



ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

**Discurso de ingreso
como Académico de Número**

**LOS ERZIBIOTICOS COMO AGENTES
TERAPÉUTICOS ANTIBACTERIALES
Y ANTIFÚNGICOS**

ILMO. SR. DR. TOMÁS GONZÁLEZ VILLA

**Discurso de contestación
ILMO. SR. DR. RAMÓN MARTÍNEZ PACHECO**



Santiago de Compostela, Septiembre de 2010

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso
como Académico de Número

**LOS ENZIBIOTICOS COMO AGENTES
TERAPÉUTICOS ANTIBACTERIANOS
Y ANTIFÚNGICOS**

ILMO. SR. DR. TOMÁS GONZÁLEZ VILLA

Discurso de contestación

ILMO. SR. DR. RAMÓN MARTÍNEZ PACHECO

© Universidade de Santiago de Compostela, 2010

Maqueta e Imprime
Imprenta Universitaria
Pavillón de Servizos
Campus Vida
15782 Santiago de Compostela

Dep. Leg.: C 2845-2010

TABLA DE CONTENIDO

PROLOGO	4
BREVE RESEÑA HISTÓRICA.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
ENZIBIÓTICOS ANTIBACTERIANOS	10
a) Bacteriófagos	10
b) Lisinas bacteriofágicas	20
c) Bacteriocinas.....	26
d) Lisozimas.....	29
e) Porinas	30
f) Holinas.....	32
g) Péptidos antimicrobianos (AMPs)	37
ENZIBIOTICOS ANTIFÚNGICOS	43
a) Quitinasas.....	45
b) Glucanasas.....	46
REFERENCIAS	48
DISCURSO DE CONTESTACIÓN	57

PRÓLOGO

Excmo. Sr. Presidente
Excmos. E Ilmos. Sres. Académicos
Sras. Y Sres.

Faltaría a la verdad si dijese que no considero un honor incorporarme a la Academia de Farmacia de Galicia por muy diversas razones, que incluyen los 27 años que llevo impartiendo docencia ininterrumpida de Microbiología en la Facultad de Farmacia de Galicia como Catedrático de esta Ciencia y anteriormente como Profesor Adjunto en la más joven Facultad de Farmacia de Salamanca.

En Mayo de 1968, coincidiendo con los acontecimientos que todos los lectores de mi edad recuerdan, decidí que tras acabar mis estudios de Preuniversitario comenzaría la carrera de Ciencias Biológicas en la Universidad de Salamanca, que en ese momento impartía docencia a la segunda promoción. Superada la prueba de madurez en Junio de ese año solicito el traslado de la Universidad de Oviedo (donde pertenecía el Instituto de Enseñanza Media de Astorga) a la de Salamanca y comienzo a cursar la carrera de Biología que culmino en Junio 1973 con la presentación de un trabajo de investigación sobre la estructura de la pared celular de levaduras así como de sus principales autolisinas (este tema al que fui introducido

por mi mentor Prof. Julio Rodríguez Villanueva será redundante a lo largo de mi carrera investigadora). En Septiembre de ese año consigo una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del MEC y me incorporo definitivamente al grupo del mencionado Profesor para la realización de la Tesis Doctoral en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca. Ese año de 1973 fue importante para mí, no solo por la beca, sino porque y a pesar de vivir en dos ciudades diferentes mi entonces novia y yo decidimos casarnos; esta unión ha permanecido hasta hoy. El 4 de Julio de 1976 defendí mi Tesis Doctoral sobre el tema de “Purificación, modo de acción e inmunología de las autolisinas de levaduras” obteniendo la calificación como es casi habitual de Sobresaliente cum laude por unanimidad.

En Septiembre de ese mismo año, aconsejado por el Prof. Rodríguez Villanueva y tras conseguir una beca del Comité Conjunto Hispano Norteamericano me traslado al Departamento de Food Science & Technology de la Universidad de California en Davis donde, bajo la supervisión del Profesor Herman Jen Phaff, iniciaré una estancia posdoctoral centrándome en temas de investigación relacionados con el estudio de carotenoides (principalmente astaxantina) de origen microbiano y con utilidad en alimentación como agente pigmentario y antioxidante. Asisto ya en aquellos años a las reuniones de Biotecnología en Asilomar (California), germen de la actual Biotecnología mundial. En Septiembre de 1978 regreso a España y me incorporo como Adjunto Interino al Departamento de Bromatología de la joven Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca bajo la dirección del Prof. Marín Font. En Abril de 1980 me presenté a oposiciones para ingresar en el Cuerpo de Profesores Adjuntos de Universidad, obteniendo el número uno y solicito como destino la mencionada Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Oposité sin éxito al Cuerpo de Profesores Agregados de Universidad en la Laguna y Bilbao y finalmente obtuve la Agregación de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela en Enero de 1983. Accedí a la Cátedra de Microbiología en Septiembre de ese mismo año en la misma Universidad, en virtud de la entrada en vigor de la Ley de Reforma Universitaria (LRU) desarrollando hasta la actualidad y de una manera ininterrumpida la misma responsabilidad.

En 1984 mi esposa obtuvo una plaza en el Hospital Provincial de Conxo, estabilizándose por tanto en Compostela y enseguida comenzaron a nacer nuestras tres hijas Clara, Beatriz y Silvia que lógicamente ayudaron a configurar y estructurar más si cabe esta unidad familiar.

Es en la Universidad de Santiago de Compostela y en su Facultad de Farmacia donde he desarrollado la mayor parte de mi actividad docente e investigadora. A mi llegada en Abril de 1983 me acogió tanto en el Departamento como en su casa el Profesor Benito Regueiro Varela, mi antecesor en la Cátedra de Microbiología de Microbiología durante muchos años, predecesor también en esta insigne Academia e íntimo amigo de mi maestro; por lo que mi incorporación a la Universidad Compostela estuvo gratamente facilitada. Tanto fue así que incluso la habitación que ocupé durante un año en el Colegio Mayor San Clemente pude obtenerla gracias a las gestiones de D. Benito.

Durante todos estos años se iniciaron y desarrollaron diversas líneas de investigación, como es el caso de “Biotecnología enológica de los vinos gallegos” con el desarrollo de una bodega experimental en la que se elaboran y se catan (a veces más de la cuenta) los experimentos positivos; “Biotecnología de cetocarotenos C40 y C50” para uso alimentario y antioxidante; “Clonación de genes de uso industrial FLO, PGU, CLT” etc para la producción de floculinas, pectinasas o proteasas queseras, incluidas las de origen animal, vaca, búfalo y camélidos así como de plantas cuajaleches de amplio uso en tiempos pretéritos en Europa y en particular en Galicia; “Mejora de cepas de levaduras enológicas mediante la heterotalización de cepas silvestres”; “Estudio de virus RNA de doble cadena que afectan a levaduras”; Estudio y control Microbiológico y Bioquímico de la Fermentación maloláctica en enología”, “Taxonomía de la Familia Bacillaceae y nuevos taxones adscritos a ella”; Clonación de proteasas de *Bacillus* para uso industrial” etc.

También y durante todos estos años han salido muchos discípulos que hoy ya desarrollan sus labores en las Universidades gallegas y otras del Estado así como del extranjero. Esta ha sido una labor verdaderamente gratificante pues no solamente les he enseñado sino que he aprendido de ellos en un proceso importante de retroalimentación.

Finalmente, desde aquí quiero agradecer a todos mis compañeros del Departamento de Microbiología y Parasitología por el apoyo prestado a lo largo de los años, a veces difíciles, como Director del Departamento, a mis discípulos algunos de los cuales y como ya he indicado son ya catedráticos e otros Universidades y países y por supuesto a mi esposa e hijas; sin todos ellos esta interesante aventura que ha sido la investigación en Universidades públicas a lo largo de 38 años no hubiese tenido sentido.

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Hace más de 100 años, en particular en 1896, el médico inglés, Hankin, describió que las aguas del río Ganges de la India poseían inexplicablemente propiedades antibacterianas (en concreto contra *Vibrio cholerae*) que se perdían simplemente por ebullición del agua; él sugirió la presencia de un “principio curativo” que nunca pudo identificar y por tanto no fue más allá de esta observación lo que ha pasado a la historia de la Microbiología. Cuando Twort y D’Herelle descubrieron el mundo de los virus bacterianos o bacteriófagos en 1915 y 1917 respectivamente, la primera observación de Hankin comenzó a tener explicación, en el sentido de que hoy sabemos que este río contiene un altísimo título de partículas fágicas que controlan de modo natural la dispersión del cólera en aquellas latitudes. Tan pronto aparecieron estos virus en el campo científico se comenzó a buscar su utilidad en la terapia antibacteriana. Así, D’Herelle y colaboradores, en particular el Dr Eliava (ruso de Georgia, fundador del Instituto que lleva su nombre, paisano de Joseph Stalin y ajusticiado por él por problemas de amoríos) aplicaron esta idea para controlar un brote de disentería bacilar en 1918 y tres años más tarde Bruynoghe y Masin para tratar lesiones estafilocócicas de piel (Fig. 1). Vemos por tanto que este tema es a la vez antiguo y moderno y en las siguientes páginas se tratará de describir y desarrollar varios aspectos relacionados con él, a la vez que de despertar el interés tanto del lector como del oyente.

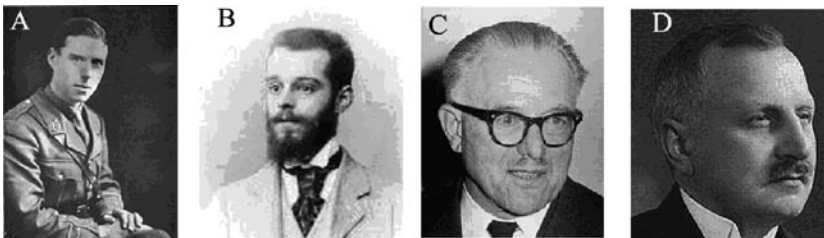


Figura 1

Padres de la terapia bacteriofágica, A) Un joven Frederick Twort; B) Un joven Felix D’Herelle; C) Joseph Masin y D) Richard Bruynoghe. Todos ellos junto con Ernest Hankin pueden considerarse como los padres de la moderna fagoterapia.

INTRODUCCION

El término “Enzibiótico” es en realidad la fusión de otros dos que son “Enzima” y “Antibiótico” acuñada no hace más de 6 años y que define a una amplia familia de enzimas que tienen la capacidad de interferir el desarrollo de microorganismos imitando de esta manera el modo de acción de ciertos antibióticos. Como se indicó anteriormente, tan pronto se descubrió el mundo de los virus bacterianos o “Bacteriofagos” y habiendo observado la capacidad que tenían de lisar los cultivos bacterianos, se trató de utilizarlos para el control de enfermedades infecciosas y hay que añadir que en varios casos con resultados ciertamente positivos. Se iniciaba por tanto por los años del Charleston del siglo pasado una etapa de nuevos principios antibacterianos muy prometedores, pero que sin embargo se vio truncada por el comienzo de la era de los antibióticos, después del descubrimiento y producción industrial de la penicilina (ver revisión en Sulakvelidze, 2005). Después del descubrimiento de esta β -lactama (Fleming 1929) y posteriormente todos los antibacterianos que salieron del grupo de Waksman: actinomicina, (Waksman y Woodruff, 1940), la estreptomina (Schatz, Bugie y Waksman, 1944), y la neomicina (Waksman y Lechevalier, 1949) y de la demostración de su actividad antibacteriana aplacó el interés por los bacteriófagos a la vez que se exploraba todo tipo de muestras como fuente de nuevos antibióticos (Tabla 1). En las pasadas décadas el número de antibióticos ha aumentado, pero en paralelo con el número de estirpes bacterianas resistentes a los mismos.

Tabla 1

Hitos en la quimioterapia antibacteriana

Año	
1929	Fleming descubre la penicilina
1935	Gerhard Domagk desarrolla la sulfonamida
1939	René Dubos descubre y purifica la gramicidina
1941	Comienza la comercialización de la penicilina en USA
1944	Comienza la era de los aminoglicósidos liderada por la estreptomina
1945	Edad de oro de los antibióticos
1945	Descubrimiento del cloranfenicol
1950	Descubrimiento de las tetraciclinas
1952	Macrólidos
1953	Se aíslan en Japón las primeras estirpes multiresistentes el bacilo de la disentería así como del bacilo de la tuberculosis
1956	Glicopéptidos
1957	Rifamicinas
1959	Nitromidazoles
1960	Aislamiento de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
1962	Quinolonas
1968	Trimetoprim
1980s	Las grandes compañías comienzan a paralizar los programas de búsqueda de nuevos antibióticos
2000	Lanzamiento del linezólido-nueva clase de agentes en 30 años-
2003	Lanzamiento de Lipopéptidos

Simultáneamente las grandes compañías han disminuido notablemente las subvenciones para la búsqueda de nuevos antibióticos (Talbot *et al.*, 2006) aduciendo entre otras razones que las ganancias son inferiores a las producidas por drogas antihipertensivas, tratamiento de desordenes del corazón o mentales y a la fusión empresarial que genera un coste de mantenimiento sustancialmente inferior. Baste añadir que en el año 2000 la asociación amoxicilina-clavulonato fue el único antibiótico en la lista de los 20 fármacos más prescritos (Kreling *et al.*, 2001). Debido a todo esto, el número de nuevos antibióticos es cada vez más escaso y si a esto añadimos el incremento de las multiresistencias bacterianas, el panorama comienza a ser desolador para la terapia antibacteriana basada en el uso de un solo antibiótico, que a su vez es el concepto heredero de aquel contenido en

“la bala mágica” de Erlich. Las multiresistencias pueden adquirirse básicamente por dos mecanismos: bien como resultado de acontecimientos genéticos que causan variaciones en el genoma bacteriano o por transferencia horizontal entre grupos de organismos que implica una rápida acumulación de resistencias en un sola estirpe bacteriana (Livermore, 2003). De esta manera se ha llegado a la situación actual en que el 60 % de las infecciones nosocomiales están causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, o a que el 30% de las estirpes circulantes de *Streptococcus pneumoniae* sean resistentes a penicilina. También han aumentado muy significativamente las estirpes resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* así como *Enterococcus faecalis*. Estos fenómenos de resistencia representan no solamente un problema de salud sino también económico con un costo estimado de 3500 millones de euros por año (Workshop Summary, 1998). Tanto la Unión Europea como los EEUU así como organizaciones internacionales (OMS) han venido estableciendo una serie de directrices desde 1999 para tratar de atajar este problema, pero sin éxito, debido en su mayor parte a la propia génesis de las estirpes resistentes.

ENZIBIOTICOS ANTIBACTERIANOS

a) Bacteriófagos

Los bacteriófagos son los agentes biológicos más abundantes del planeta y están presentes en todos los ambientes aunque es en el medio hídrico donde están en mayor profusión. Los estudios pioneros (Tabla 2) sobre el uso de bacteriófagos como utensilios terapéuticos arrojaron resultados positivos en algunos casos, pero en otros bastante ambiguos, debido al pobre conocimiento que se tenía de la ecología tanto de los bacteriófagos como de las bacterias; a la selección incorrecta de los bacteriófagos para llevar a cabo la terapia; al uso de bacteriófagos únicos par el tratamiento de síndromes causados por más de una bacteria; a la aparición de estirpes bacterianas resistentes a bacteriófagos; a la incorrecta dosificación y administración de los bacteriófagos en los preparados farmacéuticos; a la incorrecta identificación del agente causal de la enfermedad y finalmente a la falta de conocimiento sobre la liberación de endotoxinas como resultado de la lisis bacteriana. Todos estos aspectos hoy son conocidos y se resuelven con relativa facilidad. No obstante la terapia bacteriofágica antibacteriana tiene todavía limitaciones como es el rango de huésped del propio bacteriófago que en algunos casos puede ser tan estrecho como el de específico de especie y en algunos casos de estirpe. Es también necesaria la identificación

previa del agente causal de la enfermedad, la esterilización de la preparación bacteriofágica sin afectar a su viabilidad, la respuesta inmune del huésped a la terapia bacteriofágica y finalmente a la propia farmacocinética (Hermoso *et al.*, 2007).

Tabla 2

Primeras aplicaciones de terapias bacteriofágicas

Tratamiento de	Autor
<i>Vibrio cholerae</i>	Hankin 1896
<i>Staphylococcus</i> y <i>Bacillus anthracis</i>	Bruynoghe y Maisin 1921
Disentería bacilar	Beckerich y Hauduroy 1922
Fiebres tifoideas y paratifoideas	Beckerich y Hauduroy 1922
Pielonefritis	Courcoux 1922
<i>Staphylococcus aureus</i>	Spence y McKinley 1924
<i>V. choleare</i>	Morrison 1932

No todos los bacteriófagos pueden usarse en la terapia. De las dos grandes clases, líticos y lisogénicos (Fig. 2) sólo los pertenecientes al primer tipo

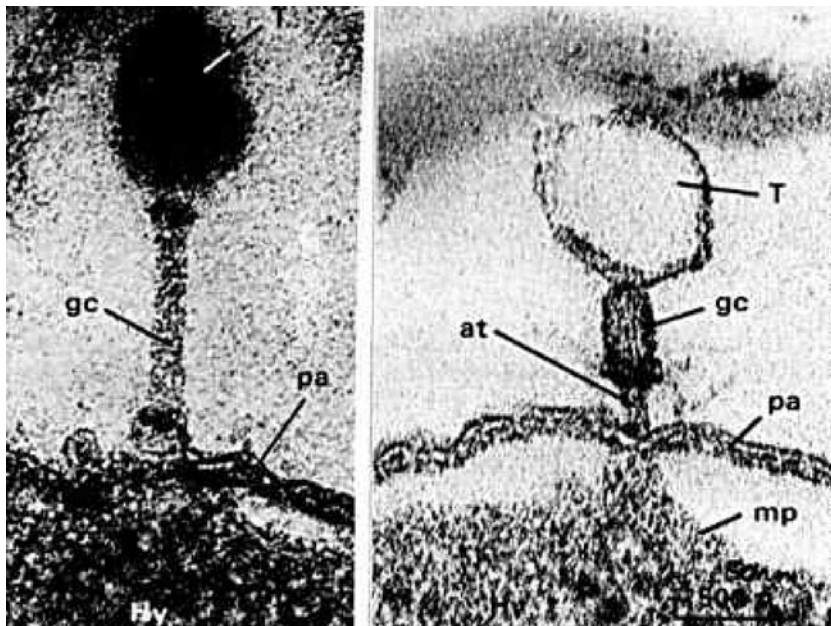


Figura 2

Bacteriófago inyectando el contenido de su cabeza en una célula bacteriana.

son en principio buenos candidatos para su uso. Los segundos, al integrar su genoma en el de la bacteria, sin matarla, pueden incluso transferir genes que incrementen la virulencia bacteriana.

En el caso de aparición de fenómenos de resistencia bacteriana a bacteriófagos, ésta puede resolverse más fácilmente que la resistencia a antibióticos ya que basta con cambiar uno o dos genes del virus para resolver el problema. Experimentos recientes han mostrado que la velocidad de mutación que generan este tipo de resistencias es del orden de $1-4 \times 10^{-8}$ que como se ve es una velocidad sensiblemente inferior a la que genera aparición de resistencias a antibióticos.

Como en este tipo de terapia las células diana (bacteria) y el agente agresivo (virus) presentan una unión muy específica sobre receptores ausentes en las células del cuerpo humano, los efectos secundarios son menores que en antibioterapia convencional. Por otra parte la flora normal no se ve apenas afectada por este tipo de terapia, incluso cuando a los voluntarios se les suministra una mezcla de hasta 4 bacteriófagos (Buttin y Brussow 2005). También es posible combinarlos con bifidobacterias para el tratamiento de disentería en pacientes leucémicos inmunocomprometidos; de esta manera los bacteriófagos destruyen el patógeno y las bifidobacterias restauran parte de la flora normal (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Puede argüirse y no sin razón, que en ciertas bacteriólisis los efectos colaterales, debido a moléculas tóxicas bacterianas, son iguales en la antibioterapia convencional y en la bacteriofágica, pero ya han comenzado a desarrollarse nuevas estirpes virales que matan a las bacterias pero no las lisan (Westwater *et al.*, 2003) en lo que constituye una solución elegante para eliminar bacterias productoras de toxinas como es el caso de las especies del género *Clostridium*.

Una de las mayores críticas para la terapia basada en bacteriófagos es la necesidad de identificación previa del agente causal de la enfermedad antes de que pueda iniciarse el tratamiento y en infecciones agudas el tiempo es lo que no sobra. Es cierto que ciertos bacteriófagos presentan un rango de huésped muy estrecho, pero en otros es el caso contrario, por lo que a ser posible debe potenciarse su uso. Si a esto se unen las nuevas tecnologías de identificación bacteriana que en cuestión de horas, cuando no de minutos nos permiten una razonable identificación de la bacteria, está claro que esta crítica puede quedar sin efecto en poco tiempo. De hecho la FDA ya ha aprobado el uso de una mezcla de bacteriófagos para el control de *Listeria monocytogenes* en carnes preparadas y derivados avícolas (Fischetti 2006).



Figura 3

Absceso nasal bacteriano, antes y después de la terapia bacteriofágica contra *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 3 y las Figuras 3 y 4 puede apreciarse, por una parte, un número relevante de casos tratados mediante la terapia bacteriofágica, así como unas imágenes que apoyan su utilización en determinados procesos



Figura 4

Aspecto de herida de miembro inferior antes y después de la terapia bacteriofágica contra clostridia

infecciosos. Los bacteriófagos más utilizados corresponden a la familia *Myoviridae*, conocidos desde el principio de la virología por su gran poder lítico frente a muchas bacterias, otro grupo también importante desde el punto de vista de su empleo frente a enfermedades bacterianas de transmisión hídrica es la Familia *Siphoviridae* de bacteriófagos. Los bacteriófagos tanto DNA como RNA de cadena sencilla (vg. ϕ X174, ó Q β , respectivamente) a pesar de que apriorísticamente deberían ser los candidatos ideales por poseer ciclos exclusivamente líticos, muy productivos y de corta duración, apenas si se han utilizado en la terapia antibacteriana.

Presumiblemente en los próximos años y cuando finalmente se haya asentado esta nueva etapa de lucha biológica contra la enfermedad serán incorporados como nuevos desarrollos. La utilización de partículas bacteriofágicas no está limitada exclusivamente a su uso como principios activos, sino que pueden ser utilizadas para vectorizar vacunas de DNA o péptidos inmunogénicos. Muchos bacteriófagos poseen elegantes modelos de inyección del contenido en sus cabezas (Fig. 2).

Una problemática importante asociada a la terapia bacteriofágica es la farmacotecnia de las preparaciones utilizadas; en primer lugar la forma de mantenimiento de los mismos, de modo que mantengan la mayor actividad biológica fue un reto hoy resuelto por una de las técnicas más sencillas como es la liofilización, pues mantienen durante varios años su viabilidad (Brussow, 2005).

Otro aspecto importante que hay que tener en cuenta es cómo los bacteriófagos alcanzan a la bacteria cuando ésta ya está asentada en el cuerpo. Experimentos realizados con ratones y pollos indican que los bacteriófagos atraviesan perfectamente la barrera hematoencefálica (Barrow *et al.*, 2998) y por supuesto son mucho más efectivos que los antibióticos para alcanzar su diana en regiones pobremente irrigadas. Los bacteriófagos son también capaces de alcanzar a los patógenos intracelulares como es el caso de *M. tuberculosis* y *M. avium* de modo que infecciones experimentales por estos patógenos han respondido muy bien a la terapia bacteriofágica (Broxmeyer *et al.*, 2002). Estos organismos son sin embargo completamente ineficaces contra esporas bacterianas, por ser formaciones durmientes protegidas por el cortex, estructura altamente impermeable a todo tipo de sustancias.

Tabla 3
Lista de las principales aplicaciones terapéuticas con bacteriófagos en países del Este Europeo

Diagnóstico Clínico	Etiología	Recuperación total	Mejoramiento manifiesto	Sin efecto
Septicemia	<i>Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	93 (87.7%)	8 (7.5%)	5 (4.7%)
Otitis purulenta	<i>S. aureus, Klebsiella, Pseudomonas</i>	28 (88.4%)	3 (9.09%)	2 (6.06%)
Meningitis purulenta	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	10 (100%)		
Úlceras varicosas de Extremidades inferiores	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	47 (61.03%)	21 (27.2%)	9 (11.6%)
Bronquitis crónica mucopurulenta, laringitis, rinitis	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	224 (82.6%)	46 (16.9%)	1 (0.3%)
Bronconeumonía enfsema	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	47 (82%)		10 (18%)
Pleuritis con fistula	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	42 (86%)	5 (10%)	2 (4%)
Peritonitis supurativa	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas</i>	60 (91%)	5 (8%)	1 (0.15%)

Tabla 3
Lista de las principales aplicaciones terapéuticas con bacteriófagos en países del Este Europeo (continuación)

Diagnóstico Clínica	Etiología	Recuperación total	Mejoramiento manifiesto	Sin efecto
Infecciones urinarias	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	59 (75.6%)	9 (11.5%)	10 (12.8%)
Furunculosis	<i>S. aureus</i>	90 (100%)		
Decubitus con infección	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	13 (81%)		3 (19%)
Artritis piogénica y miositis	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	17 (89%)		2 (11%)
Osteomielitis de los huesos largos	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	38 (95%)	2 (5%)	
Fracturas con Osteitis supurativa	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	37 (90%)	4 (10%)	
Infecciones en quemados	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>	42 (86%)	7 (14%)	
Infecciones postoperatorias	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>	2 (83%)	6 (17%)	

Tabla 3
Lista de las principales aplicaciones terapéuticas con bacteriófagos en países del Este Europeo (continuación)

Diagnóstico Clínica	Etiología	Recuperación total	Mejoramiento manifiesto	Sin efecto
Fístulas crónicas supurativas	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	168 (93%)	12 (7%)	
Sinusitis supurativa	<i>S. aureus, E. coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas</i>	38 (83%)	3 (7%)	5 (11%)
Mastitis purulenta	<i>S. aureus, E. coli</i>	41 (93.1%)	3 (6.8%)	
Total		1123 (85.9%)	134 (10.2%)	50 (3.8%)

Aparte de los intentos iniciales en los años veinte y treinta del siglo pasado de producir y poner en las farmacias preparados de bacteriófagos para el tratamiento sobre todo de afecciones intestinales, de un modo más reciente he de indicar que en EEUU y en concreto en el Estado de Tejas se ha regularizado el uso de este tipo de preparados para el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por estirpes multiresistentes a antibióticos (Clark y March 2006). También se han desarrollado parches biodegradables impregnados con bacteriófagos para el tratamiento de infecciones crónicas. La compañía Internacional de Fagos (CIF) ha desarrollado un producto al que denominan PhagoBioDerm compuesto por bacteriófagos, antibióticos y enzimas proteolíticas que usan tanto para la profilaxis como para el tratamiento. El producto en cuestión mostró resultados muy prometedores en el tratamiento de úlceras de difícil curación por la pobre irrigación (Fig. 4) así como en la erradicación de cepas multiresistentes de *S. aureus* en pacientes con graves lesiones de piel (Jikia *et al.*, 2005) y en el tratamiento de la enfermedad periodontal (Shishniashvili 1999). Es a mi juicio éste uno de los aspectos más interesantes del uso de los bacteriófagos como agentes terapéuticos, es decir su asociación con antibióticos, donde podremos en un futuro próximo exprimir todo su potencial profiláctico y terapéutico.

Al contrario que los países occidentales, los países del Este apostaron desde los años 30 del siglo pasado por este tipo de terapia y sin duda son pioneros en el desarrollo de preparados basados en los bacteriófagos, baste decir que los soldados rusos y otros de su área de influencia portan en sus macutos sprays con una preparación multifágica contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, y *Proteus vulgaris*; esto convierte sin duda alguna al ejército ruso en el principal consumidor de bacterifagos de todo el mundo.

Tengo que indicar, sin embargo, que uno de los principales miedos entre no expertos tiene que ver con la seguridad de uso de los bacteriófagos y en concreto con la posibilidad de que interaccionen con nuestras células o incluso integren sus genes en nuestro genoma. Frente a esto me atrevo a recordar que los humanos estamos expuestos a los bacteriófagos desde el mismo momento del nacimiento (y probablemente antes) y que los consumimos constantemente tanto en aguas (las aguas libres de contaminación contienen hasta 2×10^8 bacteriófagos por mL) como en alimentos (yogur, quesos, sauerkraut, salami etc), se encuentran de un modo natural en la piel, boca, orina y otras partes del cuerpo (Bachrach 2003) y son inocuos

para nosotros, son enemigos naturales de las bacterias y nosotros lo único que hacemos en esta estrategia bacteriofágica es “**SER AMIGOS DE LOS ENEMIGOS DE NUESTROS ENEMIGOS**”.

Los ensayos en humanos sobre el efecto de los bacteriófagos en la salud de seres humanos en un país occidental se han llevado a cabo en EEUU (Staphage Lysate, Delmont Laboratories, Swarthmore, PA), que fueron administrados tópicamente o intranasalmente, además de por vía oral, subcutánea o intravenosa. Después de dos años de ensayos ininterrumpidos solamente se observaron pequeños efectos secundarios (Sulakvelidze y Kutter, 2005). De igual manera en el Instituto de Inmunología de Medicina Experimental de Polonia, se ensayaron distintas rutas de administración descartando la intravenosa y manteniendo como óptimas cualquiera de las anteriores, incluida ahora la rectal para el tratamiento de cuadros diarreicos o disintéricos (Slopek *et al.*, 1983; Weber-Dabrowska *et al.*, 1985). Resumiendo parte de lo que antecede, puede decirse que el mayor problema asociado a la reintroducción de la terapia fágica es la propia biología de los bacteriófagos, pues su acción depende de que se repliquen en el lugar correcto. Desde luego, el alarmante aumento de las multiresistencias bacterianas y la concienciación social para el no uso de antibacterianos en preparado alimenticios apoya esta reintroducción, probablemente a través de la asociación con antibióticos convencionales. El uso de bacteriófagos tiene varias ventajas, a saber: son unidades autoreplicativas; se replican solamente en el lugar de la infección que es donde se ubican las bacterias patógenas, con lo que se garantiza una máxima dosis de agente antibacteriano en el lugar donde se necesita; son más específicos que los antibióticos y por tanto no causan, o lo hacen en mucho menor escala, daño a la microbiota normal del huésped; producen pocos efectos secundarios; son una buena alternativa para pacientes alérgicos a antibióticos; los costes de producción son bajos; pueden utilizarse con fines profilácticos; se pueden suministrar por rutas muy diferentes; poseen efectos sinérgicos con los antibióticos convencionales y finalmente la búsqueda de bacteriófagos nuevos es algo rápido y económico, por supuesto mucho más que la de nuevos antibióticos (Tabla 4)

Tabla 4

Comparación del uso terapéutico de bacteriófagos frente a antibióticos

Bacteriófagos	Antibióticos	Comentarios
Muy específicos, por tanto no hay disbiosis ni infecciones secundarias	Afectan tanto a patógenos como no patógenos. Hay disbiosis y riesgo de infecciones secundarias	Al ser proceso específico, requiere identificación previa del microorganismo, los antibióticos no.
Se replican en el lugar de la infección, donde más se les necesita	No se concentran necesariamente en el lugar de la infección	Los bacteriófagos requieren menos dosis que los antibióticos
No se detectan efectos secundarios	Múltiples efectos secundarios incluidos desórdenes intestinales (candidiasis etc.)	Pueden presentarse efectos ligados a la liberación de LPS durante la lisis
Las bacterias resistentes a fagos permanecen sensibles a otros fagos	La resistencia no se restringe a bacterias patógenas solamente	Los antibióticos seleccionan resistentes indiscriminadamente
La selección de nuevos fagos es sencilla y muy rápida	La selección de nuevos antibióticos es compleja y lleva mucho tiempo	Siempre habrá fagos frente a bacterias multiresistentes

b) Lisinas bacteriofágicas

Como se ha indicado con anterioridad el término “enzibiótico”, inicialmente acuñado para incluir enzimas codificados por bacteriófagos que mostraban actividad antibacteriana, hoy se ha ampliado para toda clase de enzimas que independientemente de su origen presentan actividad antibacteriana y/o antifúngica e incluso antiviral. Otros nombres utilizables pueden ser enzimas líticos, hidrolasas de peptidoglucano o quitinasas y 1,3-β-D-glucanasas para el caso de los hongos (veremos más adelante que esta separación se debe más a la deformación profesional de los microbiólogos de microorganismos eucarióticos que a una realidad que sustancie en términos evolutivos a la separación de ambos grupos, pro y eucarióticos, como algo completamente diferente y separable). Estas hidrolasas, al actuar sobre los polisacáridos estructurales de la pared celular (peptidoglucano, quitina y 1,3-β-D-glucano) originan lisis hipotónica que resulta en la destrucción física de los microorganismos; todas ellas pueden obtenerse de los bacteriófagos o de las propias bacterias. Además, debemos incluir tanto por razones históricas como por su efectividad, a las diversas lisozimas hoy reconocidas en la bioquímica (Tabla 5).

Tabla 5

Tipos actuales de Enzibióticos disponibles frente a bacterias Gram positivas

Nombre del enzibiótico	Clase	Fuente	Especificidad enzimática	Rango antibacteriano	Referencia
PlyC	Lisina	fago CI	Amidasa	<i>S. pyogenes</i> , estreptococos, grupos C y E	Nelson <i>et al.</i> , 2006
Pal	Lisina	fago Dp-I	Amidasa	<i>S. pneumoniae</i>	Loeffler <i>et al.</i> , 2001
Cp1-I	Lisina	Fago Cp-I	Muramidasa	<i>S. pneumoniae</i>	Loeffler <i>et al.</i> , 2003
PlyGBS	Lisina	fago NCTC 11261	Endopeptidasa muramidasa	<i>S. agalactiae</i> , estreptococos grupos A, C, G, L	Cheng <i>et al.</i> , 2005
Fage B30 lysin	Lisina	fago B30	Endopeptidasa muramidasa	<i>S. agalactiae</i> , estreptococos grupos A, B, C, E, G, <i>E. faecalis</i>	Baker <i>et al.</i> , 2006
LambdaSal profago Lisina	Lisina	profago LambdaSal	Endopeptidasa	?	Pritchard <i>et al.</i> , 2007
LambdaSa2 profago Lisina	Lisina	Profago LambdaSa2	Endopeptidasa glucosaminidasa	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , grupo E estreptococo, <i>S. equi</i> , grupo G estreptococo, <i>S. agalactiae</i>	Pritchard <i>et al.</i> , 2007
PlyG	Lisina	fago γ	Amidasa	<i>B. anthracis</i>	Schuch <i>et al.</i> , 2002
PlyL	Lisina	profago λ Ba02	Amidasa	<i>B. cereus</i> <i>B. anthracis</i>	Low <i>et al.</i> , 2005
PlyPH	?	?	?	<i>B. anthracis</i>	Yoong <i>et al.</i> , 2006
PlyB	Lisina	fago Bcpl	Muramidasa	<i>B. anthracis</i>	Porter <i>et al.</i> , 2007
PlyI18	Lisina	fago A118	Peptidasa	<i>Listeria</i>	Loessner <i>et al.</i> , 2002
Ply500	Lisina	fago A500	Peptidasa	<i>Listeria</i>	Loessner <i>et al.</i> , 2002
Ply3626	Lisina	fago \emptyset 3626	Amidasa	<i>C. perfringens</i>	Zimmer <i>et al.</i> , 2002

En vista del constante aumento de las resistencias a antibióticos tanto en el mundo procariótico como eucariótico, la característica más interesante de los enzibióticos es su modo de acción, que teniendo como diana la misma que la de los antibióticos más clásicos e importantes como son las β -lactamas, en lugar de interferir con su síntesis, catalizan su destrucción, con lo que el objetivo final es el mismo (Borysowski *et al.*, 2006). Otro aspecto interesante de estas enzimas líticas es la baja probabilidad de que se desarrollen resistencias, incluso en casos bien documentados el desarrollo de resistencia a un enzibiótico conlleva la reducción de virulencia (Kusuma *et al.*, 2007).

Las lisinas o endolisinas están codificadas principalmente por bacteriófagos con DNA bicatenario e hidrolizan los enlaces covalentes del peptidoglucano para favorecer la liberación de la progenie viral que por cientos o miles se produce en cualquier ciclo lítico productivo (Young *et al.*, 2000). El término “endolisina” fue introducido en la literatura científica por Jacob y Fuerst en 1958 para hacer hincapié en las lisinas que actuaban desde dentro de la célula y según esto los enzibióticos al actuar desde fuera deberían ser denominados simplemente como “lisinas”. También se ha propuesto el término de “virolisina” para indicar su origen viral (Parisien *et al.*, 2008) pero el término se emplea en raras ocasiones.

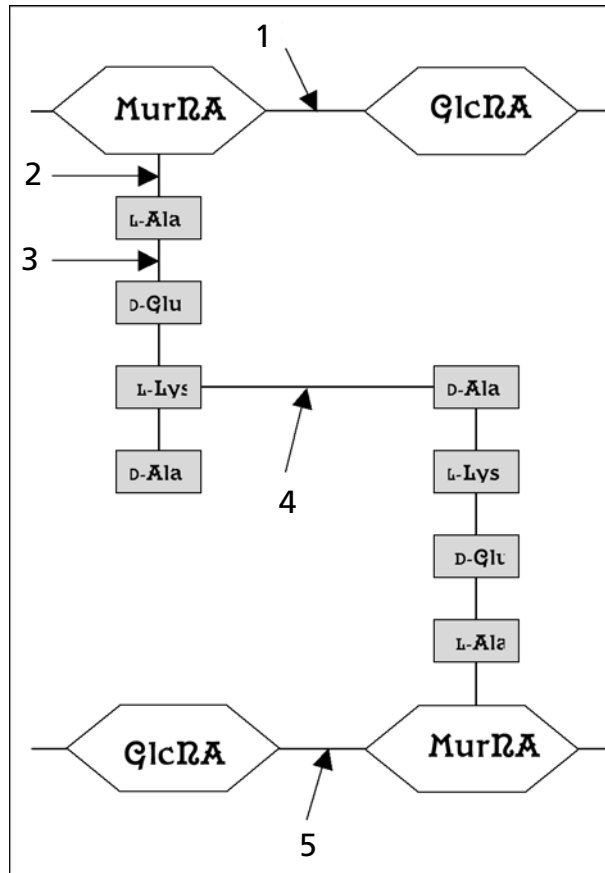
La ruptura del esqueleto carbonado del péptidoglucano da lugar a su acción antibacteriana. Dependiendo de las especificidades enzimáticas las lisinas caen en cinco grandes grupos: N-acetilmuramoid L-alanina amidasa, endopeptidasas, N-acetil muramidasa (lisozimas), endo- β -N-acetil glucosaminidasas y finalmente las transglicosilasas (Fig. 5).

Además, algunas lisinas pueden afectar al crecimiento bacteriano porque al igual que los péptidos catiónicos antimicrobianos (ver más adelante), poseen secuencias que por su capacidad anfipática desestabilizan la membrana bacteriana (estas secuencias se han detectado en las lisinas del fago T₄ que afecta a enterobacterias y los fagos D₃ y ϕ KZ de *Pseudomonas aeruginosa*). De hecho, en una serie de elegantes experimentos (Düring *et al.*, 1999) demuestran que este aspecto es incluso más importante que la lisis del peptidoglucano, pues puede facilitar en el caso de las bacterias Gram negativas el acceso de la lisina a la capa de peptidoglucano, al interactuar creando microporos en la membrana externa (Orito *et al.*, 2004).

Una característica típica de las lisinas es su estructura modular con un dominio amino terminal que es donde reside la actividad catalítica y un dominio carboxi terminal por el que se une al péptidoglucano. En algunas lisinas

Figura 5

Sitios de ruptura del peptidoglucano originados por los principales tipos de enzibióticos: (1) muramidasa y transglicosilasa, (2) amidasa, (3 y 4) endopeptidasas, (5) glucosaminidasas. GlcNAc= N-acetilglucosamina, MurNAc= N-acetilmurámico.



ambos dominios deben estar presentes, pero en otras basta con el amino terminal para que tengan actividad enzibiótica e incluso la eliminación del dominio carboxiterminal dispara cientos de veces la actividad biológica (Borysowski *et al.*, 2006). Otra característica típica de muchas lisinas es su estrecho rango antibacteriano cuando actúan desde fuera sobre la pared celular tendiendo a actuar solamente sobre la especie (todas las cepas) bacteriana sensible al bacteriófago del que se aisló la lisina. Se han descrito pocas lisinas que posean amplio espectro (Yoong *et al.*, 2004) pero existen y hacen de ellas un arma muy poderosa para la lucha antibacteriana. Este es el caso de la lisina de un bacteriófago de *Enterococcus faecalis* que posee acción no solo sobre esta bacteria sino también sobre *S. pyogenes* grupo A, β -hemolítico y sobre *S. aureus* incluídas las estirpes meticilin resistentes. Conviene recordar también que por ingeniería genética podemos sintetizar diferentes tipos de lisinas combinando a nuestra voluntad los dominios

amino y carboxi de las diferentes lisinas. En un excelente trabajo llevado a cabo por García *et al.* (1990) se explora y demuestra esta posibilidad para las lisinas que actúan sobre *S. pneumoniae*, de tal manera que manteniendo el dominio carboxiterminal específico para los estreptococos se introducen nuevos dominios amino con diferentes actividades líticas, garantizando así la eliminación del patógeno. Además las lisinas ya comienzan a utilizarse en sinergia con antibióticos convencionales. Así por ejemplo, la lisina Cpl-I mostró una marcada sinergia con la gentamicina frente al neumococo y en especial con la penicilina frente a cepas de *S. pneumoniae* muy resistentes a penicilina (Djurkovic *et al.*, 2005). Caso parecido ocurrió entre la lisina antiestafilócica y los antibióticos glicopeptídicos (Rashel *et al.*, 2007).

Una aplicación médica de las lisinas, que está adquiriendo notable importancia, es su utilización en profilaxis, donde sin duda arrojan mejores resultados que los antibióticos. Además ya existe suficiente cuerpo de conocimiento que permite asegurar que, a pesar de su aparente inmunogenicidad, las lisinas pueden ser utilizadas repetidamente en infecciones sistémicas con éxito (Loeffler *et al.*, 2004; Borysowsky *et al.*, 2006. Ciertamente, los anticuerpos tipo Igs A y G en animales incluso hiperinmunizados, retrasaron la acción de las lisinas pero éstas finamente acabaron destruyendo al patógeno; esta interesante reacción se ha aceptado ya para *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Bacillus anthracis*, incluyendo las cepas multiresistentes. La explicación que se ha dado para este importante efecto es que la unión de la lisina por su sustrato es más fuerte que por su anticuerpo, con lo que afortunadamente se desplaza el equilibrio hacia el primero y así acontece la bacteriolisis (Loessner *et al.*, 2002).

En los países Occidentales, al contrario que los países del Este, hemos tenido que desarrollar modelos con animales para ensayar la bondad de los enzibióticos, ya sea en forma de bacteriófagos o de lisinas. Así, se han desarrollado modelos murinos para la formulación en forma de nebulizadores nasales para el control profiláctico de neumococos y de estreptococos de los grupos A y B. Estos trabajos han llevado a la conclusión de que estos compuestos pueden utilizarse con éxito en poblaciones de riesgo y para el control los reservorios de bacterias patógenas. Por otra parte y al igual que otras proteínas que se utilicen por vía intravenosa, las lisinas tienen baja vida media ($T^{1/2} = 15-20$ min, Loeffler *et al.*, 2003). Sin embargo la acción de las lisinas es tan rápida que incluso este corto espacio de tiempo es suficiente (Fig. 6) como para observar una respuesta terapéutica (Jado, *et al.*, 2003). No obstante, es probable que sea necesario modificar las lisinas con polietilenglicol o bien la región Fc de la Inmunoglobulina G para

umentar el tiempo de residencia *in vivo* a varias horas. Recientemente se han utilizado con éxito lisinas fágicas para el tratamiento de meningitis por adición directamente en el líquido cefaloraquídeo (Grandgirard *et al.*, 2008) y en el tratamiento de endocarditis por suministro intravenoso constante de la respectiva lisina (Entenza *et al.*, 2005). Qué duda cabe que ambas aplicaciones se beneficiarán por el desarrollo de formulaciones con vida media larga.

Al contrario que el caso de los bacteriófagos, el punto clave con los enzibióticos tipo lisina estaba en conocer si eran capaces de eliminar el foco de infección una vez establecido. Utilizando el modelo murino de neumonía, y el enzibiótico Cpl-1, Witzenzath y colaboradores en 2008, demostraron que por sí mismo era capaz de eliminar los focos purulentos del pulmón, así como de evitar la fase bacteriémica en el 100 % de los ratones. La destrucción sistemática de bacterias por medio de lisinas puede dar lugar a un incremento notable de citoquinas debido a los restos celulares. Así, se ha descrito en casos de endocarditis neumocócica que, tras tratamiento con la lisina Cpl-1, se producía aumento de interleukina-1 α (IL-1 α) de IL-1 β , IL-6, IL-10, interferón gamma, factor necrotizante de tumores y factores estimuladores de macrófagos y granulocitos.

Es conocida la incidencia en morbilidad y mortalidad causada por cocos Gram positivos como *S. pneumoniae* y *S. aureus* después de una infección vírica del tracto respiratorio superior (Brundage y Shanks, 2008). La eliminación de la carga bacteriana de estas dos especies reducen muy significativamente estas infecciones secundarias, causadas ya en la mayoría de los casos por cepas multiresistentes. Teniendo en cuenta que el arsenal para la eliminación bacteriana en esta fase es escaso (mupirocina y polisporina), los enzibióticos tipo lisina están encontrando un campo idóneo para su uso, y en la bibliografía se recogen cifras del 100 % de positividad (Mc Cullers *et al.*, 2007). En definitiva, en la actualidad disponemos de una buena cantidad de lisinas muy efectivas frente a cocos Gram positivos como *S. pyogenes* (grupos A, B, D, F, G, L y N), *S. pneumoniae* (Pal amidasa y Cpl-1), *S. agalactiae* (incluida la PlyGBS de amplio espectro), *S. aureus*, y frente a bacilos como es el caso de *B. anthracis*. En este último caso, las lisinas pueden también afectar a otras especies del género *Bacillus* como es el caso de *B. cereus*.

Dentro del capítulo de lisinas que afectan a otras especies bacterianas, cabe destacar las producidas por los fagos de *Listeria monocitogenes*, que aunque son muy específicas de esta bacteria (además de *B. megaterium*), controlan muy bien su población en preparados cárnicos.

Otra clase de enzimas líticas que podrían usarse como enzibióticos son las autolisinas. Estos enzimas son codificados por la propia bacteria y se utilizan en diferentes procesos celulares como son crecimiento y división celulares, recambio de la pared celular, secreción de proteínas y maduración del péptidoglucano (Vollmer *et al.*, 2008). La primera y quizás única autolisina ensayada con poder antibacteriano fue la LytA amidasa, principal autolisina de *S. pneumoniae* que en un modelo murino fue mucho más efectiva que la propia lisina Cpl-1 y por supuesto que antibióticos tipo amoxicilina o cefotaxima (Fig. 6).

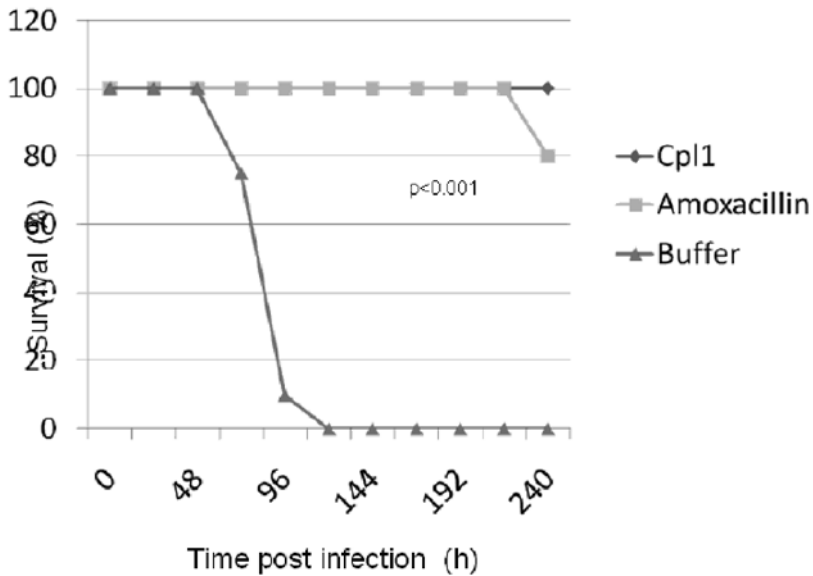


Figura 6:

Supervivencia de *S. pneumoniae* después de tratamiento intraperitoneal con lisina Cpl-1 o amoxicilina. Los ratones nasalmente pretratados con 108 neumococos desarrollaron una neumonía clásica en 24 horas. 24 horas post-infección se suministró a los ratones lisina Cpl-1, amoxicilina o tampón cada 12 durante 72 horas (Witzenrath *et al.*, 2008)

c) Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas producidas por bacterias y que inhiben el crecimiento de otras bacterias (Nes *et al.*, 2007) y en sentido estricto no pueden considerarse como autolisinas, aunque su papel de ayuda a los enzibióticos para incrementar y acelerar la lisis de bacterias Gram

positivas y Gram negativas es incuestionable. Hay una gran diversidad de bacteriocinas estudiadas, clonadas y explotadas. De todas ellas la más importante sin duda es el lisostafín, junto con la enterocina y la subtilisina (Fig. 7). El primero fue ya descrito en los años sesenta como proteína con muy alta acción antiestafilocócica. Se trata de una endopeptidasa que contiene Zn, codificada por un plásmido de *Staphylococcus simulans* biovar *staphylo-lyticus*, con una masa molecular de 25 kDa (264 aminoácidos) (Schindler y

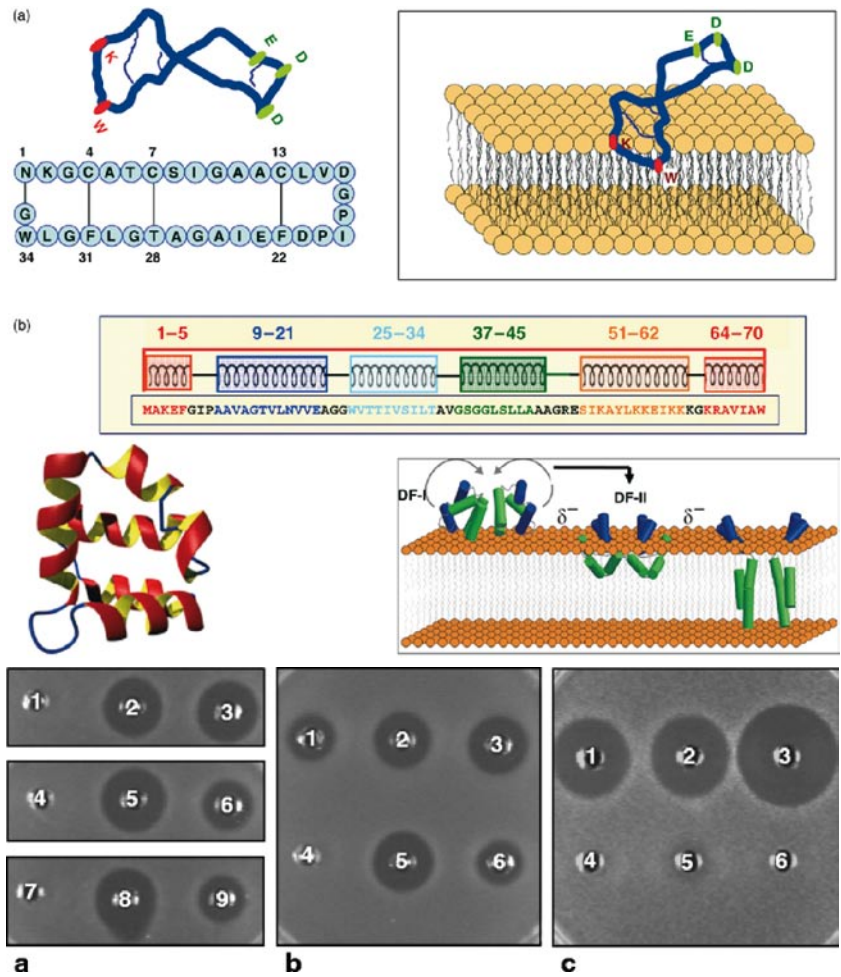


Figura 7

Estructura bidimensional de la Enterocina AS-48(a) y la subtilisina A (b). Interacción con bicapas lipídicas y creación de microporos en las membranas celulares con resultado de muerte de la bacteria (parte inferior de la figura mostrando ensayos de difusión de las diferentes bacteriocinas en agar.

Schuhardt, 1964), que rompe específicamente el enlace glicocola-glicocola en los puentes cruzados del peptidoglucano de los estafilococos con gran eficacia, incluyendo todas las estirpes coagulasa negativo (en este caso su actividad es menor debido a la diferente naturaleza de los puentes cruzados del peptidoglucano) y meticilin resistentes de *S. aureus* (Eiff *et al.*, 2003). Contiene dos dominios, el N terminal con actividad enzimática y el carboxi terminal con especificidad de unión al peptidoglucano celular. Una característica importante del lisostafín es su capacidad de lisar *S. aureus* tanto en estado proliferativo como no proliferativo (Kumar, 2008).

En un estudio reciente (Yang *et al.*, 2007) se recogen 257 estirpes de *S. aureus*, resultando todas ellas sensibles al compuesto incluyendo las 89 estirpes resistentes a meticilina con una concentración mínima inhibitoria entre 0.03 y 2 µg/ml y la concentración mínima bactericida entre 0.016 y 1 µg/ml, con independencia de su resistencia o sensibilidad al antibiótico. Otros estudios independientes arrojaron valores muy parecidos a los anteriores. Por todo lo que antecede, está claro que una de las principales aplicaciones del lisostafín está relacionada con la eliminación profiláctica de estafilococos que colonizan las mucosas nasales y que en determinadas circunstancias pueden ser el punto de partida de infecciones serias. La segunda utilización está ya relacionada con su uso terapéutico. La efectividad en modelos de bacteriemia, endocarditis, infecciones neonatales así como endoftalmitis y queratitis oculares, dieron buenos resultados sin mostrar realmente efectos secundarios (Kokai-Kun *et al.*, 2007; Oluola *et al.*, 2007), siendo de destacar que estos experimentos arrojaron mejores resultados que los antibióticos y que incluso los anticuerpos, que se van induciendo por repetidas inyecciones, solamente disminuyen ligeramente su actividad pero no llegan a neutralizarla. De igual manera, se encontró que el lisostafín puede suscitar sinergia con las lisinas, péptidos catiónicos antibacterianos y algunos antibióticos (Graham y Coote, 2007; Becker *et al.*, 2008). También se han descrito algunas resistencias, pero curiosamente estas estirpes resultaron ser más sensibles a los antibióticos y mostraban marcada reducción de su virulencia.

Otra bacteriocina cuya actividad antibacteriana se ha estudiado también en detalle es la zoocina A, producida por *S. equi* ssp *zoepidemicus* 4881 (Akesson *et al.*, 2007); contiene un dominio putativo de endopeptidasa y un carboxiterminal de unión a pared celular (Lai *et al.*, 2002). La zoocina A muestra una cierta selectividad por las especies del género *Streptococcus* y así *S. equi*, *S. pyogenes*, *S. mutans* y *S. gordonii* son sensibles (en casos como es el de *S. pyogenes* la CMI es realmente baja, $\leq 31,5$ ng/ml), mientras que otras como *S. oralis* y *S. rattus* son insensibles

d) Lisozimas

Las lisozimas o N-acetilmuramidasa (ver Fig. 5) son hidrolasas que rompen específicamente el enlace 1,4-β-D- existente entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglucano y se producen tanto en animales, como en plantas, bacterias y virus, constituyendo uno de los enzimas más antiguos y perfectos de la Naturaleza. Basándose en su secuencia de aminoácidos se dividen en diferentes subfamilias (Masschalck y Michiels, 2003). En el caso de humanos la lisozima se produce por células del sistema inmune como son los granulocitos polimorfonucleares, los monocitos o los macrófagos y se encuentra en los fluidos tisulares incluyendo las lágrimas, saliva, orina, leche, hígado, cartílago y piel; de todas las lisozimas la más estudiada y empleada es la de clara de huevo. Las lisozimas son enzimas únicas en el sentido de que no solamente presentan actividad antibacteriana, sino también antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y elevada capacidad inmunomoduladora (Sava, 1996), además es el enzima más profusamente empleado en humanos desde hace décadas. Aunque el modo de acción mejor conocido es el de ruptura enzimática del peptidoglucano, la lisozima tiene otros curiosos modos de acción no enzimáticos como es el relacionado con la activación de las autolisinas bacterianas, debido a su naturaleza catiónica y acción desestabilizadora de la membrana citoplasmática por eliminación de iones divalentes de la superficie membranosa.

La lisozima es sobre todo activa frente a bacterias Gram positivas, mientras que las negativas, por poseer la membrana externa OM, son bastante refractarias no solo a la lisozima sino también a las lisinas añadidas exógenamente. Caso aparte es la bacteria *Capnocytophaga gingivalis* que siendo Gram negativa es sensible a la lisozima. En la actualidad se llevan a cabo modificaciones en la lisozima para que penetre a través de la OM y sea por tanto activa frente a las demás bacterias Gram negativas. Entre otras modificaciones cabe señalar su combinación con ácidos grasos, péptidos hidrófobos, porinas y holinas (las dos últimas en investigación todavía). La combinación con porinas tiene la ventaja de que además de eliminar al patógeno rápidamente, el paciente, debido a su alta inmunogenicidad, desarrolla inmunidad duradera de por vida frente a la especie bacteriana de la que se aisló la porina. Finalmente indicar que la lisozima en sí misma se puede emplear como transportadora de antibióticos hacia la célula bacteriana, aumentando claramente su acción sinérgica (Hoq *et al.*, 2008). Desde el punto de vista evolutivo, las lisozimas con una masa molecular entorno a los 14-15 kD se originaron a partir genes de bacteriófagos y/o

bacterias codificantes para lisinas y que han dado lugar a todas las subfamilias de lisozimas conocidas, además de la α -lactoalbumina. Originariamente los productos génicos eran mucho mayores pero con la evolución de los eucariotas los péptidos se fueron reduciendo en tamaño pero manteniendo su actividad biológica y eliminando epitopos que condujesen a procesos de autoinmunidad en el organismo productor (caso de los animales, en los que como se sabe la lisozima es pobremente inmunogénica).

e) Porinas

La membrana externa (OM) es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas que se dispone externamente al peptidoglicano y está constituida principalmente por fosfolípidos, lipoproteína mureína también denominada de Braun, lipopolisacárido (LPS) y proteínas a las que se les denomina genéricamente como Omp (Fig. 8). Las Omp constituyen

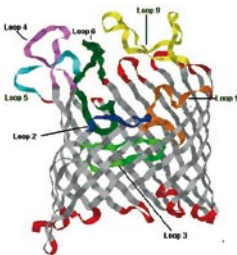
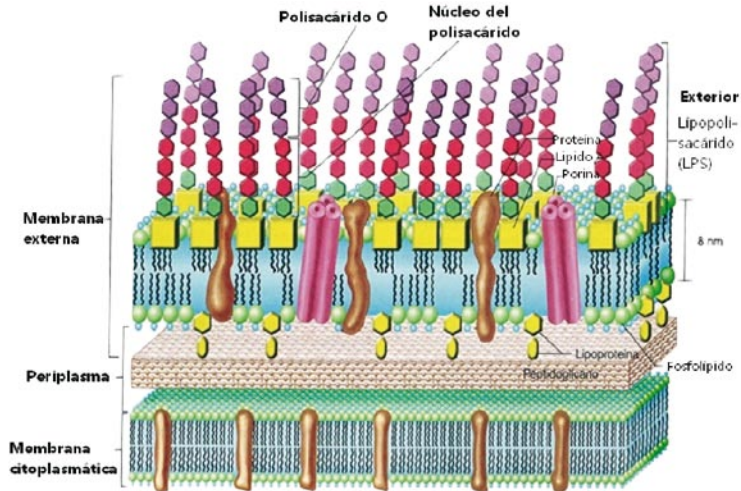


Figura 8

Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas mostrando la organización de la membrana externa (OM) y dentro de ella la organización trimérica de las porinas bacterianas. En la parte inferior de la figura se aprecia la estructura en barril beta de una porina típica de *Salmonella typhimurium*, vista de lado. Las porinas son proteínas transmembranales (presentes también en membranas mitocondriales, plastídica y citoplasmática eucariótica) y con centros huecos a través de los cuales pueden difundir moléculas pequeñas.

aproximadamente el 50% de la masa seca de la membrana, En esta bicapa de fosfolípidos que es la membrana externa, flotan más de 100,000 canales proteínicos individuales, que se clasifican en grandes grupos.

Uno es el llamado de las porinas, llamadas también proteínas de matriz o proteínas principales de membrana por ser las más abundantes (en términos de masa, ellas representan hasta el 2% del total de las proteínas de la célula), forman canales de gran tamaño que permiten la difusión pasiva de iones y moléculas hidrofílicas, nutrientes y antibióticos, además de ser receptores naturales de los bacteriófagos.

Las porinas más conocidas de *E. coli* son el trímero PhoE (38,782 Da), OmpF (38,306 Da) y OmpC (37,683). La proteína PhoE se expresa únicamente en condiciones de limitación de fosfato. En medio de cultivo rico solamente se producen la OmpF y la OmpC. Cuando *E. coli* se encuentra en el aparato digestivo, a 37°C y en ambiente de osmolaridad alta, sintetiza sobre todo OmpC (la porina más pequeña) y se cree que protege a la bacteria de los efectos tóxicos de las sales biliares, permitiendo que los nutrientes penetren en la célula. Cuando *E. coli* se encuentra en el agua, donde se desarrolla a temperaturas inferiores, en un ambiente de baja osmolaridad y con escasez de nutrientes, sintetiza sobre todo OmpF. Las porinas constituyen también los poros (de aquí el término científico) de las mitocondrias o VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que permiten el paso de moléculas de hasta 10 kD y un diámetro aproximado de 20 Å. La estructura general de estas proteínas la forman trímeros asociados, como por ejemplo la porina LamB en *Echerichia coli*, que además de formar parte del regulón maltosa es el receptor del bacteriófago lambda.

Las porinas bacterianas conforman un barril beta (Fig. 8) que es una estructura de proteínas formada por una serie de láminas beta normalmente dispuestas de manera antiparalela, que se enrollan para formar una estructura cerrada o de barril, con la primera cadena de láminas beta uniéndose a la última a través de enlaces de puente de hidrógeno. Las porinas constituyen hasta el 2-3% de los genes de una bacteria Gram negativa (Wimley, 2003). En muchos casos, la alternancia de cadenas contiene residuos aminoacídicos polares e hidrofóbicos, de modo que los residuos hidrofóbicos están orientados hacia el interior del barril para formar un núcleo hidrofóbico y los residuos polares están orientados hacia el exterior del barril sobre la superficie expuesta a solvente. No obstante las porinas y otras proteínas de membrana que contienen barriles beta pueden cambiar este patrón justamente al contrario de modo que los residuos hidrófobos

quedan orientados hacia el exterior, por tanto en contacto con lípidos, y los residuos hidrofílicos orientados hacia el interior del poro permitiendo así el paso de sustancias hidrofílicas a través de una barrera hidrófoba como es el caso de las membranas biológicas. Todos los barriles-beta se pueden clasificar en función de dos parámetros: el número de cadenas en la lámina beta, n , y el “número de cizalla”, S , una medida de la forma escalonada de la láminas beta (Murzin *et al.*, 1994).

f) Holinas

Uno de los primeros y principales mecanismos que utiliza la Naturaleza para mantener la vida es a través de la creación de barreras físicas y este es el caso de las membranas celulares que delimitan un espacio que llamamos célula y que es la base de la vida en este planeta. Como sabemos, esta estructura es muy dinámica, con funciones no solamente físicas sino fisiológicas y bioquímicas, perfectamente delimitadas sin las que no sería posible su viabilidad. A pesar de la complejidad macromolecular de las mismas, la bicapa lipídica que es el esqueleto de toda membrana celular, puede interactuar con una pléyade de proteínas, que son en realidad las que delimitan la fisiología de esta estructura. Algunas de estas proteínas (Tabla 6) son codificadas por el genoma de los bacteriófagos para que al interactuar con la membrana bacteriana realicen pequeños agujeros (“hole” en Inglés, de aquí la palabra que hemos castellanizado como holina) por donde puede salir la lisina del virus y degradar la capa de peptidoglucano, para que finalmente pueda ser liberada toda la progenie viral. Este sistema de dos componentes (holina/lisina) está sobre todo presente en bacteriófagos complejos de DNA bicatenario como material genético. Otros virus bacterianos más sencillos que incluyen a los DNA y RNA monocatenarios carecen de esta sofisticación e inducen la lisis de la bacteria interfiriendo con la síntesis del peptidoglucano.

Tabla 6

Tipos de Holinas descritas hasta el día de la fecha.

Clase	Familia	Gen	Número de acceso	Longitud de la cadena	M-M	Bacteriófago
I	λ	p11	AF157835	94	>10	APSE-1
		13	X67137	108	2	ES18
		S	AF069308	107	1	HK22
		S	AF069529	106	1	HK97
		S	J02459	107	1	λ
		13	M10997	108	2	P22
		HII416	U32821	118	3	□flu
		orf1	AJ133022	111	>10	ORFI-Xnem
I	P1	lydA	X87674	109	>10	P1
I	P2	O	U32222	98	>10	I86
		Y	AF063097	93	>10	P2
I	φCTX9	orf9	AB008550	117	>10	□CTX
I	φCTX10	orf10	AB008550	90	1	□CTX
I	PRD1	m	M69077	90	>10	PRD1
I	PS3	13	AJ011579	105	3	PS3
I	A118	hol2438	X89234	95	2	2438
		hol118	X85008	96	2	A118
		hol500	X85009	96	2	A500
		hol	X90511	142	>10	□gle
		orf117	AF047001	117	>10	fOg44
I	c2	orf37	L33769	97	0	blL67
		117	L48605	96	>10	c2
		orf2	L37090	96	>10	P001
I	Cp-1	cph1	Z47794	134	4	Cp-1
I	Phi-29	14	X99260	132	1 or 2	BI03
		14	X04962	131	5	□□□
		lysis	M11813	131	5	PZA
I	skI	121	AF009630	117	3	blL170
		orf19	AF011378	117	3	skI
		orf2^b	M90423	117	3	US3
II	21	S	M65239	71	2	21
		S	AF125520	71	2	933W
		S	U82598	71	2	DLP-12
		S	AF034975	68	0	H-19B

Tabla 6

Tipos de Holinas descritas hasta el día de la fecha. (Continuación)

Clase	Familia	Gen	Número de acceso	Longitud de la cadena	M-M	Bacteriófago
		S	J02580	70	2	PA-2
		S	AE000252	96	2	QIN
		S	AP000363	96	2	VT2-Sa
		hol	U24159	78	>10	HPI
		orf6	U28154	74	3	orf6-Hsom
II	Hol-Paeru	hol	AB030825	117	9	hol-Paeru
II	N4	orf63			>10	N4
II	N15	53	AF064539	101	1	N15
II	NucE	nucE	U11698	89	>10	nucE-Smar
		regA	U31763	88	>10	regA-Smar
		13	AJ011581	67	2	PS119
		13	AJ011580	67	2	PS34
II	T7	lys^b	M14784	67	>10	T3
		17.5	V01146	67	>10	T7
II	80 α	?^b		92	2	393-A2
		holin	U72397	145	>10	80 α
		orf24	AF085222	80	>10	DT1
		ejh	S43512	85	>10	EJ-1
		orf3	L34781	145	>10	□□□
		lysA	U04309	88	>10	□□□□
		lyt50	U88974	80	>10	□□□□□□
		orf87	AF057033	87	6	Sfi11
		orf87	AF115102	87	6	Sfi19
		orf87	AF115103	87	6	Sfi21
		S	L31364	88	>10	Tuc2009
		holTW	Y07739	185	>10	Twort
II	BK5-T	orf95	L44593	95	>10	BK5-T
		xh1B	L25924	87	>10	PBSX
		orf24	AB009866	100	>10	□PVL
		bh1B	AF021803	88	>10	SP8
		26	X97918	82	1	SPP1
		xpaF2	D13377	87	>10	xpaF2-Blich
		xpaG2	D49712	89	0	xpaG2-Blich
		xpaL2	M63942	87	>10	xpaL2-Blich

Tabla 6

Tipos de Holinas descritas hasta el día de la fecha. (Continuación)

Clase	Familia	Gen	Número de acceso	Longitud de la cadena	M-M	Bacteriófago
II	Dp-I	dph	Z93946	74	>10	Dp-I
II	L5	II	AF022214	141	>10	D29
		II	Z18946	131	>10	L5
II	LL-H	hol	M96254	107	>10	LL-H
			M60167			mv1
		lysB	Z26590	124	>10	mv4
II	φadh	hol	Z97974	114	>10	□adh
II	φC31	orf1	X91149	78	>10	□C31
II	r1t	orf48	U38906	75	6	r1t
U (I)	φ6	P10	M17462	42	>10	□6
U (I)	φ6	P10	AF125681	42	>10	□7
U (I)	T4	t	M16812	218	>10	K3
		t	AF158101	218	>10	T4
U (P)		t	X05676		>10	MI
		t	X05675		>10	Ox2
U (I)	187	hol187	Y07740	57	1	187
U (I)	10MC	P98	AF049087	98	9	10MC
U (0)	A511	hol511	X85010	126	>10	A511
U (I)	PBSX	xh1A	L25924	89	>10	PBSX
U (0)		24.1	X97918	91	2	SPPI
U (I)		xpaF1	D13377	89	>10	xpaF1-Blich
		xpaG1	D49712	89	>10	xpaG1-Blich
		xpaL1	M63942	89	>10	xpaL1-Blich
U (I)	SP-beta	bh1A	AF021803	70	1	SPB
U (4)	LrgA	ipa-23r	X73124	128	>10	ipa-23r-Bsub
		ysbA	Z75208	146	>10	ysbA-Bsub
		yohJ	U00007	132	>10	yohJ-Ecoli
		HII297	L42023	140	>10	HII297-Hinf
		PAB0239	AJ248284	109	>10	PAB0239-Paby
		PH1801	AP000007	109	>10	PH1801-Phor
		lrgA	U52961	147	>10	lrgA-Saur

Las holinas son pequeñas proteínas hidrofóbicas de 50 a 150 aminoácidos que adquieren una estructura toroidal (Fig. 9) que se integran en la membrana citoplasmática de las bacterias (Wang *et al.*, 2000). Las holinas difieren de la mayor parte de las proteínas que afectan a la integridad membranal de una manera muy significativa y frecuentemente afectan también a la polaridad de la misma; su integración es sumamente letal e irrecuperable la función membranal. Esto hace de ellas un utensilio potencial para ser utilizadas farmacológicamente. En general las holinas comienzan por un extremo amino terminal muy polar seguido de dos o tres regiones hidrofóbicas, separadas por segmentos muy polares y finalmente en el extremo carboxiterminal poseen una cola relativamente larga de restos cargados. Por tanto, la alternancia de regiones polares y apolares determinan sus existencia como proteínas transmembranales (TM). Se clasifican en tres grupos según el número de segmentos hidrofóbicos (Wang *et al.*, 2000).

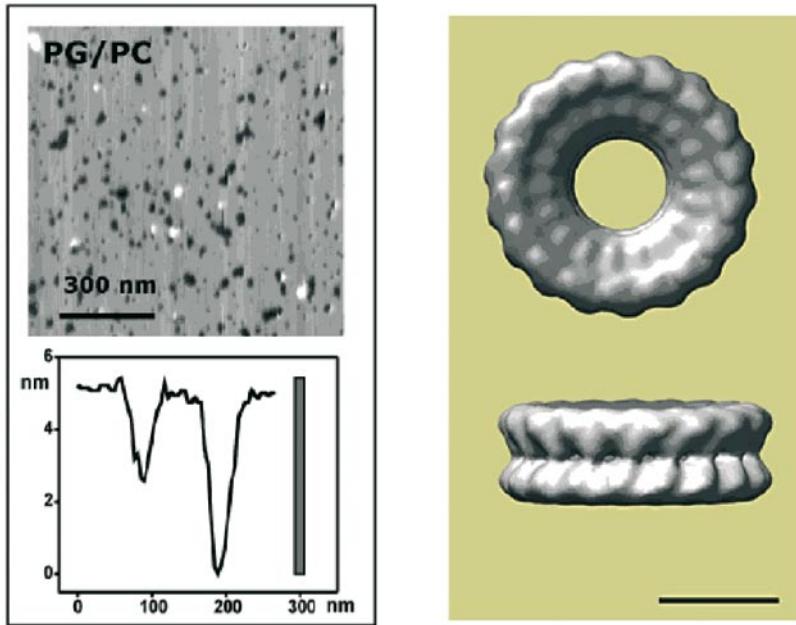


Figura 9

Modelo de una holina fágica (derecha) así como de aspecto de una preparación al microscopio de fuerza atómica mostrando los poros originados por las mismas (izquierda).

Así por ejemplo las de clase I contienen tres segmentos predecibles TM con el extremo amino proyectándose al periplasma; el ejemplo más clásico es la holina S del bacteriófago lambda. Las de clase II contienen solamente dos segmentos hidrofóbicos. Finalmente las de clase III que comprende holinas derivadas de las clases I y II y que contienen de uno a cuatro regiones transmembranales

Otro criterio de clasificación de las holinas es meramente estructuralista y atiende a la presencia o no de dos metioninas en el extremo aminoterminal. Finalmente hay otra forma de clasificar a las holinas relacionada con el tipo de daño que ejerce sobre la membrana citoplasmática. Así podemos hablar de las holinas completas (típicas) y toroidales que primero despolarizan la membrana y después originan los poros y aquellas incompletas (atípicas), también llamada pinholinas que solamente despolarizan la membrana

El mecanismo por el que las holinas causan daño en la membrana ha constituido un misterio desde el punto de vista molecular durante mucho tiempo y solamente cuando se dispusieron de los anticuerpos apropiados se pudo seguir todo el proceso y comprobar todo el mecanismo de oligomerización que finalmente lleva a la formación del toroide integrativo.

En Biomedicina, las holinas pueden ser explotadas por su letalidad y así hay que indicar que en sistemas de expresión ectópica eucariótica, las holinas son citotóxicas produciendo muerte celular por un mecanismo no apoptótico (Agu *et al.*, 2007). La holina S^λ interrumpe el potencial de membrana de la mitocondria induciendo una vacuolización masiva de la misma. En boca de los autores (Agu *et al.*, 2007) esto abre la puerta para un posible uso antitumoral en terapia génica. En lo que se refiere a su uso para combatir las enfermedades infecciosas, su uso está todavía limitado y depende de momento del uso de bacteriófagos para el control de la infección. Desde luego, la incorporación de las holinas a los bacteriófagos terapéuticos (bajo una regulación apropiada) proporciona el camino para que exista muerte bacteriana (regulable en el tiempo) sin lisis masiva y productora de altos niveles de endotoxinas.

g) Péptidos antimicrobianos (AMPs)

La existencia de actividades antimicrobianas en los tejidos y fluidos animales ya se describió en 1850, aunque no fue hasta el período comprendido entre 1920 y 1950 cuando comenzaron a identificarse este grupo de sustancias, activas tanto contra bacterias Gram positivas como Gram

negativas (Skarnes y Watson, 1957). Durante las décadas siguientes se aislaron e identificaron las cecropinas de insectos (Steiner *et al.*, 1981), la magainina de anfibios (Zasloff, 1987) y las defensinas humanas (Ganz *et al.*, 1990). Actualmente conocemos más de 800 péptidos antimicrobianos (AMPs, excluyendo los producidos por bacterias o bacteriocinas que tienen tendencia a ser estudiadas aparte aunque en sentido estricto son también AMPs) que constituyen una buena batería de principios activos potencialmente aplicables a la lucha contra las enfermedades infecciosas y a la espera de ser utilizados industrialmente (Peschel y Sahl, 2006). Estos péptidos son, por tanto, moléculas endógenas que se movilizan inmediatamente después de la infección y que tienen amplio espectro incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y antitumoral. Por diversas razones que no viene al caso discutir aquí, el estudio biológico y biotecnológico tales como estudio de la organización génica, expresión, procesamiento etc. de este tipo de sustancias ha estado más retrasado que el de otras, pero evidentemente poseen unas características muy prometedoras para que en el futuro puedan ser utilizadas con fines terapéuticos. Los péptidos antimicrobianos trabajan en dos frentes; por una parte poseen el citado amplio espectro que les capacita para destruir todo tipo de microorganismos, pero por otra parte pueden modular selectivamente las defensas innatas del hospedador. Estos modos de acción, sin ninguna duda, proponen un cuadro alternativo de lo más sugestivo al convencional y representado por el mundo de los antimicrobianos tradicionales

Los péptidos antimicrobianos están codificados genéticamente y se expresan en mastocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células epiteliales y queratinocitos. Se sintetizan como precursor zimogénico que requiere uno o más procesamientos proteolíticos para dar lugar al péptido maduro con actividad biológica. Constituyen un grupo de péptidos cortos (6-59 aminoácidos) generalmente cargados positivamente (algunos negativamente) y un porcentaje alto de restos hidrofóbicos (a menudo mayor del 30%). Los AMPs se categorizan por su función pero se clasifican según sus características estructurales como se ve en la Tabla 7.

Tabla 7

Clasificación de péptidos antimicrobianos (AMPs).

B) Actividad antibacteriana; C) Actividad citotóxica;

F) Actividad antifúngica, L) Unión a LPS; V) Actividad antiviral

Clase	Nombre	Actividad
ANIONICA	Maximina H5	B
	Peptido anionico SAAP	B
	Pept1 aniónico Gm1	B,F
	Pept2 aniónico Gm	B,F
CATIONICA LINEAR Ø- HELICE	Cecropina A	B,F
	Magainina I	B
	Buforina II	B,F
	Brevinina-I	B,V,C
	Esculentina-IA	B,V,C
	Dermaseptina B2	B,F
	Pleurocidina	B
	Seminalplasmina	B;F;C
	SMAP-29	B,F
	CAP18	B
LL37	B,V,C,L	
ENRIQUEDIDA EN AMINOACIDOS ESPECIFICOS	Abaecina (rica en Prolina)	B
	Drosocina (rica en Prolina y Arginina)	B
		B
	Hymenoptaecina (rica en Glicocola)	B
	Holotricina (rica en Glicocola y Prolina)	F
	Indolicidina (rica en Triptófano)	B,FV
Histatina (rica en Histidina)	B,F	
CON PUENTES DISULFURO	Brevinina (1 puente)	B, V, C
	Protegrina (2 puentes)	B, V, F
	Ø-defensina HNP-1 (3-puentes)	B, F, V, C

Aunque deberíamos estar interesados a nivel biotecnológico en todos los AMPs producidos por vertebrados, una vez más y por razones obvias, los que más interesan a la sociedad son los producidos por mamíferos, dejando aparte el enorme arsenal de la piel de los batracios que incluye más de 500

AMPs muchos de ellos con amplio espectro como se indicó anteriormente. En los mamíferos los AMPs más importantes son las α y β defensinas, aunque no hay que olvidar que los neutrófilos contienen péptidos lineares en α hélice de la familia de la catelicidina (Zanetti, 2005). En humanos, la catelicidina (hCAT-18/LL-37) se encuentra en neutrófilos secretores de la boca, lengua, esófago, epitelio de las glándulas mucosas del tracto respiratorio y genitourinario (vagina, epidídimo y plasma seminal) y también se detecta en altos niveles en procesos inflamatorios que implican queratocitos de la piel como es en el caso de la psoriasis.

El único AMP detectado en mamíferos con estructura en lámina β cíclica es el dodecapéptido altamente catiónico ó bactenecina, aislado inicialmente en neutrófilos bovinos (Romeo *et al.*, 1988).

Los leucocitos y células epiteliales de pájaros y mamíferos producen más de 100 defensinas (Wong *et al.*, 2007) que pueden clasificarse en subfamilias α y β de acuerdo con el precursor, la estructura génica, así como la conectividad de los 6 restos de cisteína de su secuencia. Las α defensinas son comunes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, en ciertas poblaciones de macrófagos, vagina, trompas de Falopio y ectocervixes. Por el contrario las β defensinas están presentes en tejidos epiteliales incluyendo el tracto genitourinario y respiratorio, piel, granulocitos macrófagos alveolares. Ambas defensinas poseen una estructura basada en tres láminas beta ($\beta\beta\beta$).

El modo de acción es todavía materia de controversia por el elevado número de AMPs en el mundo biológico que hace difícil extraer una generalización. A pesar de esto, pueden agruparse (Tabla 8) en aquellas que tienen como diana la membrana citoplasmática, originando bien poros toroidales, bien barriles β o simplemente desestabilización de la bicapa lipídica, o bien las que tienen dianas intracelulares (inhibición de la síntesis de proteínas, de la pared celular, de la síntesis de ácidos nucleicos, de enzimas etc). No obstante, a pesar del enorme volumen de datos existentes sobre su producción, actividad, estructura y función etc, se sabe en realidad poco sobre el modo de acción íntimo de estos compuestos, aunque sin duda representan un modelo paradigmático de coevolución entre el productor y los patógenos que lo asaltan; parámetros tales como su tamaño, secuencia, carga, hidrofobicidad y estructura parece que apuntan a diseños altamente específicos por parte de la evolución, para dar lugar a unos elementos antimicrobianos que nada tienen que ver con los antibióticos que se utilizan hoy (Klüver *et al.*, 2006). Actualmente, la creencia es que los AMPs han

evolucionado como moléculas consenso para la interacción con membranas celulares, internalización y en muchos casos ataque a una diana intracelular muy precisa (Tabla 8).

Tabla 8

Dianas de los péptidos antimicrobianos (AMPs)

Lugar de acción	Actividad	Ejemplos	Referencias
Membrana	Poros toroidales	LL37	Henzler-Wildman <i>et al.</i> , (2003)
	Desestabilización deslizante	Cecropina	Gazit <i>et al.</i> , (1995)
	Distorsión en barril	Alamethicina	Yang <i>et al.</i> , (2001)
Dianas intracelulares	Síntesis de proteínas	HNP-1	Lehrer <i>et al.</i> , (1989)
	Síntesis de pared celular	Mersacidina	Brotz <i>et al.</i> , (1998)
	Síntesis de ácidos nucleicos	Pleurocidina	Patrzykat <i>et al.</i> , (2002)
	Membrana citoplasmática (formación del septo)	Indolicidina	Subbalakshmi <i>et al.</i> , (1998)
	Inhibición de actividad enzimática	Histatina	Luque-Ortega <i>et al.</i> , (2008)
	Floculación	Anionica	Brogden <i>et al.</i> , (1996)
	Unión a ácidos nucleicos	Buforina II	Park <i>et al.</i> , 1998

El seguimiento del desarrollo clínico de los AMPs para su uso terapéutico arroja todavía resultados preliminares y a veces poco alentadores, que en boca de los expertos en el tema se deriva del poco conocimiento que todavía tenemos sobre la biología de estas moléculas. Así por ejemplo, la magainina, aislada de ranas no ha conseguido la aprobación de la FDA por ausencia de ventajas sobre antibióticos convencionales en fase III para el tratamiento de úlceras diabéticas. Lo mismo puede decirse (en diferentes fases) de la protegina de cerdos, la indolicidina bovina o el péptido BPI

humano para el tratamiento de la enfermedad meningocócica. Otros, por el contrario, como es el caso de las histatinas humanas ya han completado la fase II para el tratamiento de la candidiasis oral. Dos aspectos son fundamentales para el éxito o fracaso del empleo de estas moléculas enzibióticas en la terapéutica y que se corresponden por una parte con la propia estructura de ellos y por otra con la dosificación para que llegue a la diana final. Respecto a lo primero, por ser péptidos, son sensibles a las proteasas que disminuyen o anulan su actividad biológica. Hay que indicar que para ello se están ensayando nuevas estrategias para hacerlos parcialmente resistentes a las proteasas (la resistencia total no es deseable pues en definitiva estos péptidos han de ser eliminados). Estas estrategias se resumen en la sustitución parcial de L-aminoácidos por D-aminoácidos en aquellos puntos más frecuentemente hidrolizados por las proteasas o en su protección mediante escudos liposómicos.

En la actualidad y como en el caso de los enzibióticos anteriores, se visualiza para los AMPs una estrategia de sinergia, bien con otros enzibióticos como los incluidos aquí o con antibióticos tradicionales para la lucha contra microorganismos patógenos. No obstante y a pesar de esta capacidad los AMPs, tienen otras actividades muy interesantes que se relacionan con efectos estimulatorios del sistema inmunológico y que a muchos de ellos les lleva a mostrar actividad antitumoral importante (Mader *et al.*, 2006). Tal es el caso de las magaininas que lisan una plétora de células, pero preferencialmente a las células tumorales, que son un orden de magnitud más sensible que las células no transformadas (Imura *et al.*, 2008). Algo parecido se ha demostrado para las defensinas humanas, aunque su uso se esté centrando en el tratamiento de ciertos carcinomas (Gambichler *et al.*, 2006).

En este apartado podrían incluirse también aquellos AMPs con actividad frente a virus animales, siendo uno de los mejores candidatos lo que conocemos globalmente como ribotoxinas. Se trata de una gran familia de reibonucleoproteínas secretadas fundamentalmente por especies de los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. Todas ellas ejercen su modo de acción primero por su capacidad de interaccionar con bicapas lipídicas (como todos los AMPs) y finalmente por hidrolizar específicamente un enlace fosfodiéster (conocido como asa de la ricina) en el gen grande rRNA. Ello conlleva a la parada de la síntesis de proteínas y apoptosis celular. Para ellas no se les reconoce receptores específicos aunque tienen predilección por sistemas membranosos con permeabilidad alterada como es el caso de las células tumorales y han sido ya empleadas para la construcción de inmu-

notoxias contra células transformadas. Su uso está bajo estudio debido a la toxicidad que puede presentar frente a células normales, aunque ya se han conseguido nuevas toxinas ingenierizadas que minimizan el efecto tóxico.

No cabe ninguna duda de que la búsqueda de nuevas ribotoxinas y caracterización de las mismas, de nuevas estrategias de producción industrial, de una vehiculización apropiada dará en un futuro próximo los resultados esperados (Lacadena *et al.*, 2007; Carreras-Sangra *et al.*, 2008).

En definitiva, aunque los AMPs se reconocen como componentes del sistema inmune natural, su actividad antimicrobiana y antitumoral (en un contexto más ampliado de enzibióticos) justifican los esfuerzos humanos y económicos que se están haciendo con ellos para incorporarlos definitivamente al arsenal terapéutico.

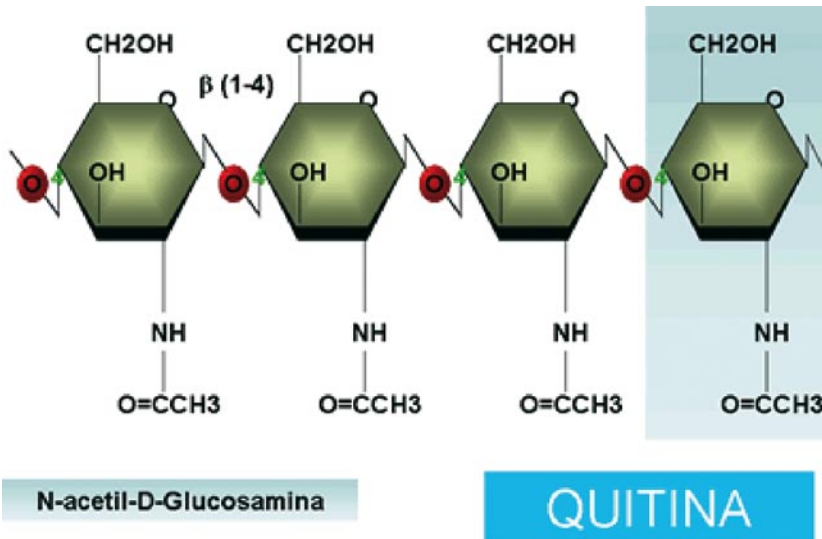
ENZIBIOTICOS ANTIFUNGICOS

Las infecciones fúngicas han ido incrementando durante los últimos años, particularmente en los pacientes inmunocomprometidos.

Por otra parte, el desarrollo de principios antifúngicos ha sido más lento que el de los antibacterianos, principalmente a consecuencia de su toxicidad para las células superiores, debido a que muy frecuentemente las dianas en la célula huésped y en el hongo son las mismas. Una excepción a esto lo constituye la pared celular de los hongos. Los principales constituyentes son quitina, 1,3- β -D-glucanos, 1,6- β -D-glucanos y manoproteínas (Fig. 10).

Los dos primeros son componentes rígidos estructurales y los dos segundos con otro tipo de acciones muy variadas entre las que destaca la cementante y de inmunogenicidad de las manoproteínas. La quitina es un polisacárido formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina con enlaces de tipo 1,4 en β , mientras que el segundo polisacárido con enlaces 1,3 también en β , aún siendo un enlace fuerte lo es menos que el de la quitina. Ambos polisacáridos que por su estructura tienden a configurar microfibrillas son la diana de las quitinasas y de las 1,3- β -D-glucanasas y tienen obligatoriamente que ser parcial y localizadamente hidrolizados para que tenga lugar un crecimiento apropiado de la célula fúngica. Una acción no controlada de estas enzimas conduce a la múltiple degradación de estos polisacáridos estructurales e indefectiblemente a la muerte del hongo. Como estos polisacáridos (dianas) no se encuentran en vertebrados, desde un primer momento se pensó en la utilización de las quitinasas y

A)



B)

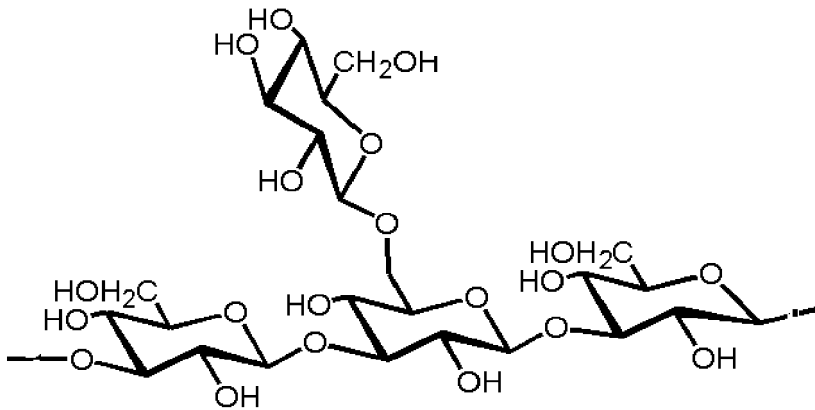


Figura 10

Estructura de la quitina (A) y del 1,3-β-D-glucano (B)

1,3-β-D-glucanasas como enzibióticos para la lisis de los hongos y por tanto control de la enfermedad fúngica. Para el iniciado en tal tipo de control, debe quedar claro que la aproximación es radicalmente diferente a la utilizada por los antifúngicos convencionales, que tienen como dianas los enzimas dependientes del citocromo P450, el propio ciclo mitótico por inter-

ferencia con el desarrollo de las fibras del huso acromático o la síntesis de esteroides; todas estas dianas también están en la célula huésped y de aquí sus efectos secundarios. También, estos últimos años se han conseguido desarrollar nuevos antifúngicos que tienen como diana la interferencia de la síntesis de componentes de la pared celular. Tal es caso de la nikomicina que inhibe la quitina sintetasa y de la caspofungina que inhibe la síntesis del 1,3-β-D-glucano. Como se ve, tanto los enzibióticos antifúngicos como los modernos antibióticos antifúngicos tienen el mismo propósito, que es acabar con la integridad de la pared celular fúngica para así producir su muerte.

A) **Las quitinasas** (E.C.3.2.1.14) se encuentran en una gran diversidad de bacterias donde han evolucionado con un fin fundamentalmente trófico, así como en hongos, en insectos e incluso en virus de células superiores, en plantas y en vertebrados inferiores. Los vertebrados superiores (incluido *Homo sapiens*) aunque contienen pseudogenes que sugieren una pretérita capacidad codificante no poseen la capacidad de síntesis de quitinasas y solamente en casos patológicos se ha descrito tal actividad en el hipocampo de sujetos con esquizofrenia o en casos de aneurisma de aorta. Estos enzimas se clasifican dentro de las familias 18 y 19 de las glicosilhidrolasas. Ambas familias no comparten similaridad de secuencia y así mismo muestran divergencia en su estructura tridimensional (Fukamizo 2000) poseyendo diferente mecanismo bioquímico de hidrólisis. Cuando se llevan a cabo estudios detallados de análisis de secuencia así como de ortología y paralogía se llega a la conclusión de que estos genes evolucionaron a partir de un protogen tipo lisina/lisozima de una bacteriófago o bacteria y que de él irradiaron a todos los seres por dispersión horizontal a la vez que se generaban los genes de α-lactoalbúmina en la biota del planeta. Este planteamiento se vio muy reforzado cuando en el órgano de Leydig localizado en el esófago de los escualos se detectó alta actividad de un enzima con idéntica afinidad por peptidoglucano o por quitina, con lo que no podía llamarse lisozima o quitinasa, y por tanto se estaba en presencia de un fijación arcaica evolutiva que indicaba que en un principio no existía tal diferenciación. La conclusión era por tanto obvia, por una parte los hongos (eucariotas) habían tomado de las bacterias un buen invento como es el peptidoglucano o mureína y con una simple modificación en 3 lo convirtieron en quitina, después tomaron una lisina probablemente también del mundo bacteriano y la transformaron en una quitinasa; todo esto ocurrió en el Triásico que fue el periodo geológico en el que los hongos evolucionaron más rápidamente y se estabilizaron como grupo biológico.

B) El segundo grupo de enzibiótico con actividad antifúngica lo constituyen las **1,3-β-D-glucanasas**. Actualmente se admite que el polisacárido de tipo 1,3-β-D-glucano es un típico invento fúngico y que las glucanasas que lo hidrolizan tienen también un origen eucariótico, habiendo pasado horizontalmente después los genes codificantes a bacterias que aprendieron a utilizarlos de nuevo con finalidad trófica. Como en el caso de las quitinasas, estos genes habrían permanecido activos a lo largo de la evolución eucariótica (ranas, equinodermos, angiospermas) con finalidad claramente antifúngica hasta que en vertebrados superiores (incluido de nuevo *H. sapiens*) pierden la actividad manteniendo secuencias que no se expresan. Los epitotos de las 1,3-β-D-glucanasas recuerdan claramente al de anticuerpos responsables de hipersensibilidad tipo IV por lo que no es de extrañar que nuestra propia evolución haya cerrado la expresión de estos genes y escogido la diferenciación del sistema inmunitario celular.

Al mismo tiempo, no puede uno por menos que volver la vista al mundo bacteriano y buscar por unos posibles precursores tanto del 1,3-β-D-glucano como de las 1,3-β-D-glucanasas en la propia pared bacteriana. De inmediato surge como un posible precursor parte del lipopolisacárido de la membrana externa (OM) de las bacterias Gram negativas y que se corresponde con la porción carbohidratídica del mismo. Si admitimos que esto podría ser cierto entonces las 1,3-β-D-glucanasas deberían mostrar cierta afinidad por el LPS. Estas enzimas poseen sitios denominados (βGRP) o de unión a estos glucanos y tanto las de bacterias, como las del gusano de seda (*Bombyx mori*) o de mosquitos e incluso el pez *Pacifascatus leniusculus* pasando por el erizo de mar *Strongilocentratus purpuratus* pueden unir efectivamente el lipopolisacárido, aunque aparentemente no pueden hidrolizarlo.

Dejando aparte el sugerente origen evolutivo de los enzibióticos antifúngicos, su ensayo y por supuesto su uso, están mucho más retrasados que los antibacterianos. En la actualidad se lleva a cabo en modelo animal su empleo en el control de infecciones fúngicas tópicas en los que los resultados son muy prometedores. El empleo en infecciones sistémicas está todavía en fase muy preliminar y los resultados son cuando menos controvertidos y que sin duda animan a seguir profundizando en este campo.

En definitiva, durante el siglo veinte la ecología de las enfermedades infecciosas evolucionó como una rama diferente dentro del campo de las enfermedades infecciosas y las figuras quizás más señeras fueran las de Theobald Smith y Frank Fenner junto con Mcfarlane. Todos ellos, dirigidos por un Darwinismo evolutivo raramente holístico y alejado de la visión quí-

mica reduccionista, contemplaron el proceso infeccioso bajo todos los prismas posibles y así diseñaron una epidemiología uniformemente biológica, donde los conceptos de competición y mutualismo estaban plenamente integrados. Es en esta gran nueva rama donde debemos integrar todos los aspectos relacionados con los enzibióticos sobre los que he disertado hoy y que sin duda nos ayudarán a visualizar, de una manera más biológica, la lucha contra las enfermedades infecciosas y a establecer definitivamente una sinergia con el mundo químico de los compuestos o principios activos. Espero muy sinceramente que éste sea el caso y que el siglo XXI se caracterice entre muchas otras cosas por eso. Debemos confiar en lo que nuestros maestros de genética nos han enseñado siempre y que resumo en una frase a la vez tan sencilla y complicada como esta “Confiemos en el vigor híbrido”.

Debemos también incrementar y potenciar el esfuerzo investigador dedicado a la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas, pues en el tiempo que me ha llevado exponer esta disertación una simple bacteria como la que coloniza nuestros intestinos, *E. coli*, se ha dividido entre 2 y 4 veces y han aparecido aproximadamente unos 10.000 mutantes de toda índole que incluyen lógicamente resistentes a compuestos antibacterianos. Si queremos seguir siendo la especie dominante debemos aprender a ir siempre por delante de ellas y esta puede ser una actividad científicamente muy gratificante aunque extenuante.

He dicho

REFERENCIAS

- Agu, C.A. *et al.* (2007) *Cell Microbiol* 9:1753-1765
- Akesson, M., M. Dufour, G.L. Sloan y R.S. Simmonds (2007) *FEMS Microbiology Letters* 270:155-161
- Bachrach, G., A. Leizerovici-Zigmond, A. Zlotkin, R. Naor y D. Steinberg (2003) *Letters in Applied Microbiology* 36:50-53
- Baker, J.R., C. Liu, S. Dong y D.G. Pritchard (2006) *Applied and Environmental Microbiology* 72:6825-6828
- Barrow, P., M. Lowell y A. Berchieri (1998) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5:294-298
- Becker, S.C., J. Foster-Frey y D.M. Donovan (2008) *FEMS Microbiology Letters* 287:185-191
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska y A. Gorski (2006) *Experimental Biology and Medicine* 231:366-377
- Brodgen, K.A., A.J. De Lucca, J. Bland y S. Elliot (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:412-416
- Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, E. Reynolds y H.G. Sahl (1998) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42:154-160
- Broxmeyer, L., D. Sosnowska, E. Miltner, O. Chacón, D. Wagner, J. McGarvey, R.G. Barletta y L.E. Bermúdez (2002) *The Journal of Infectious Diseases* 186:1155-1160
- Brundage, J.F. y G.D. Shanks (2008) *Emerging Infectious Diseases* 14:1193-1199
- Brussow, H (2005) *Microbiology* 151:2133-2140
- Bruttin, A. and H. Brussow (2005). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2874-2878
- Carreras-Sangrá, N. E. Alvarez-García, E. Herrero-Galán, J. Tomé, J. Lacadena, J. Alegre-Cebolla, M. Oñaderra, J.G. Gavilanes y A. Martínez del Pozo (2008) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9:153-160
- Clark, R.J. and J.B. March (2006) *Trends in Biotechnology* 24:212-218
- Cheng, Q., D. Nelson, S. Zhu y V.A. Fischetti (2005) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:111-117
- Djurkovic, S., J.M. Loeffler y V.A. Fischetti (2005) *Antimicrobial Agents*

- and Chemotherapy* 49:225-228
- Düring, K., P. Porsch, A. Mahn, O. Brinkmann y W. Gieffers (1999) *FEBS Letters* 449: 93-100
- Entenza, J.M., J.M. Loeffler, D. Grandgirard, V.A. Fischetti y P. Moreillon (2005) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:4789-4792
- Fischetti, V.A. (2006) *BMC Oral Health* 6, S16
- Fukamizo, T. (2000) *Current protein and Peptide Science* 1:105-124
- Gambichler, T., M. Skygran, J. Huyn, F.G. Bechara, M. Sand, P. Altmeyer y A. Kreuter (2006) *BMC Cancer* 6:163
- Ganz, T., M.E. Selsted y R.I. Lehrer (1990) *European Journal of Haematology* 44:1-8
- García, P., J.L. García, E. García, J.M. Sánchez-Puelles y R. López (1990) *Gene* 86:81-88
- Gazit, E., A. Boman, H.G. Boman y Y. Shai (1995) *Biochemistry* 34:11479-11488
- Graham, S., P.J. Coote (2007) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59:759-762
- Grandgirard, D., J.M. Loeffler, V. Fischetti y S.L. Leib (2008) *Journal of Infectious Diseases* 197:1519-1522
- Henzler-Wildman, H.K.A., D.K. Lee y A. Ramamoorthy (2003) *Biochemistry* 42:6545-6558
- Hermoso, J.A., J.L. García, and P. García (2007) *Current Opinions in Microbiology* 10:6461-472
- Hoq, M.I., K. Mitsuno, Y. Tsujino, T. Akoi y H.R. Ibrahim (2008) *International Journal of Biological Macromolecules* 42:468-477
- Imura, Y., N. Choda y K. Matsuzaki (2008) *Biophys J.* 95:5757-5765
- Jacob, F., y C.R. Fuerst (1958) *Journal General Microbiology* 18:518-526
- Jado, I., R. López, E. García, A. Fenoll, J. Casal y P. García (2003) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:32-40
- Jikia, D., N. Chakhaidze, E. Imedashvilli, I. Mgaloblishi, F. Tstlanadze, R. Katsarava, J.G. Morris y A. Sulakvelidze (2005) *Clinical and Experimental Dermatology* 30:23-26
- Klüver, E., K. Adermann y A. Schulz (2006) *Journal of Peptide Sciences*, 12:243-257
- Kokai-Kun, J.F., T. Chanturiya and J.J. Mond (2007) *Journal of Antimicro-*

- bial Chemotherapy*, 60:1051-1059
- Kreling, D.H., J.B. Mott, J. Wiederholt, J. Lundy, and L. Levitt (2001) Prescription drugs trend. A chartbook update. Menlo park, CA: The Henry J. Kaiser Family Foundation.
- Kumar, J.K. (2008) *Applied Microbiology and Biotechnology* 80:555-561
- Kusuma, C., A. Jadanova, T. Chanturiya y J.F. Kukay-Kun (2007) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51:475-482
- Lacadena, J., E. Alvarez-García, N. Carreras-Sangrá, E. Herrero-Galán, J. Alegre Cebolla, L. García Ortega, M. Oñaderra, J.G. Gavilanes y A. Martínez del Pozo (2007) *FEMS Microbiology Reviews* 31:212-237
- Lai, A.C.-Y, S. Tran y R.S. Simmonds (2002) *FEMS Microbiology Letters* 215:133-138
- Lehrer R.I., A. Barton, K.A. Daher, S.S. Harvig, T. Ganz y M.E. Selsted (1989) *Journal of Clinical Investigation* 84:553-561
- Livermore, D. 2003. *Clinical Infectious Diseases* 36: S11-S36
- Loeffler, J.M., D. Nelson y V.A. Fischetti (2001) *Science* 294:2170-2172
- Loeffler, J.M, y V.A. Fischetti (2003) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:375-377
- Loeffler, J.M., S. Djurkovic y V.A. Fischetti (2003) *Infection and Immunity* 71:6199-6204
- Loessner, M.J., K. Kramer, F. Ebel y S. Scherer (2002) *Molecular Microbiology* 44:335-349
- Low, L., C. Yang, M. Perego, A. Osterman y R.C. Liddington (2005) *Journal of Biological Chemistry* 280:35433-35439
- Luque-Ortega, J.R. W. van't Hof, E.C. Veerman, J.M. Saugar y L. Rivas (2008) *FASEB Journal* 22:1817-1828
- Mader, J.S., D. Smyth, J. Marshall y D.W. Hokin (2006) *American Journal of Pathology* 169:1753-1766
- Masschalck, B. y C.W. Michiels (2003) *Critical Reviews in Microbiology* 29:191-214
- McCullers, J.A., A. Karlstrom, A.R. Iverson, J.M. Loeffler y V.A. Fischetti (2007) *PLoS. Pathogenesis* 3:e28
- Murzin A, A. Lesk, y C. Chothia (1994). *J Mol Biol.* 236:1369-1381
- Nelson, D., R. Schuch, P. Chahales y V.A. Fischetti (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*

103:10765-10770

- Nes, I.F., D.B. Diep y H. Holo (2007) *Journal of Bacteriology* 189:1189-1189
- Oluola, O., L. Kong, M. Fein, y L.E. Weigman (2007) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51:2198-2200
- Orito, Y. M. Morita, K. Hori, H. Unno, y Y. Tanji (2004) *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:105-109
- Parisien, A., B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville y C.Q. Lan (2008) *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13
- Park, C.B., H.S. Kim y S.C. Kim (1998) *FEBS Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:253-257
- Patron, R.L., M.W. Climo, B.P. Goldstein y G.L. Archer (1999) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1754-1755
- Patrzykat, A., C.L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza y R.E. Hancock (2002) *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 46:605-614
- Peschel, A. y S.G. Shal (2006) *Nature Reviews Microbiology* 4:529-536
- Porter, C.J. et al., (2007) *Journal of Molecular Biology* 366:540-550
- Pritchard, D.G., S. Dong, M.C. Kirk, R.T. Cartee y J.R. Baker (2007) *Applied and Environmental Microbiology* 73:7150-7154
- Rashel, M., J. Uchiyama, T. Ujihara, Y. Uehara, S. Kuramoto et al., (2007). *The Journal of Infectious Diseases* 196:1237-1247
- Rodríguez Cerrato, V. et al., (2007) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60:1159-1162
- Romeo, D., B. Skerlajav, M. Bolognesi y R. Gennaro (1988) *Journal of Biological Chemistry* 263:9573-9575
- Skarnes, R.C. y D.W. Watson (1957) *Bacteriology Reviews* 21:273-294
- Sava, G. (1996) *EXS* 75:433-449
- Schindler, C. A. y V.T. Schuhardt (1964) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 51:414-420
- Schuch, R., D. Nelson y V.A. Fischetti (2002) *Nature* 418:884-889
- Shishniashvili, T.E. (1999) *Medical Journal of Australia* 2:71-78
- Simmonds, R.S., J. Naidoo, C.L. Jones y J.R. Tagg (1995) *Microbial Ecology in Health and Disease* 8:281-292
- Slopek, S., I. Durlakowa, B. Weber-Dabrowska, A. Kucharewicz-Krukowska, M. Dabrowski y R. Bisikiewicz (1983) *Archivum*

- Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 31:267-291
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich y H.G. Boman (1981) *Nature* 292:246-248
- Subbalakshmi, C. y N. Sitaram (1998) *FEMS Microbiology Letters* 160: 91-96
- Sulakvelidze A., Z. Alavidze Jr., y J.G. Morris (2001) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:649-659
- Sulakvelidze A. and E. Kutter (2005) bacteriophage therapy in humans. In *Bacteriophages: Biology and Applications*, ed. E. Kutter and A. Sulakvelidze. Boca Raton, FL: CRC Press 99
- Talbot, G.H., J. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, and J.G. Bartlett (2006). *Clinical Infectious Diseases* 42, 657-668
- Walsh, S., A. Shah y J. Monod (2003) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:554-558
- Wang, I. N., D.L. Smith y R. Young (2000) *Annu Rev. Microbiol* 54:799-825
- Weber-Dabrowska, B., M. Dabrowski y S. Slpek (1985) *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 35_261-273
- Westwater, C., L.M. Kasman, D.A. Schofield, P.A. Werner, J.W. Dolan, M.G. Schmidt, y J.S. Norris (2003) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1301-1307
- Wimley W.C. (2003). *Curr Opin Struct Biol* 13: 404-1
- Witzenrath, M. *et al.*, (2008) *Critical Care Medicine* 37:642-649
- Wollmer, W., B. Joris, P. Charlier, y S. Foster (2008) *FEMS Microbiology Reviews* 32:259-286
- Wong, J.H., L. Xia y T.B. Ng (2007) *Current Protein and Peptide Science* 8:446-459
- Workshop Summary. 1998. Antimicrobial Resistance: *Issues and Options*. Washington DC: Institute of Medicine, National Academic Press
- Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding y H.W. Huang (2001) *Biophysics Journal* 81:1745-1485
- Yang, X.Y. *et al.*, (2007) *Journal of Meical Microbiology* 56:71-76
- Yoong, P., R. Schuch, D. Nelson y V.A. Fischetti (2004) *Journal of Bacteriology* 186:4808-4812
- Yoong, P., R. Schuch, D. Nelson y V.A. Fischetti (2006) *Journal of Bacteriology* 188:2711-2714
- Young, R., I.N. Wang y W.D. Roof (2000) *Trends in Microbiology* 8:

120-128

Zanetti, M. (2005) *Current Issues in Molecular Biology* 7:179-196

Zasloff, M. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of America* 84:5449-5453

Zimmer, M., N. Vukov, S. Scherer y M.J. Loessner (2002) *Applied and Environmental Microbiology* 68:5311-5317

**CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO EN
LA ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA
DEL**

ILMO. SR. DR. TOMÁS GONZÁLEZ VILLA

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO

ILMO. SR. DR. RAMÓN MARTÍNEZ PACHECO

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

Exmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia,
Exmos. e Ilmos. Sras. y Sres. Académicos,
Sras. y Sres.

Hoy ingresa en la Academia de Farmacia de Galicia, como académico de número, uno de los pioneros y de los principales impulsores del desarrollo de la Biotecnología en Galicia. Quisiera, en primer lugar, agradecer a la Academia la distinción que me hace al otorgarme su representación para dar la bienvenida al Prof. Tomás González Villa al que, además, me une una sincera amistad que se mantiene desde hace casi tres décadas.

Aunque natural de la ciudad de León, el Prof. González Villa pasó las primeras etapas de su vida en Astorga, villa de larga y singular historia, en la que confluyen los caminos Francés y de la Plata de la Ruta Jacobea. Allí decidió cursar los estudios de Ciencias Biológicas en la Universidad de Salamanca, en la que se licenció en 1973 y en la que, de forma inmediata, se incorporó al Dpto. de Microbiología para realizar su tesina de licenciatura y, tras conseguir una beca el Plan del Formación de Personal Investigador, su tesis doctoral bajo la dirección del Prof. Rodríguez Villanueva, quien ha sido su mentor a lo largo de su carrera universitaria.

En este mismo año, 1976, una beca del Comité Conjunto Hispano Americano le permitió trasladarse al Dpto. de Food Science & Technology de la Universidad de California en Davis en el que el Prof. Hermann Jen Phaff le facilitó la realización de una estancia postdoctoral amplia y fructífera, centrada en el estudio de los carotenoides de origen microbiano. Durante esta estancia, el Prof. González Villa comienza a asistir a las reuniones del Grupo de Biotecnología en Asilomar, que está considerado como la cuna de la biotecnología mundial.

A su regreso a España, comienza a desarrollar su actividad docente en la entonces incipiente Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, que interrumpe únicamente para realizar una estancia en el Dpto. de Bioquímica de la Universidad de Cambridge en el Reino Unido, y en 1980 ingresa, como número uno de su oposición, en el Cuerpo de Profesores Adjuntos de Universidad en el área de Microbiología, quedando adscrito a la Universidad de Salamanca, en cuya Facultad de Farmacia continúa desarrollando sus labores docentes. Poco duraría esta situación puesto que, en enero de 1983, obtuvo la plaza de profesor agregado de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, accediendo pocos meses después a la cátedra que sigue desempeñando en la actualidad. Estos 27 años de docencia en el Dpto. de Microbiología de la Universidad de Santiago, del que fue director entre 1987 y 1996, el Prof. Villa los ha compatibilizado con la de la Titulación Propia de Biotecnología, de la que fue director hasta su extinción en 2006 y con la del actual Máster Oficial de Biotecnología, del que es coordinador desde su creación.

Paralelamente a las actividades docentes y de gestión que acabo de esbozar, el Prof. González Villa ha desarrollado una amplísima labor investigadora, en cuyo análisis vuelve a mostrarse esa interesante combinación microbiología-biotecnología a la que he aludido previamente. Entre las principales líneas que ha cultivado, me gustaría resaltar las siguientes:

- Estudio genético y bioquímico de autolisinas de hongos y levaduras, cuyo desarrollo ha contribuido al entendimiento del modo de acción de las familias antifúngicas papulacandina y echinocandina.
- Análisis y estudio de pigmentos carotenoides (astaxantina y cantaxantina) en su doble vertiente de uso alimentario y de antioxidante.
- Biotecnología enológica de los vinos gallegos, de amplia y directa repercusión industrial, centrada en la mejora de las cepas de

levaduras enológicas mediante la heterotalización de cepas silvestres y el estudio y los controles microbiológico y bioquímico de la fermentación maloláctica en enología. El desarrollo de esta línea ha dado lugar a la creación de una bodega experimental

- Clonación e ingenierización de enzimas de uso industrial para la producción de pectinasas, floculasas y proteasas, de indudable interés para las industrias lácteas.
- Investigación sobre enzibióticos activos frente a *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente y bacterias relacionadas y uso de porinas como potenciadoras de antibióticos y enzibióticos

El desarrollo de estas importantes líneas de investigación ha sido posible gracias a la financiación obtenida, a través de más de una treintena de proyectos en los que el Prof. Villa ha sido investigador principal, en convocatorias europeas, nacionales, autonómicas, provinciales y de fundaciones privadas como la Ramón Areces o la Arao. La publicación de más de 160 artículos en revistas de la especialidad, más de 130 comunicaciones a congresos y la generación de 6 patentes son buena prueba de la fructífera labor investigadora desarrollada por el Prof. González Villa. Además, ha dirigido más de una veintena de tesis doctorales y, lo que es más importante, muchos de sus discípulos son profesores universitarios, entre ellos algunos ya catedráticos, o destacan en diversas actividades profesionales.

El tema seleccionado por el Prof. Villa para su discurso de ingreso debo calificarlo de muy interesante y actual y de él, estoy seguro, todos hemos aprendido mucho. No es casual que este tema se inscriba en una de sus líneas de investigación más novedosas, ni que haya publicado muy recientemente un libro sobre enzibióticos, editado por una firma de tanto prestigio internacional como J.Wiley & Sons.

El nuevo académico nos ha introducido en el tema de los enzibióticos a través de una breve reseña histórica que nos hace recordar el título del nostálgico poemario de Ruiz Rubiano “Lo que pudo haber sido y no fue” al poner de relieve que la terapia antimicrobiana quizá hubiera transitado por caminos muy diferentes de los que ha seguido sino se hubiese relegado al ostracismo científico, durante más de tres décadas, el estudio de las propiedades antimicrobianas de los fagos y de sus lisinas, como consecuencia de lo que podríamos llamar la “fiebre” de los antibióticos.

Es innegable que el interés por los antibióticos responde al hecho de que, al ser en su mayoría moléculas pequeñas, resultan más adecuadas para ser manejadas como fármacos e incorporadas a sistemas de dosificación,

en tanto que la utilización terapéutica de los fagos, e incluso de sus lisinas purificadas, presenta una complejidad química, biológica y tecnológica difícilmente abordable cuando se introdujeron los antibióticos. Hoy en día, el nivel de desarrollo que han alcanzado las técnicas de identificación rápida y de aislamiento de microorganismos y, desde otro punto de vista, la farmacocinética y la tecnología farmacéutica, que está ya en condiciones de abordar la formulación de fármacos de estructuras cada vez más complejas, permite vislumbrar que los obstáculos que dificultaron la aplicación práctica de los enzibióticos, puedan ser superados en un futuro no muy lejano.

La ampliación del concepto de enzibiótico, más allá de los fagos y de sus lisinas, sobre la que nos ha ilustrado tan elocuentemente el Prof. González Villa, puede contribuir además a ampliar el ámbito de potenciales aplicaciones, no sólo como alternativas a los antibióticos convencionales sino también como coadyuvantes o potenciadores de su acción antimicrobiana. Por ejemplo, la disponibilidad de las porinas y las holinas abre la posibilidad de extender el espectro de los antibióticos y las quitinasas y las glucanasas podrían ampliar el uso de los enzibióticos en la terapia antifúngica.

La llegada del nuevo académico viene a reforzar a nuestra Academia en dos áreas tan importantes como la Microbiología y la Biotecnología y estoy seguro de que con sus conocimientos, su experiencia y su trabajo, va a contribuir de una manera muy eficaz a que la Academia de Farmacia de Galicia cumpla los objetivos que tiene encomendados. Por todo ello, Tomás, me alegro sinceramente por tu incorporación a esta institución, felicito a la Academia por una elección tan acertada y a ti por tu brillante discurso. Mi gustaría finalmente hacer extensivas estas felicitaciones a tu mujer, Beni, y a tus hijas Clara, Beatriz y Silvia todas ellas ligadas, a través de sus distintas actividades, al ámbito sanitario,

Muchas gracias.

Este discurso se leyó
el día 22 de septiembre de 2010