

CARRERA CONTRA LAS INFECCIONES BACTERIANAS

LAS ENDOLISINAS, ENZIMAS DE LOS BACTERIÓFAGOS, NUEVA HERRAMIENTA CONTRA LAS RESISTENCIAS QUE PUEDE ACTUAR ANTES DE LA INFECCIÓN

Los enzibióticos progresan en un momento clave

→ Cuando aparecieron antibióticos como la penicilina y las sulfamidas, la opción de usar los bacteriófagos para luchar contra las infecciones bacterianas quedó enterrada. En los últimos años esta vía se ha recuperado en

un intento de hacer frente a la capacidad de resistencia farmacológica de las bacterias. Las endolisinas superan este problema y actúan antes de la infección: los enzibióticos progresan y miran hacia la clínica.

■ José A. Plaza

Uno de los mayores problemas en torno a las infecciones bacterianas es la resistencia a los antibióticos. Cada vez hay menos herramientas para luchar contra ellas y las terapias que normalmente se utilizan pierden efectividad debido a que se basan en antibióticos desarrollados con muy pequeñas variaciones entre sí. El coste es menor, pero la resistencia aparece mucho antes.

Juan A. Hermoso es un físico teórico inmerso en el mundo de la medicina. Sabedor de que la multidisciplinariedad es el mejor camino, se vale de la investigación básica para, rodeado de biólogos, bioquímicos, informáticos y médicos, mejorar la comprensión de la biología estructural de los patógenos. Desde hace años ha hecho de los enzibióticos su campo de trabajo en el Instituto de Física-Química Rocasolano, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



Juan A. Hermoso, en su laboratorio del Instituto de Física-Química Rocasolano, en Madrid.

De lo básica a la clínica

Según ha explicado a DIARIO MÉDICO, ciertas enzimas de los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) llamadas endolisinas pueden usarse como nuevas herramientas terapéuticas contra las infecciones bacterianas. Estos enzibióticos ya han demostrado éxito en modelo animal en el control de infecciones causadas por bacte-

rias patógenas resistentes a antibióticos.

El proceso pertenece de lleno a la investigación básica, pero mira de reojo a la clínica. Las endolisinas presentan dominios específicos que permiten a la enzima anclarse selectivamente sobre una pared bacteriana concreta y, además, poseen un módulo catalítico capaz

de hidrolizar el peptidoglicano bacteriano.

Hermoso no sólo confía en la "sorprendente diversidad catalítica de estas enzimas; también han proporcionado avances en su organización modular, en sus estructuras tridimensionales a nivel atómico y en su mecanismo de reconocimiento de la pared bacteriana".

Se ha mostrado por primera vez cómo la proteína se une y degrada la pared de las bacterias, un resultado que puede ser clave para el desarrollo de los enzibióticos. Todos estos resultados "permiten considerar a las endolisinas como efectivos bactericidas con importantes aplicaciones en medicina y biotecnología".

El equipo de Hermoso se está valiendo de una herramienta que los bacteriófagos "llevan utilizando durante millones de años. Estos virus utilizan las bacterias como incubadoras para crear copias de sí mismos. Inyectan el material genético dentro de la bacteria y cuando se han producido las copias de los viriones se

Las endolisinas pueden utilizarse en la fase de transporte para eliminar la población bacteriana sin necesidad de llegar al proceso infeccioso

Los enzibióticos podrán desarrollarse a la carta. Se puede crear un solo superenzibiótico, pero también un cóctel con diferentes tipos

Los ensayos en humanos, favorecidos por la especificidad: los enzibióticos no dañan la flora bacteriana necesaria para el organismo

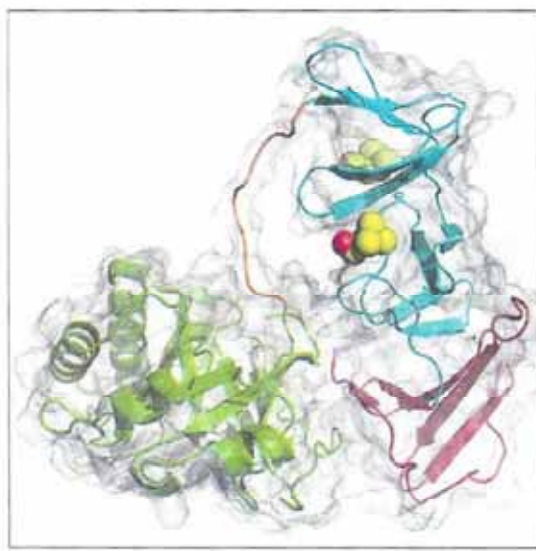
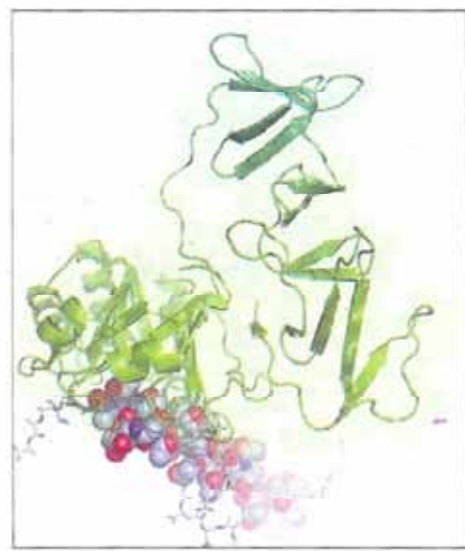
rompe la bacteria madre y se libera la progenia fágica". Es en este momento cuando los virus producen unas proteínas concretas, las endolisinas, que a su vez crean las holinas para hacer poros en las membranas y liberar las endolisinas. Tras reconocer el peptidoglicano, rompe la estructura de la pared celular bacteriana. Las endolisinas están diseñadas para ser específicas de un tipo de bacterias y destruir unos enlaces determinados de peptidoglicano. Una vez rota la pared, "se libera la progenia fágica y continúa el proceso infeccioso".

Solución enterrada

Aunque desde su descubrimiento se pensó en los bacteriófagos como posible herramienta para luchar contra las infecciones bacterianas, el posterior hallazgo de antibióticos como la penicilina y los sulfamidas hizo que su uso se abandonara completamente. La eficacia de los antibióticos no tenía comparación con los bacteriófagos y, además, los problemas asociados de utilizar un organismo "vivo" no fa-

Todo en 3D

Sus imágenes muestran la estructura en tres dimensiones del enzibiótico Cpl-1. En la figura de la izquierda se ve la Cpl-1 unida a un fragmento de la pared bacteriana. En la figura de la derecha se representa en verde el módulo catalítico que hidroliza el peptidoglicano. En azul y morado aparece el módulo de anclaje a la pared bacteriana. Ambos módulos se encuentran unidos por un conector (naranja). En amarillo se observan las moléculas de colina que reconocen la pared bacteriana.



CARRERA CONTRA LAS INFECCIONES BACTERIANAS

vorecían su uso. Por esta razón, se ha optado por "utilizar no tanto los bacteriófagos sino las herramientas que utilizan éstos para luchar contra las infecciones".

La vía de estudio de Hermoso, que trabaja en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), está centrada en dos ámbitos. El primero se concentra en el conocimiento de la estructura tridimensional de los enzimbóticos y sus endolisinas, una cuestión compleja debido a su tamaño nanométrico y a que sólo puede contemplarse con la cristalografía de rayos X. El segundo refiere a la clínica, aunque aún queda tiempo para alcanzar esta fase. Las investigaciones *in vitro* e *in vivo* han evaluado su espectro de actuación, su efectividad, su capacidad de eliminar bacterias altamente resistentes a penicilina y su resistencia, entre otros factores. Los resultados, por el momento, son muy positivos y, de he-

Los bacteriófagos son letales. Cada 48 horas destruyen la mitad de la población mundial de bacterias y han aprendido a manejar las resistencias

cho, una empresa estadounidense, Enzibiotics, ya trabaja en este tipo de terapias a escala industrial.

Dos publicaciones clave
Hermoso recuerda que, cuando empezó a trabajar en este campo, aún no se conocía estructura alguna de las endolisinas. En 2003 publicaron en la revista *Structure* la primera estructura tridimensional de una endolisina y, en 2007, dieron un paso más allá en *Journal of Biological Chemistry* y en *Current Opinion in Microbiology* al añadir a esta estructura su unión con un fragmento de la pared bacteriana.

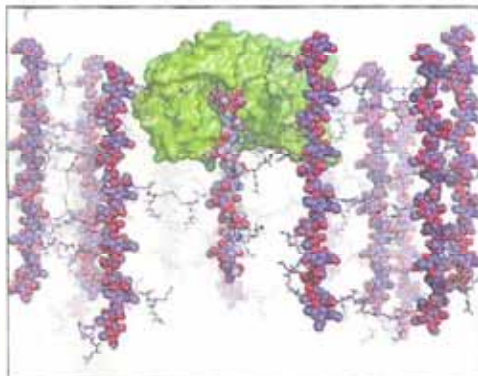
Para ello ha sido necesario obtener, mediante el uso de robots de cristalización, microcristales del complejo Cpl-1 con el peptidoglicano y, posteriormente, irradiarlos con rayos X generados por un potente acelerador de partículas. La estructura tridimensional muestra que Cpl-1 presenta dos módulos proteicos bien diferenciados: uno de anclaje que permite a Cpl-1 unirse específicamente a las moléculas de colina sólo presentes en la pared del neumococo y otro proteico dotado de maqui-

naria catalítica de degradación del peptidoglicano.

Hermoso está asombrado de sus hallazgos y reconoce que se trata de "un mecanismo muy astuto". Su grupo trabaja con endolisinas de fagos que infectan al neumococo, que tiene en su pared celular las moléculas de fosforilcolina. "Las endolisinas las reconocen específicamente para hidrolizar la pared del neumococo y no la de otro tipo de bacteria".

Los antibióticos actúan en el momento en que se desarrolla la infección. No se pueden utilizar antes porque se crearían resistencias demasiado pronto, y es aquí donde las endolisinas presentan una gran ventaja. "Podrían utilizarse en la fase de transporte para eliminar la población bacteriana sin necesidad de alcanzar el proceso infeccioso y sin problemas de resistencia", ha explicado Hermoso, que ha apuntado que los bacteriófagos llevan millones de años utilizando este proceso sin que hayan encontrado resistencia alguna.

De hecho, define a los bacteriófagos como "letales. Cada 48 horas eliminan la mitad de la población mun-



El enzimbótico, contra la pared

En este modelo se puede ver la interacción de la endolisina del bacteriófago Cpl-1 (que aparece en color verde) con la pared bacteriana.

dial de bacterias; su capacidad de destrucción es impresionante. A lo largo de millones de años de evolución han detectado las moléculas fundamentales en la bacteria y para las que no pueden encontrar fácilmente un mecanismo de resistencia". En pocas palabras, han aprendido y van a tiro hecho.

En otitis media

Estudios recientes han mostrado que su aplicación es

más efectiva de lo que podía pensarse, ya que son capaces de eliminar de las mucosas la población de bacterias patógenas. Se ha comprobado que, *in vitro* e *in vivo*, la adición de estas endolisinas purificadas eliminaban *Streptococci* del grupo A y *Streptococcus pneumoniae* de la nasofaringe de animales colonizados experimentalmente. Más recientemente se ha descrito un modelo animal que reproduce las infecciones en el

oído medio (otitis media). En el modelo, los ratones eran infectados por vía intranasal primero con *S. pneumoniae* y posteriormente con virus influenza (se supone que la otitis media involucra también virus respiratorios como el influenza). De esta manera se ha demostrado que la endolisina del fago Cpl-1 (Cpl-1) específica por neumococo era "no solamente capaz de eliminar la colonización con *S. pneumoniae*, sino también de prevenir el desarrollo de otitis media en los ratones".

A por las Gram negativas

Con el conocimiento de que es posible atacar las poblaciones en las mucosas y eliminar no sólo el neumococo sino también otros microorganismos, los investigadores se han planteado el reto de estudiar las infecciones con bacterias Gram negativas, que tienen una pared celular diferente: "Además del peptidoglicano, disponen de una membrana externa que impediría el uso de este tipo de endolisinas desde fuera, ya que no podrían acceder al interior del peptidoglicano y romper la pared celular". Para superar esta barrera Hermoso trabaja en la detección de endolisinas de bacterias Gram negativas y en la determinación estructural de estos posibles enzimbóticos. Ya se han identificado nuevos mecanismos de reconocimiento de la pared bacteriana y otros enzimbóticos que reconocen, además de las moléculas de fosforilcolina, otras partes de la pared bacteriana.

Por el momento, la idea es preparar enzimbóticos sinérgicos para aprovechar la acción conjunta, más efectiva que la de una presencia única. Estos cócteles podrán hacerse a la carta gracias a diferentes posibilidades. Una consiste en crear "un superenzimbótico añadiendo módulos que reconozcan diferentes partes o funciones de la bacteria, mientras que otra permitiría desarrollar un cóctel con distintos tipos de enzimbóticos mezclados que barran un espectro de infecciones más amplio".

Autolisinas

Más allá del uso de las lisinas de los fagos, una de las utilidades que empiezan a conocerse es la utilización de las propias autolisinas de las bacterias. Ya que el neumococo "tiene unas autolisinas que rompen su propia pared bacteriana en la reproducción, podrían combi-

narse con las endolisinas de los fagos para hacer un enzimbótico mucho más potente", ha explicado Hermoso.

La investigación básica avanza de forma positiva. Tras pasar la fase de ensayos animales "podríamos pensar en ensayos clínicos en humanos, algo que puede verse favorecido por la especificidad de esta terapia, ya que los enzimbóticos pueden utilizarse sin dañar el resto de la flora bacteriana que el organismo necesita". Por el contrario, los antibióticos no son selectivos y eliminan bacterias inocuas e incluso beneficiosas.

En cuanto a información estructural y ensayos *in vivo*, las noticias son buenas. "Es un momento prometedor, pero será el tiempo el que nos de la respuesta. El tiempo de aplicación de este tipo de terapias puede ser corto, si se habla dentro de los parámetros de la llegada de una molécula". De hecho, no será necesario desarrollar una molécula cada vez, ya que "se pueden aprovechar las endolisinas

El tiempo de desarrollo será corto. No habrá que producir una molécula cada vez, ya que se aprovechan las endolisinas producidas por el bacteriófago

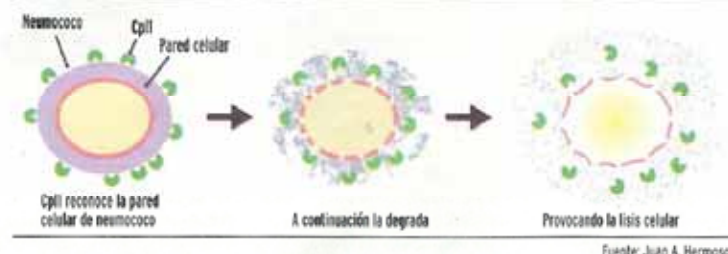
ya producidas y sintetizadas por los bacteriófagos".

Existe toda una batería de posibles enzimbóticos sobre la mesa y "sólo se trata de elegir las endolisinas implicadas en las infecciones de la bacteria patógena con la que se está trabajando. Se podrán desarrollar en un tiempo relativamente corto".

Diferentes presentaciones

En definitiva, los resultados obtenidos en la caracterización de las endolisinas abren "nuevas vías farmacológicas para desarrollar mediante técnicas proteómicas nuevos agentes antimicrobianos aún más potentes y específicos". Los enzimbóticos limitan la dispersión de la enfermedad y eliminan a la bacteria diana por contacto, por lo que "estas enzimas podrían usarse como componentes de aerosoles antibacterianos, pastillas, colutorios, vendas y colirios como alternativa efectiva a los antibióticos convencionales".

Lisis celular provocada por la endolisina Cpl1



Esquema del ciclo lítico de los bacteriófagos

