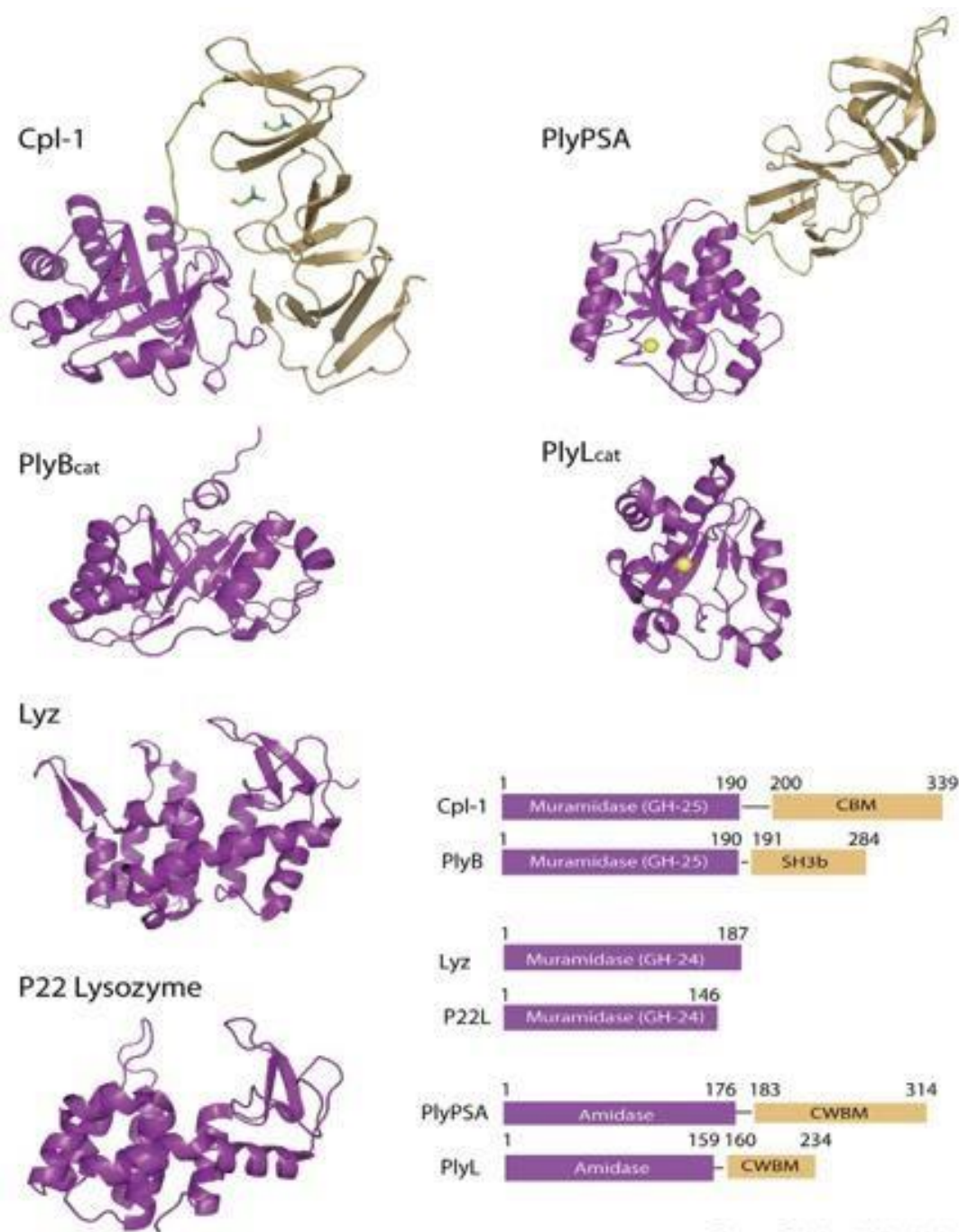


Fuente: ScienceDirect, Curren Opinion in Microbiology, 2007

Según Jikia *et al.* (2005): “Las investigaciones recientes no sólo han revelado la sorprendente diversidad catalítica estructural de estas murein-hidrolasas si no también ha dado información sobre su organización modular, sus estructuras tridimensionales y su mecanismo de reconocimiento de pared celular bacteriana. Estos resultados permiten a los enzibióticos considerarse como antimicrobianos eficaces con importantes aplicaciones en medicina y biotecnología.”

Porter *et al*, (2007) afirman: La estructura cristalina del módulo catalítico de PlyB, una endolisina codificada por el fago BcpI, que muestra una potente actividad lítica contra la cepa ATCC 4342 de *Bacillus anthracis* . PlyB comprende un módulo catalítico N-terminal (PlyBcat) que comparte similitud de secuencia con miembros de la familia de la glicosil hidrolasa (GH-25) y un módulo de unión a la pared celular homólogo a los dominios SH3b bacterianos. La PlyB rompe el enlace b-1,4-glicosídico entre el ácido Nacetilmurámico y las unidades de N-acetilglucosamina. La actividad antibacteriana de PlyB se probó in vitro, mostrando que el PlyB de longitud completa es capaz de lisar la cepa de ántrax de manera eficiente. (Porter, 2007).

Ilustración 15. Estructuras Cristalinas de enzimas Líticas.



Fuente: ScienceDirect, Curren Opinion in Microbiology, 2007

Se muestran las estructuras cristalinas de Cpl-1, el módulo catalítico de PlyB (PlyBcat), Lyz, la lisozima del fago P22, PlyPSA y el módulo catalítico de PlyL (PlyLcat). Los módulos catalíticos están coloreados en púrpura, módulo de unión a pared celular (CWBM) en oro y los vinculadores en verde. Cationes de Zn catalíticos se representan como esferas amarillas. Se muestra un esquema que compara la composición modular de endolisinas Cpl-1, PlyB, Lyz, lisozima del fago P22, (PlyPSA) y PlyL.

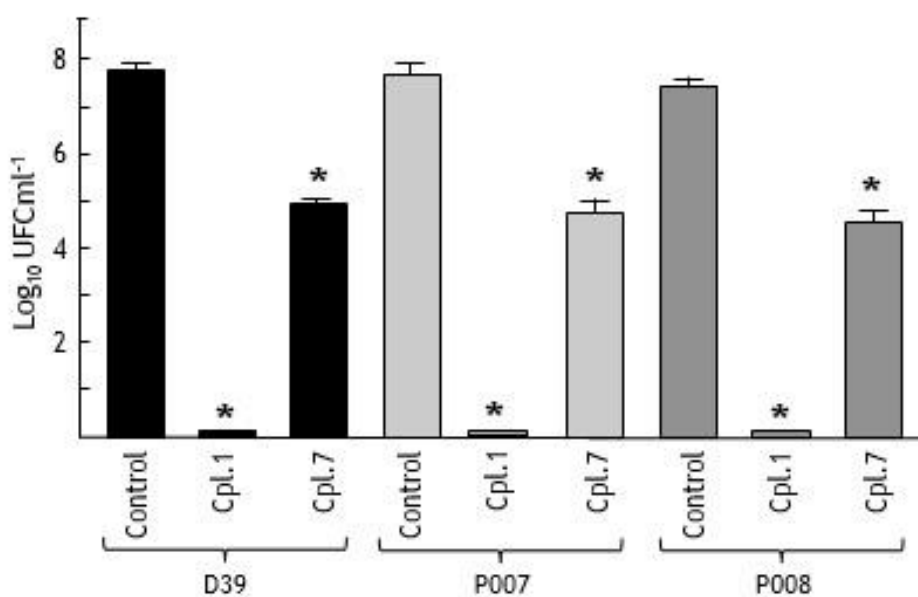
La mayoría de las mureín-hidrolasas informadas hasta ahora, ya sea del huésped o del origen del fago, son proteínas de unión a la colina (CBP) que dependen de su unión a los restos colinales de los ácidos teicoicos neumocócicos para la actividad. Hay una única excepción a esta regla, la lisozima Cpl-7, codificada por el fago neumocócico lítico

Cp-7, la cual no depende de un dominio de unión a colina. En la Universidad Complutense de Madrid en el 2014, se realizaron estudios estructurales y funcionales sobre la lisozima Cpl-7 del bacteriófago Cp- 7 de neumococo. (Diez, 2014). Además realizaron una variante de ingeniería, Cpl-7S, este enzibiótico alberga 15 cambios de aminoácidos y mostró una actividad lítica incrementada contra *S. pneumoniae*, incluyendo diferentes cepas multirresistentes, *Streptococcus pyogenes* y otros patógenos. Se mostró, también, una acción combinada de 0,01% de carvacrol (un aceite esencial) y

Cpl-7S, un protocolo diseñado para desestabilizar la membrana externa de bacterias Gram-negativas las cuales presentan mayor resistencia para ser atravesadas, fue capaz

de hacer que *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* fueran susceptibles a la actividad de muerte de la lisozima. (Diez, 2014; Bustamante *et al*; 2010)

Ilustración 16. Efecto bactericida de Cpl-1 y Cpl-7.



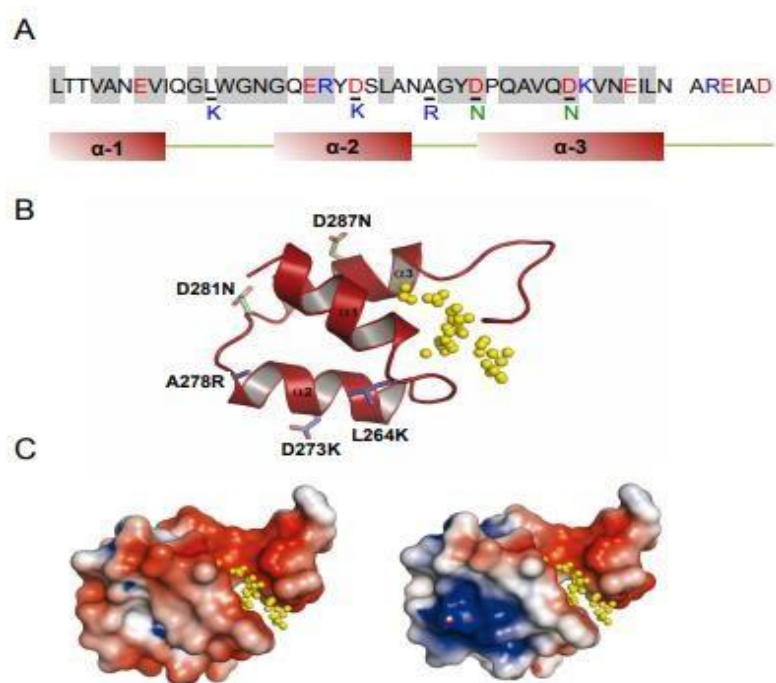
Fuente: (Diez, 2014; Bustamante *et al*, 2010)

La comparación del efecto bactericida de Cpl-1 y Cpl7 sobre diferentes cepas de *S. pneumoniae*, cultivos de D39, P007 y P008, los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos en comparación de los controles que estaban en ausencia de enzibioticos. Debido a diferentes actividades bactericidas de las enzimas se

hace una modificación al enzibiótico Cpl-7 el cual tuvo una actividad menor, esto realizando un cambio en los aminoácidos.

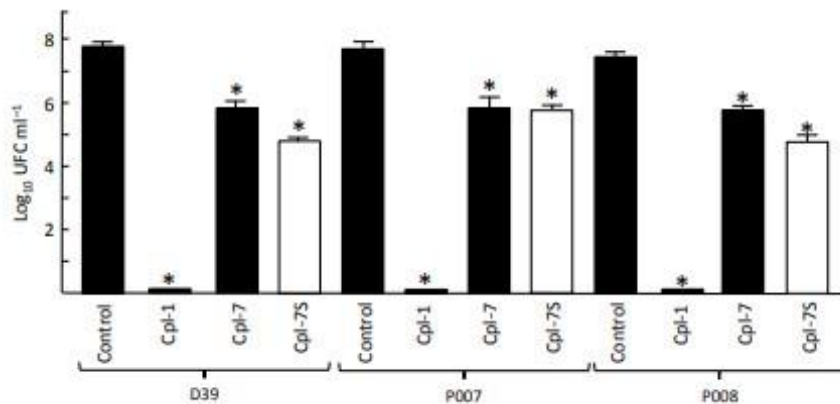
La modificación de la carga neta del dominio de unión a proteína de la Cpl-7, (Figura 17.A) muestra la distribución de los aminoácidos sustituidos, la fila de arriba muestra la secuencia de aminoácidos de un módulo de unión al sustrato de repetición de Cpl-7, así como la unión entre ellos con los residuos ácidos y básicos en rojo y azul respectivamente, las posiciones mutadas se representan subrayadas, indicando en la parte inferior el aminoácido por el cual ha sido sustituido, en azul los aminoácidos básicos y en verde los neutros. Los cuadros grises muestran las regiones conservadas. En la parte (B) modelo tridimensional de la segunda repetición del módulo de unión al sustrato (CWBM). En azul se representan los residuos sustituidos por aminoácidos básicos y en verde los Asp sustituidos por Asn. (Figura 17,C) el modelo de superficie molecular de la misma repetición coloreado de acuerdo a su potencial electrostático en Cpl-7 izquierda y Cpl-7S derecha, rojo para residuos ácidos y azul para básicos, la cavidad de unión al sustrato identificado mediante software Fpocket, se representa con unas esferas amarillas.

Ilustración 17. Modificación del enzibiótico Cpl-7 para aumentar su eficacia.



Fuente: Diez, (2014)

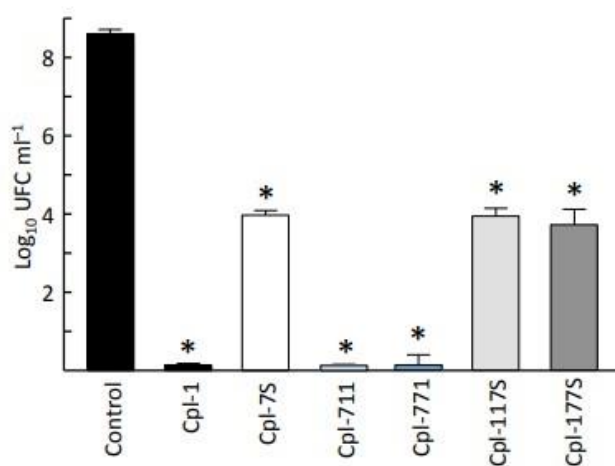
Ilustración 18. Comparación de los enzibióticos, Cpl-1 y Cpl-7 y Cpl-7S.



Fuente: (Diez, 2014; Bustamante *et al*, 2010).

Se observaron diferencias en el efecto bactericida de Cpl-1 y Cpl7 sobre diferentes cepas de *S. pneumoniae*, cultivos de D39, P007 y P008 (Figura 19), se observa como la actividad bactericida del enzibiótico Cpl-7S sobre las distintas cepas de *S. pneumoniae* aumenta después de ser modificado.

Ilustración 19. Diferentes proteínas quiméricas construidas a partir de Cpl-1 y Cpl-7S



Fuente: (Diez, 2014; Bustamante *et al*, 2010).

Corresponden a enzibioticos con una mejor actividad bactericida, como resultado se obtuvieron dos enzibióticos con un efecto aun mayor el Cpl-711 y el Cpl-771.

Es importante tomar en cuenta los estudios que se han llevado a cabo con *Streptococcus pneumoniae*, que actualmente es la principal causa de neumonía, meningitis e infecciones del torrente sanguíneo en ancianos, niños y personas inmunocomprometidas e infecciones del oído medio en niños. La alta prevalencia de neumococos resistentes a los medicamentos y las alternativas terapéuticas limitadas para tratar con éxito estos organismos resistentes hacen que sea urgente encontrar nuevas soluciones. Los cócteles enzimáticos pueden ser especialmente útiles cuando se desea una lisis muy rápida o cuando se trabaja con cepas particulares que tienen una cinética de lisis más lenta (Tabla 7) (Cheng, Nelson, Zhu, Fischetti, 2005).

Tabla 9. Pruebas in vitro e in vivo del neumococo frente a Murein- Hidrolasas solas y combinadas.

Antimicrobiano	Estudio	Modelo animal	A través de	Resultados

Cpl-1 + Gen	In vitro	-----	-----	Sinergia en una disminución de cepas Resistentes a penicilina.
Cpl-1 + Pen	In vitro	-----	-----	Sinergia, en una disminución de cepa altamente resistente a penicilina.
LytA	In vitro	-----	-----	Más activo que Cpl-1 en resistencia a penicilina
LytA + Ciclofosfamida	In vitro	-----	-----	Disminución de una cepa resistente a la Cfx.
Cpl-1	In vivo	Endocarditis	Vía intravenosa	Eliminación de neumococo de la sangre en 30min
Cpl-1	In vivo	Peritonitis sepsis	Intraperitoneal	Disminución de infecciones bacterianas en sangre y liquido intraperitoneal

Gen, Gentamicina; Pen, penicilina; CFX, cefotaxime.

Fuente: Hermoso (2007)

## Desarrollo actual de los Enzibioticos

Hasta la fecha, los tratamientos con enzibioticos para los seres humanos han sido lentos en alcanzar el mercado. Esto es en parte debido a obstáculos reglamentarios, además del tiempo que con lleva el desarrollo de un nuevo tratamiento, estudios, pruebas en animales y clínicas para luego demostrar que es seguro y eficaz en los seres humanos esto toma años y costos de millones de dólares. Así, gran parte del trabajo inicial ha estado en la seguridad alimentaria y salud animal (García E, 2014).

Sobre la base de los estudios más recientes, existen razones sólidas para creer que el desarrollo de productos derivados de fagos para tratar y prevenir las enfermedades bacterianas tendrá éxito, al menos en entornos limitados. En este sentido, la terapia con fagos recibió un impulso en agosto de 2006, cuando la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de EE. UU aprobó un cóctel de seis fagos purificados individualmente (producto llamado Listshield) que podría usarse como aditivo alimentarios y rociarse sobre la carne para matar la *Listeria*. Afortunadamente, la FDA aprobó otro spray de cóctel de fagos con el nombre de Ecoshield, para destruir específicamente *E. coli* O157: H7, una cepa que causó varios brotes importantes de enfermedades transmitidas por los alimentos en los últimos años (Hermoso, 2007)

Por otro lado, ha aparecido en el mercado el producto “Listex P100”, comercializado por la empresa EBI Food Safety. Este producto está compuesto de una mezcla de bacteriófagos específicos frente a *Listeria monocytogenes* y tiene como

finalidad actuar como bioconservante, evitando el desarrollo de este patógeno en carnes y algunos tipos de quesos (García E, 2014).

Pero, las aplicaciones de fagos para la salud humana son prometedoras, especialmente para las infecciones de la piel, oído interno y otras áreas donde los fagos se pueden aplicar directamente. Parches biodegradables que contiene una matriz de polímero impregnada con una mezcla de fagos activos contra varios Gram positivas y patógenos Gram-negativos se han ya utilizados para tratar a pacientes con infecciones de la piel crónica refractarias a muchos antibióticos. (Jikia, 2005).

Novedosos antimicrobianos, denominados Artilysin®, pueden atravesar la membrana externa (OM) y llegar al Peptidoglucano donde ejercen su acción. Además, también se ha informado que las micobacterias cuya pared celular es estructuralmente diferente de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son inhibidas por endolisinas codificadas por micobacteriófagos. Las endolisinas y los antimicrobianos basados en enzibioticos, pueden considerarse candidatos ideales para una alternativa a los antibióticos. (Gerstmans H, Rubio L, Lavigne R & Briers Y, 2016). Para desarrollar este producto, la tecnología fue licenciada por la compañía alemana LYSANDO AG, que mostro un spray al mercado en 2015.

LYSANDO AG se muestra como líder mundial en el desarrollo de proteínas antimicrobianas para combatir las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Trabajando en una variedad de campos que incluyen higiene, agricultura doméstica y ganadera, dispositivos médicos y farmacias veterinarias y humanas, Establecida en

2009, con la misión de presentar la tecnología de plataforma Artilysin® como respuesta a la creciente amenaza de bacterias resistentes a los antibióticos. Como empresa certificada según DIN EN ISO 13485. (Lysando AG, 2018).

### **Comparación entre bacterofagoterapia y antibióticos**

Los fagos líticos al igual que los antibióticos tienen, un alto poder bactericida. Su diferencia fundamental, además de su peso molecular muchísimo mayor, estriba en la capacidad de duplicarse a expensas de las bacterias. En otros estudios se pudo observar además que la fago terapia tenía una eficacia superior al tratamiento con antibióticos para el manejo de cierto tipo de infecciones (Brussow et al, 2005).

Una ventaja potencial del uso de fagos como agentes terapéuticos sobre los antibióticos es el efecto de amplificación (Callaway et al, 2008). Si bien es posible que las bacterias generen resistencia frente a los fagos, ésta se da con una menor frecuencia que el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Además se puede llevar a cabo el tratamiento con una suspensión que contenga múltiples fagos (cóctel) que infecten a la misma especie bacteriana. Sin embargo una de sus grandes desventajas es la dificultad para purificarlo y su estabilidad. (López *et al*; 2017).

Tabla 10. Comparación del uso profiláctico y/o terapéutico de fagos y antibióticos.

Bacteriófago	Antibiótico	Observaciones
--------------	-------------	---------------

Altamente específicos	Afectan tanto al patógeno como a la microflora normal. Lo que puede llevar a sobreinfecciones	Agentes infecciosos desconocidos requieren del desarrollo de un nuevo enzibiótico
Efecto amplificador, se replican en el sitio de la infección.	Son metabolizados y eliminados del cuerpo y no concentran en el sitio de la infección.	Se necesitan menos administraciones de fagos para lograr un óptimo efecto terapéutico
No se han descrito efectos adversos graves.	Múltiples efectos adversos desórdenes intestinales, alergias, sobreinfecciones	Un efecto adverso para ambos es la liberación de endotoxinas cuando las bacterias son lisadas.
Las bacterias que se tornan resistentes a una cepa de un fago permanecen sensibles a muchos otros.	La resistencia antibiótica no está limitada al antibiótico administrado.	A causa de su gran espectro de acción los antibióticos seleccionan resistencia en muchas especies además de las patógenas a las que están dirigidos.
La selección de nuevos enzibióticos ante cepas resistentes es un proceso relativamente rápido (en el orden de semanas).	El desarrollo de nuevos antibióticos contra bacterias resistentes lleva años en ocasiones.	Selección dirigida para desarrollo de enzibióticos

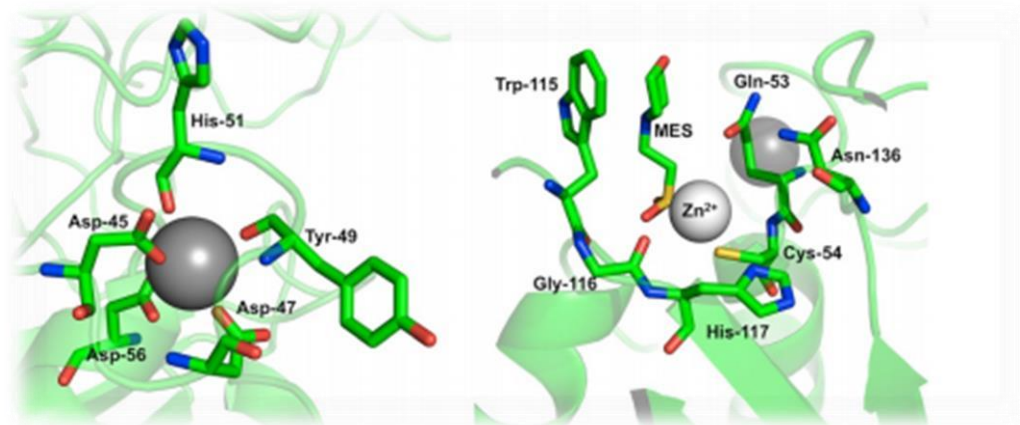
Fuente: Elaboración Propia con base en (Ramírez, 2016).

### **Dominios de unión a Pared Celular**

Becker *et al.* (2009) las endolisinas LysK, que contienen solo el dominio CHAP, lisan las células de *Staphylococcus aureus* en análisis de zimograma, lisis de placa y ensayos de reducción de turbidez, pero no tienen actividad detectable en un ensayo de concentración inhibitoria mínima (MIC). Una fusión del dominio CHAP con el dominio SH3B tiene una actividad lítica de LysK casi completa, sugiriendo la necesidad de un dominio de unión C-terminal. Se demostró que tanto LysK con el dominio CHAP como la fusión CHAP-SH3B lisan *S. aureus* y las cepas coagulasa-negativas.

La endolisina LysK derivada del fago estafilocócico K ha demostrado previamente tener dos dominios enzimáticos, uno de los cuales es una N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa y el otro una amidohidrolasa / peptidasa dependiente de cisteína / histidina denominada CHAPK. Este último, cuando se clona como una enzima truncada de dominio único, se sobre expresa convenientemente en una forma muy soluble. Esta enzima demostró ser altamente activa *in vitro* contra las suspensiones de células vivas de *S. aureus*.

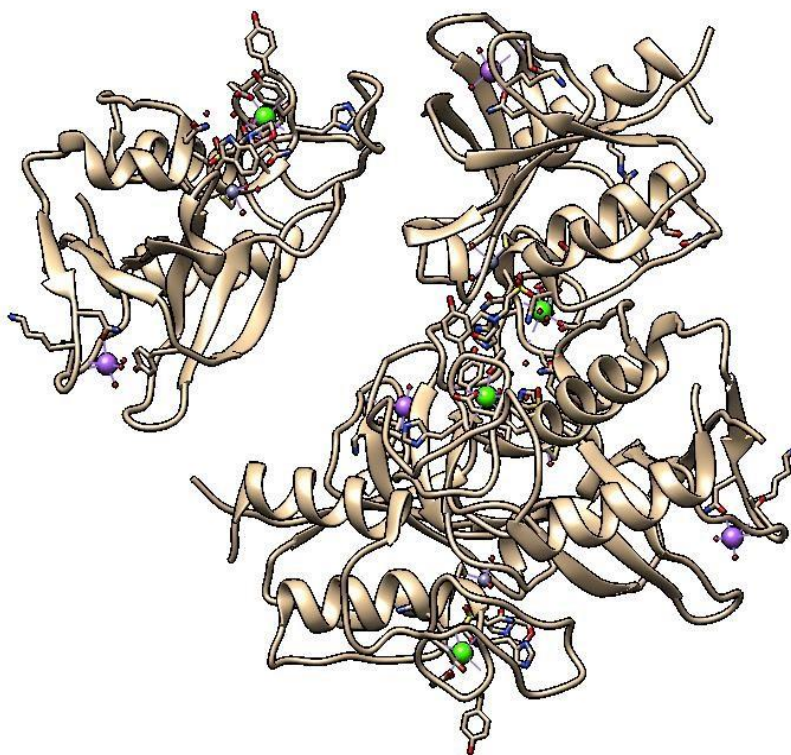
Ilustración 20. Estructura nativa del dominio lítico CHAPK de la endolisina LysK del bacteriófago K de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Base de Datos PDB

CHAP (K) contiene un lóbulo adicional en su dominio N-terminal, con un ion calcio en su estructura, coordinado por los residuos Asp45, Asp47, Tyr49, His51 y Asp56. La presencia de un ion de zinc (gris) en el sitio activo también fue evidente, coordinado por el residuo catalítico Cys54 y un posible sustrato análogo. La mutagénesis dirigida al sitio se usó para demostrar que los residuos implicados en la unión al calcio y en el sitio activo propuesto son importantes para la actividad enzimática. (Fenton et al; 2010)

Ilustración 21. Dominio Lítico CHAPK de la endolisina LySK



Fuente: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.

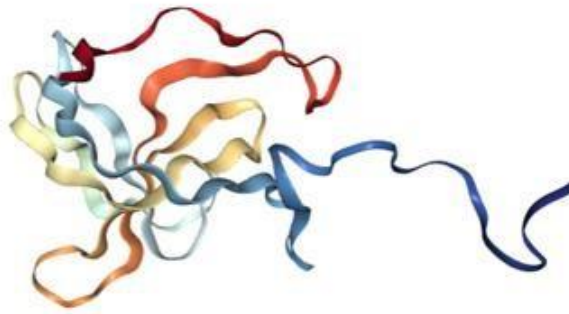
Benesík, Nováček, Janda, (2018) afirma:

“El fago K1 / 420 se usa para la terapia con fagos de infecciones estafilocócicas. La endolisina de estos mutantes designada LysF1, que consiste en un dominio N-terminal de cisteína-histidina dependiente de la aminohidrolasa / peptidasa (CHAP) y el dominio de unión a la pared celular SH3B C-terminal.LysF1 y sus dos dominios se prepararon como proteínas recombinantes y se analizó su función. LysF1 tuvo un efecto antimicrobiano en 31 especies de *Staphylococcus* de las 43 probadas. El dominio SH3b influyó en la actividad antimicrobiana de LysF1. Los resultados de un ensayo de

cosedimentación del dominio SH3b mostraron que era capaz de unirse a tres tipos de peptidoglucanos estafilocócicos purificados diferentes.”

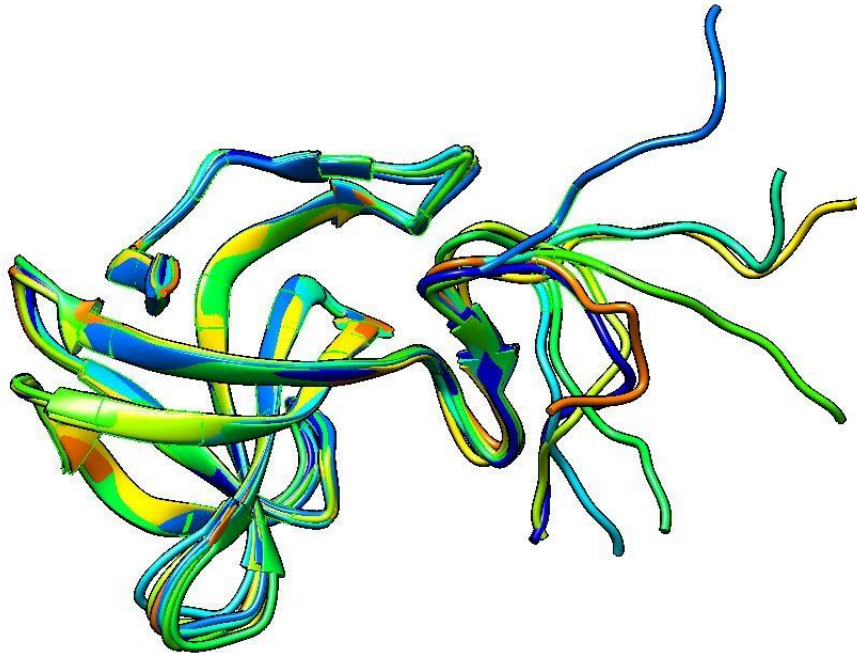
Como resultado el mutante de delección natural espontánea endolisina LysF1 tiene un amplio espectro lítico dentro de especies estafilocócicas. El dominio SH3B contribuye a la mayor actividad antimicrobiana de endolisina LysF1, el dominio SH3b mantiene una endolisina atada al PG. La endolisina LysF1 se puede utilizar para su alta actividad específica como enzibiótico frente a los más frecuentes especies patógenas de *Staphylococcus*, como *S. aureus*, *S. epidermidis*, pero también contra otros patógenos significativos tales como *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*.

Ilustración 22. Estructura de dominio LysF1 sh3b en PDB



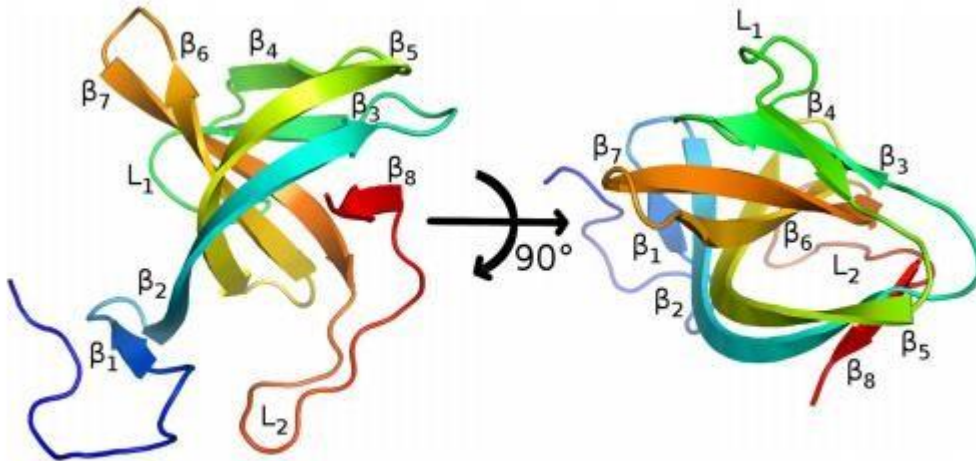
Fuente: Base de datos PDB (5O1Q)

Ilustración 23. Estructura de dominio LysF1 sh3b en Chimera



Fuente: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.

Ilustración 24. Estructura del dominio LysF1 SH3b con residuos coloreados de acuerdo a la secuencia N-terminal en azul y C-terminal en rojo

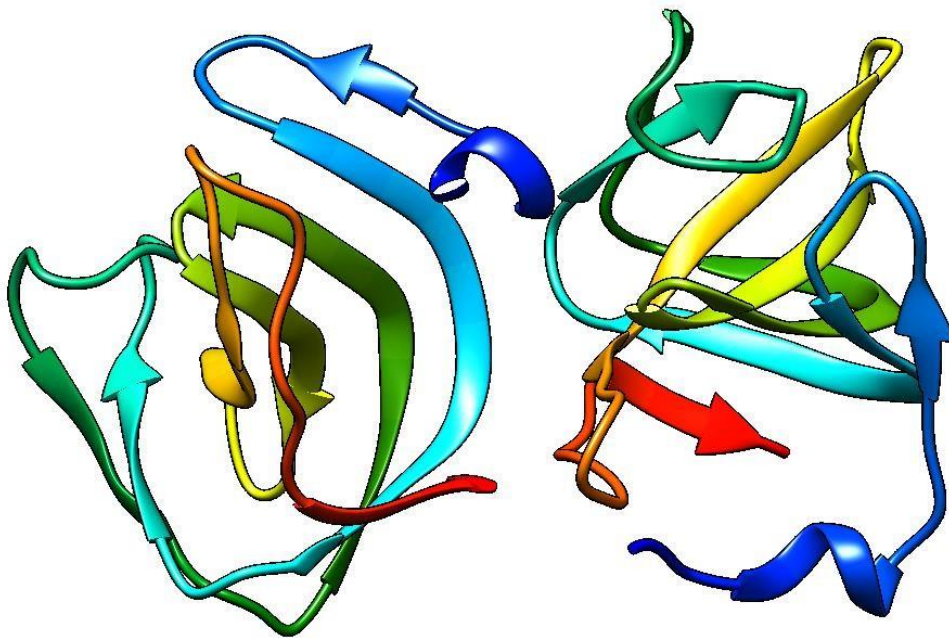


Fuente: Base de datos PDB.

Lu *et al.* (2006) ALE-1, un homólogo de la lisostafina, es una peptidoglucano hidrolasa que lisa específicamente las paredes celulares de *Staphylococcus aureus*. La unión de ALE-1 a células de *S. aureus* a través de sus restos C-terminales, conocido como el dominio de direccionamiento, es funcionalmente importante para la actividad estafilolítica. El dominio ALE-1 pertenece a la familia de dominios SH3b. La estructura de cristal de 1.75 angstroms del dominio de orientación muestra un plegamiento beta total similar a los SH3 típicos pero con características únicas, forma regiones superficiales que pueden interactuar potencialmente con algunas características comunes de la pared celular Gram-positiva. Los estudios de unión al dominio de ALE-1 que emplean varios peptidoglucanos bacterianos demuestran que la longitud del puente interpeptídico, así como la composición de aminoácidos del péptido, confiere la unión

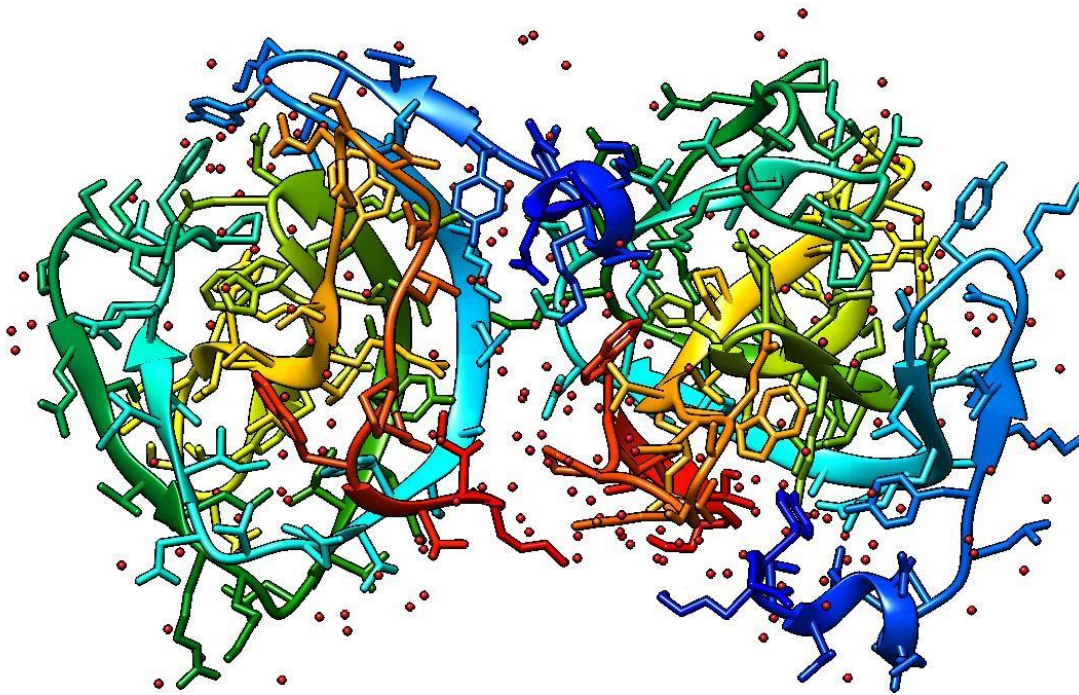
máxima del dominio de direccionamiento al peptidoglicano estafilocócico. El truncamiento de los primeros 9 residuos N-terminales altamente conservados confieren especificidad a la pared celular de *S. aureus*.

Ilustración 25. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de peptidoglucano hidrolasa ALE-1



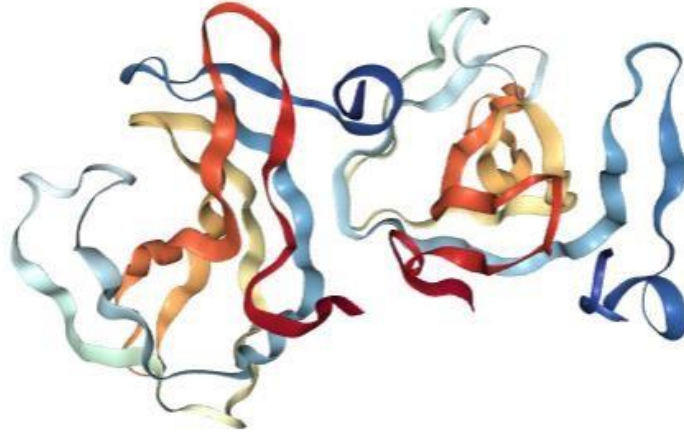
Fuente: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.

Ilustración 26. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de peptidoglicano hidrolasa ALE-1



Fuente: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.

Ilustración 27. Estructura cristalina del dominio diana de la pared celular de peptidoglucano hidrolasa ALE-1 en azul N-terminal y en rojo C-terminal.



Fuente: Base de datos PDB (1R77)

**Propuesta para el desarrollo de un enzibiótico quimera óptima para el tratamiento de infecciones bacterianas.**

**Proteínas ingenierizadas**

El estudio fundamental de la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas continúa siendo un campo muy activo de investigación. “El concepto de ingeniería de proteínas constituye un enfoque experimental cuya utilidad se manifiesta desde este nivel de generación de conocimiento fundamental” (Bolívar, 2004). Un investigador analiza la información de la cual dispone acerca de una proteína de interés, desde su secuencia de aminoácidos y la secuencia de otras proteínas

relacionadas evolutivamente, hasta la función descrita para la misma, las condiciones en que funciona, la estructura tridimensional de la misma, la identidad y posición en la secuencia de los aminoácidos que juegan un papel especialmente importante en la función de la misma.

Investigación basada en el análisis de los dominios funcionales de los enzibióticos y el uso de proteínas con funciones antimicrobianas pero con diferente modo de actuar a las endolisinas. Enzimas Lactoferrinas, las cuales secuestran hierro esencial en las bacterias para inhibir su desarrollo. Su fusión con dominios de unión a pared celular con actividad lítica, podría tener la finalidad de una doble función, aumentando el potencial de la enzima, además de referencia para posibles moléculas que sirvan en tratamientos futuros.

Las capacidades de las enzimas pueden mejorarse mediante métodos de ingeniería de proteínas. Estos métodos tienen la finalidad de generar variantes enzimáticas que sean aún más activas o duraderas, o que puedan actuar sobre sustratos diferentes al original o funcionar en condiciones diferentes a las que trabajan de manera fisiológica dentro de su organismo de origen. (Montes, 2008; Segovia, 2010).

Solamente un pequeño porcentaje de las enzimas con las que se trabaja en los laboratorios cuenta con datos estructurales. Por este motivo, es muy común tener datos de la secuencia primaria y secundaria de una proteína, pero no siempre se conoce la estructura terciaria. Esta información determina el método que se quiera aplicar para llevar a cabo el mejoramiento de una enzima (Martínez, Anaya y García, 2014).

La lactoferrina es una glicoproteína de unión a hierro de 80 kDa presente en la leche y en menor medida, en fluidos exocrinos como la bilis y las lágrimas. Consiste en un polipéptido monocatenario con dos lóbulos globulares y es relativamente resistente a la proteólisis. (Lönnnerdal y Iyer, 1995). La lactoferrina recombinante se obtiene de diversos sistemas de expresión. La “Food & Drug Administration, USA” (FDA) aprobó la aplicación de la lactoferrina recombinante humana (rhLf) (BioPharming) y de la lactoferrina bovina en spray (Ventures LLC) como nutracéutico y como antimicrobiano en carne de res cruda, respectivamente. La rhLf (Agennix) está en proceso clínico de pruebas para ser aplicada en el tratamiento de carcinoma renal, sepsis y úlceras de pie diabético. Otras aplicaciones potenciales de la lactoferrina están en proceso de evaluación para elaborar productos con efectos farmacológicos sustantivos. (Serrano, 2007).

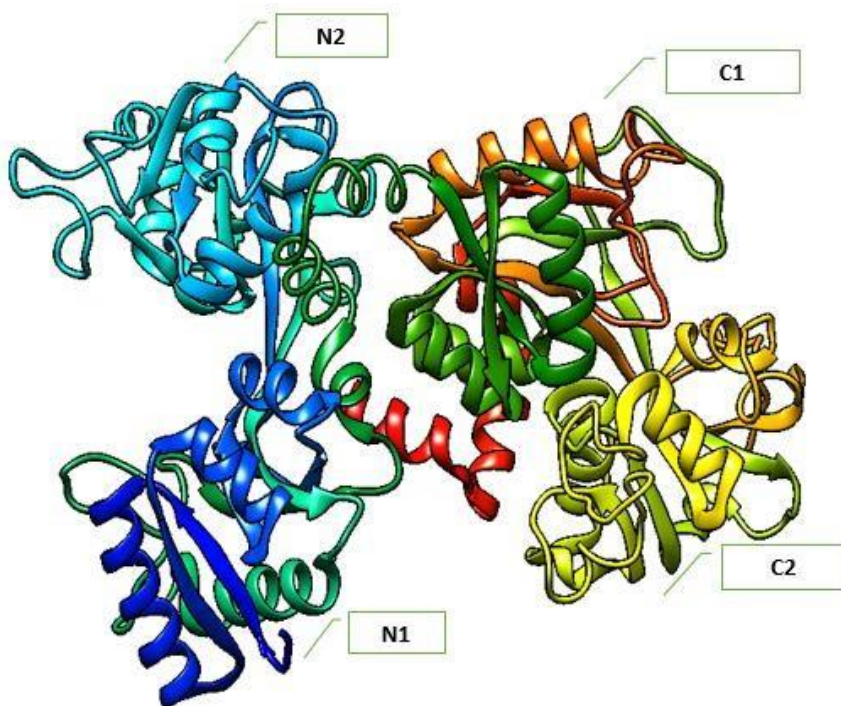
Baker, (2004) Afirma:

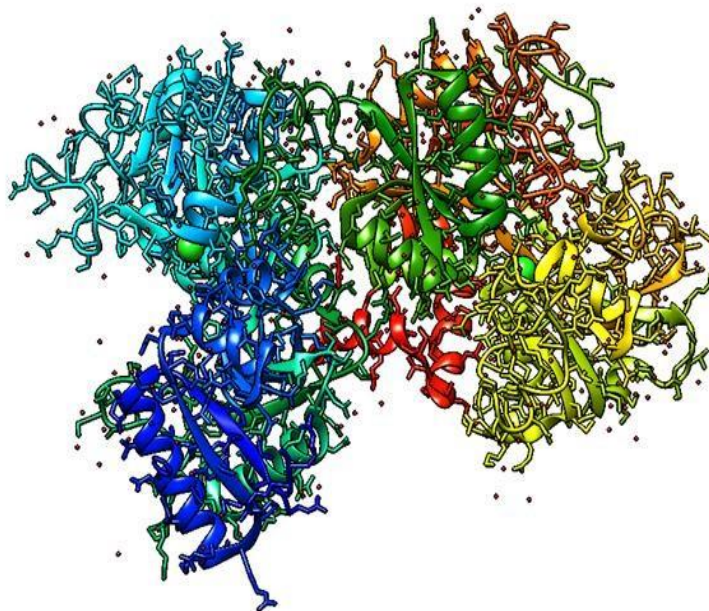
“En términos de su estructura tridimensional (3D), la molécula se pliega en dos dominios o lóbulos homólogos (lóbulos N y C) y cada uno se une a un único ion  $Fe^{3+}$  en una hendidura profunda entre dos dominios. Los sitios de hierro están altamente conservados y son altamente favorables para la unión del hierro. La unión y liberación del hierro se asocian a grandes cambios conformacionales en los que la proteína adopta estados abiertos o cerrados.”

### Estructura terciaria de la lactoferrina

En los dominios N2y C2 se ubican los sitios donde el ión  $Fe^{3+}$  y el  $HCO^-$  (bicarbonato) se alojan en forma sinérgica y reversible a la lactoferrina. Los cuatro aminoácidos que contribuyen en la formación del nicho de unión del  $Fe^{3+}$  son: un aspartato, una histidina y dos tirosinas. En el extremo terminal N1 reside la actividad antimicrobiana de la Lf (Lactoferrina) y donde se deriva la lactoferricina (Lfn). (Baker, 2004)

Ilustración 28. Estructura Terciaria de la lactoferrina.





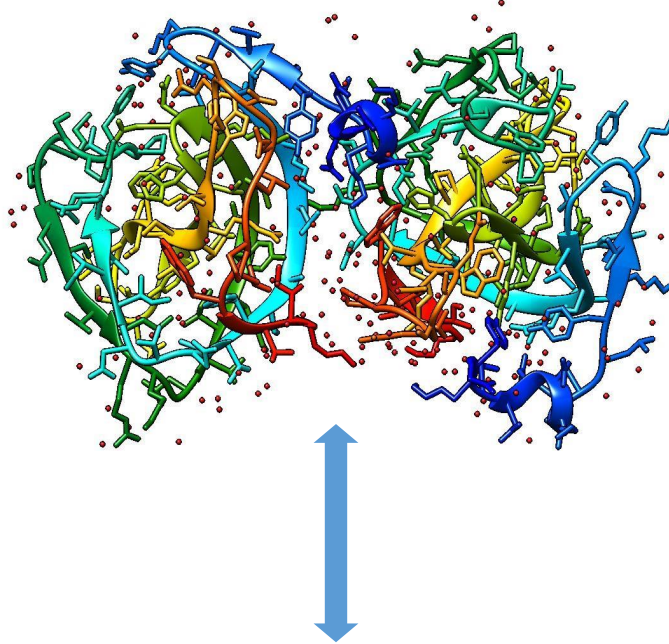
Fuente: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.

### **Proteína Fusión Propuesta: Lactoferrina con dominio ALE-1.**

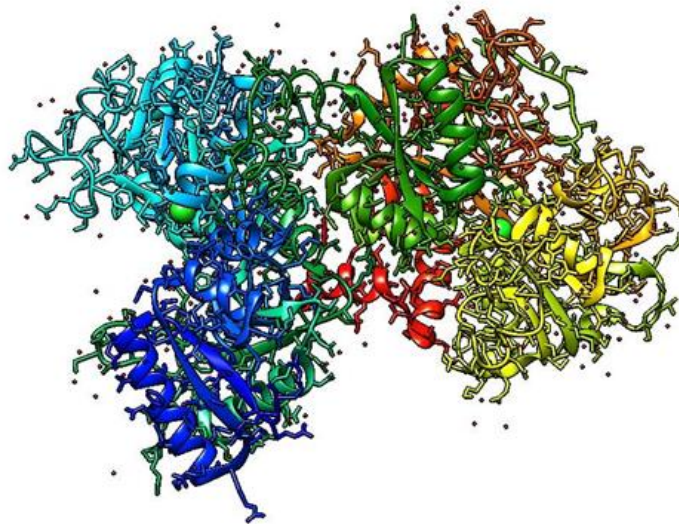
La enzima Lactoferrina tiene gran capacidad antimicrobiana, capaz de extraer el hierro de las bacterias, lo que genera que estos patógenos no puedan reproducirse. El dominio ALE 1 tiene una alta especificidad a la pared celular bacteriana, además de pertenecer a la familia de dominios SH3B, los cuales tienen una gran actividad lítica, por lo que la unión de ambos aumentaría el potencial antimicrobiano, afectando la bacteria con distintos mecanismos. En microorganismos como los Gram negativos que presentan alta resistencia bacteriana a antibióticos, debido a su membrana externa, la propuesta del enzibiótico fusión, podría dar como resultado, una mejor actividad destructiva frente a estos patógenos, lisando pared bacteriana y secuestrando hierro

esencial en estos microorganismos, disminuyendo de este modo problemas asociados a la falta de sensibilidad por parte de las bacterias a los antimicrobianos.

*Dominio diana de la pared celular de peptidoglucano hidrolasa ALE-1*



*Estructura terciaria de la lactoferrina*



## CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública a nivel nacional y mundial, el cual constituye una amenaza creciente para todos, independientemente de la edad, sexo y nivel socioeconómico. Este problema, se ha visto favorecido por el uso de antimicrobianos no sólo en clínica humana, sino en áreas como alimentaria y agricultura, entre otras.

Las opciones de tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos son cada vez más limitados, y de costos muy elevados, o en algunos casos, inexistentes, dado que estos pacientes suelen necesitar hospitalización, generalmente más prolongada, y su pronóstico es más desfavorable. Esto además conduce a una disminución de la calidad de vida y produce un aumento de los costos en materia de salud y asistencia sanitaria.

La especificidad, fuerte unión y potente actividad lítica de las enzimas líticas codificadas por fagos muestra que son inhibidores irreversibles, con una alta eficacia en pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales y con la ventaja de dejar la flora microbiana normal intacta.

Se muestra por medio de los resultados recopilados que nos encontramos ante una prometedora alternativa que resulta ser de gran utilidad, siendo la terapia antibacteriana en alimentos la más desarrollada, sola o combinada con antibióticos

convencionales, puede proporcionarnos un medio eficaz con el que hacer frente a la constante aparición de bacterias cada vez más resistentes.

Las aplicaciones de fagos para la salud humana son prometedoras, especialmente para las infecciones de la piel, oído interno y otras áreas donde los fagos se pueden aplicar directamente. Pero los tratamientos para los seres humanos han sido lentos en alcanzar el mercado. Debido a obstáculos reglamentarios, además del tiempo en estudios tanto en animales como en humanos donde se deben aprobar distintas fases de etapa clínica para el desarrollo de un nuevo tratamiento eficaz y seguro.

Los bacteriófagos constituyen una fuente natural muy rica de endolisinas potentes. La combinación de esta enorme diversidad natural con la creciente información del desarrollo de Ingeniería Genética y los dominios con alta actividad lítica, además del conocimiento de sus estructuras tridimensionales muestra un escenario favorable para encontrar o diseñar nuevas enzimas específicas para cualquier especie bacteriana patógena.

## **Recomendaciones**

Se debe tomar en cuenta que el problema de la resistencia es complejo y cambiante y que las bacterias pueden desarrollar o adquirir mecanismos de resistencia, por lo que es indispensable realizar un análisis constante de la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos en patógenos de importancia, esto en los Organismos de salud pública y privada, además de desarrollar más investigaciones para opciones de tratamiento nuevas en la lucha contra las infecciones bacterianas.

Sería recomendable aprovechar la gran diversidad que existe en las enzimas líticas para optimizar y desarrollar investigaciones que amplíen la información estructural de estas proteínas para abrir paso a caminos prometedores, en el diseño futuro de enzimas potenciales.

A nivel de Centro América, invertir en estudios Clínicos que ayuden a velar por la aprobación de enzibióticos como fármaco antimicrobiano, debido a que 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.

## Referencias

- Abedon S, Kuhl S, Blasdel B & Kutter E. (2011). Phage treatment of human infections pp 66-85.
- Adam, M. (2008). Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria, p 52.
- Ayala, M. (2017). Enzimas como antibióticos: Nuevas herramientas en la lucha contra infecciones. p 7.
- Basualdo J, Coto A y Torres R. (2006). *Microbiología Biomédica*, Buenos Aires, Atlante.
- Baker H. (2004). Lactoferrina y hierro: aspectos estructurales y dinámicos de la unión y liberación. *Annu Rev Nutr* 17 (3): Pp 209-16.
- Becker S , Dong S , Baker J , Foster J , Pritchard D , Donovan D,(2009) El dominio LysK CHAP endopeptidasa es necesario para la lisis de células estafilocócicas vivas. doi: 10.1111 / j.1574-6968.2009.01541.x.
- Benesík M, Nováček J, Janda L. (2018). Papel del dominio de unión de SH3b en un mutante por delección natural de Kayvirus endolisina LysF1 con un amplio rango de actividad lítica. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1507-2>.
- Bigwood T, Hudson J, Billington C, Smith G, Heinemann J. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol*. Pp. 400-406.

- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel A, Powell B, Carlton R, Merrill C. (2002). Bacteriophage Therapy rescues bacteremic mice from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus Faecium*. *Infect Immun*. Pp 204-210.
- Bochicchio S, Lievano T, Oechler F y Soberon M. (2009). Evolución: adquisición de resistencia a antibióticos en bacterias. p 2.
- Bolivar F. (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biología moderna. Pp 195-202.
- Boucher H, Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Rice L, Scheld M, Spellberg B & Bartlett J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Doi: 10. 1086 / 595011. Pp. 1-12.
- Borysowski J, Dabrowska B & Gorski A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Pp 366-367.
- Bueno E, Garcia P, Martinez B, Rodriguez A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 158 pp23-27
- Cabrera C, Gómez R y Zúñiga A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia médica*, 38(2).
- Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A & Brüßow H. (2003). *Prophage genomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), pp 238-276.

- Center for Adaptation Genetics and Drug resistance. (1998). The challenge of antibiotic resistance. Pp 46-53.
- Chabalgoity J, Pereira M y Rial A. (2008). Inmunidad contra los agentes infecciosos. p 104.
- Cheng Q, Nelson D, Zhu S, Fischetti VA. (2005) Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:111-117.
- Clokic M. (2009). Bacteriophages: methods and protocols. p158.
- Cires M. (2002). La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Revista Cubana Medicina General Integral* v.18 n.2 Ciudad de La Habana. p 1.
- Cortes L, Machado A y Hamilton M. (2010). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta medica*; 8(1) Pp. 17-23.
- Diez R. (2016). Enzibioticos: nueva arma en el ejército de los antimicrobianos, pp 2-3, Doi: [http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_RPC.2016.04.2](http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2016.04.2).
- Fenton M , Casey P ,Hill C ,Cormac G, McAuliffe O y Jim O. (2010). El fago truncada lisina CHAP k elimina *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales de los ratones. Doi. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13422>.
- Fischetti, V. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Grampositive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), Doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.002.pp 357-362.

- Flores B, Leal C y Escamilla S. (2014). Uso de antibióticos en adultos hospitalizados en el HGZ24, Instituto Mexicano de Seguro Social, p 4.
- Garcia, P, Martinez B, Obeso J & Rodriguez A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in applied microbiology*, 47(6), pp 479-485.
- Gerstmans, H., Rodríguez, L, Lavigne, R & Briers, Y. (2016). From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), Pp 123-128. DOI: 10.1042 / BST20150192.
- González, M.A. (2014). Resistencia epigenética de las bacterias a los antibióticos, pp. 31-36.
- Harbarth S, Theuretzbacher U & Hackett J. (2015). Antibiotic research and development: business as usual pp1604-1607. Doi: 10.1093/jac/dkv020.
- Hermoso J, García J & García P. (2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. Pp 461-467. Doi: 10.1016/j.mib.2007.08.002
- Hermoso J. (2008). Las enzimas líticas de los bacteriófagos (Enzibióticos): nuevas terapias contra las infecciones bacterianas. *Instituto de Química-Física "Rocasolano". CSIC, Madrid, España.*
- Ibarra S y Adid A. (2014). Tesis Doctoral, Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en hemocultivos realizados en el hospital Dr Julio villacreses colmont, Ecuador. Universidad Técnica de Manabí, p. 23
- Jalinas C. (2016). Resistencia bacteriana en cultivos de pacientes ingresados en el

Hospital Humberto Alvarado de Masaya en el periodo de enero de 2014 a enero de

2015

Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, Mgaloblishvili I, Tsilanadze G, Katsarava R, Morris J & Sulakvelidze A. (2005). The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure, (3) pp 23-26.

Kropinski A, Mazzocco A, Waddell T, Lingohr E & Johnson R (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages* pp. 69-76.

Lönnerdal B y Iyer S. (1995). Lactoferrina: estructura molecular y función biológica. 15: Pp 93-110.

Lopardo A, (2016). Aislamiento, caracterización y estudios de actividad de bacteriofagos líticos sobre *enterococcus spp* en modelos in vivo e in vitro. Pp 90-104

López A, Duret L, Gala Y, Tabares T, Fernández M, Pérez S. (2017). Los enzibióticos Como alternativa terapéutica contra las enfermedades Bacterianas. *MEDISAN*, 21(10), pp 3077-3083.

Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA y Portoles A. (2008). Velazquez,

Farmacología básica y Clínica, 18ª Edición, pp, 791-796.

- Lu J, Fujiwara T, Komatsuzawa H, Sugai M, Sakon J. (2006). El dominio de fijación a la pared celular de la endopeptidasa de glicilglicina distingue entre puentes cruzados de peptidoglucano. Pp.549-558
- Martinez C, Anaya C y García J. (2014). Ingeniería de proteínas para el mejoramiento de enzimas. *Revista Digital Universitaria*, 15(12).
- McCullers J, Karlström Å, Iverson A, Loeffler J, Fischetti V. (2007). Novel Strategy to Prevent Otitis Media Caused by Colonizing *Streptococcus pneumoniae*. 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030028>.
- McVay S, Velásquez M & Fralick A. (2007) Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. Pp 1934-1938.
- MedlinePlus (2018) Infecciones bacterianas, recuperado <https://medlineplus.gov/spanish/bacterialinfections.html>.
- Merril C, Scholl D, & Adhya S. (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(6), p 489.
- Mora J, (2012). Diferenciando bacterias Gram negativas y Gram positivas. Pp 25-26.
- Monk A, Rees C, Barrow P, Hagens S & Harper R. (2010). Bacteriophage applications: Where are we now? *Letters in applied microbiology*, 51(4), pp. 363-369.
- Muro A (2008). Pasa el futuro de la medicina por los antibióticos, párrafo 2 ,5.
- Nelson D, Loomis L, Fischetti VA: (2001). Prevention and elimination colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Sci USA*, 98:

Pp 4107-4112.

Nilsson A, (2014). Phage therapy constraints and possibilities. Pp 192-8. Doi 10.3109/03009734.2014.902878

Peña C. (2016). Nuevas alternativas para enfrentar a lo microorganismos infecciosos, pp 26-27.

Pirez M, Mota M. (2000). Morfología y estructura bacteriana. *Revista en internet*. vol 3, no 2, pp. 23-42.

Porter C, Schuch R, Pelzek A, Buckle A, McGowan S, Wilce M, Rossjohn J, Russell R, Nelson D, Fischetti VA, Whisstock J. (2007). The crystal structure of the catalytic domain of PlyB, a bacteriophage lysin active against *Bacillus anthracis*. *J Mol Biol*, 366: pp 540-550.

Quizhpe A. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana, Ecuador, p. 28

Ragland S. (2017). De la muerte bacteriana a la modulación inmune: ideas recientes sobre las funciones de la lisozima, Doi 10.1371/journal.ppat.1006512.

Ramirez B. (2016). *Aislamiento, caracterización y estudios de actividad de bacteriófagos líticos sobre enterococcus spp, en modelos in vivo e in vitro*. Trabajo de tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata.

Ronda, C, Vázquez M. y López R. (2016). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. p 18.

- Ruíz C, Dagmara M, García A, Barreal R, Jiménez A y Hernández N. (2002). Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 40(2), 79-88.
- Ruiz E. (2015). Tesis Doctoral, Epidemiología Molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus* spp. En centros sanitarios de Mallorca durante los últimos quince años, (1999-2013), pp. 15-17.
- Salas O. (2015). Alternativas Novedosas al uso de antibióticos para el control de infecciones bacterianas, Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología
- Segundo N, Hernández E, López O y Torres A. (2010). Bacteriophages as an alternative in the treatment of bacterial infection diseases (Phage Therapy). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Pp. 17-19.
- Serrano D. (2007). Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (3), Pp 30-38.
- Snyder L & Champness W. (2007). Lytic bacteriophages: genetic analysis and use in transduction. *Molecular Genetics of Bacteria*, pp 293-305.
- Uzcátegui U. (2016). Microbioma humano. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 76(1), 1-3
- Tijerino A, Jiménez A, Bolaños H, Chanto G, Acuña M, Vargas J, Sánchez L, Cháves E, Cordero E, Oropeza G, Campos E y Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología. (2011). Informe de vigilancia: Bacterias causantes de infecciones

comunitarias de importancia en salud pública y su resistencia a los antimicrobianos, Tres Ríos, Costa Rica: INCIENSA.

Tunkel A & Alpert W. (2018). Overview of Infectious Disease. The Merck Manual

The College of physicians of Philadelphia. (2018). El sistema inmunológico humano y las enfermedades infecciosas. p 2.

Veiga P. (2007). Enzibioticos una mirada al futuro, recordando el pasado. Párrafo 1,5.

Zerón, A. (2014). Genoma, microbioma y epigenoma humano. Una visión Contemporánea de la tríada ecológica. *Revista ADM*, 71(4).