



Universidad
de Navarra

EMPLEO DE ENDOLISINAS FRENTE A BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica

Curso 2022-2023

Autor: Ander Amate Merino

Tutor: Guillermo Martínez de Tejada

ÍNDICE

Resumen	2
1. Selección de la bibliografía	2
2. Introducción	4
2.1. Envoltura celular de Gram-negativas	4
2.2. Ciclo lítico de bacteriófagos	6
2.3. Resistencia a los antimicrobianos	8
3. Estrategias alternativas a los antibióticos	10
3.1. Péptidos antimicrobianos	10
3.2. Vacunas	11
3.3. CRISPR/Cas	13
3.4. Terapia con fagos	13
3.5. Endolisinas	15
4. Endolisinas	16
4.1. Precedentes históricos	16
4.2. Estructura y clases de endolisinas naturales	17
4.3. Endolisinas recombinantes	20
5. Ensayos clínicos	21
5.1. Mejora de la permeabilidad de la membrana a las endolisinas	22
6. Productos comercializados	23
7. Discusión y perspectivas	25
8. Conclusiones	26
Bibliografía	27

RESUMEN

El creciente problema de las resistencias a los antibióticos ha causado que se empiecen a buscar y desarrollar alternativas para tratar las infecciones que han sido provocadas por bacterias patógenas. Una de estas alternativas que está llegando con fuerza son las endolisinas, unas enzimas líticas derivadas de los bacteriófagos que tienen como objetivo la lisis de las bacterias al actuar sobre la pared celular. Gracias a ventajas que poseen, como lo son su alta especificidad o su ausencia de resistencias, son una alternativa muy prometedora para desplazar a los antibióticos, aunque aún deben demostrar su superioridad sobre estos. Sin embargo, las bacterias Gram-negativas presentan una capa externa más compleja y resistente que las hace menos susceptibles a la acción de las endolisinas respecto a las bacterias Gram-positivas. A día de hoy se están desarrollando nuevas estrategias para mejorar su acción contra las bacterias Gram-negativas y convertirlas en una opción viable para el tratamiento de infecciones bacterianas.

1. SELECCIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

SECCIÓN DE LA MEMORIA	TÉRMINOS EMPLEADOS	Nº RESULTADOS	REVISIONES
Introducción	“enzybiotics”[Title/Abstract] AND “gram negative”[Title/Abstract]	13	6
	("enzybiotics"[Title/Abstract] AND "gram negative"[Title/Abstract]) NOT "gram positive"[Title/Abstract]	5	1
	“endolysin”[Title/Abstract] AND “gram negative”[Title/Abstract]	139	18
	("Endolysin"[Title/Abstract] AND "gram negative"[Title/Abstract]) NOT "gram positive"[Title/Abstract]	81	6
	("lysine"[Title/Abstract] AND "gram negative"[Title/Abstract]) NOT "gram positive"[Title/Abstract]	343	24
	"endolysin"[Title/Abstract] AND "e coli"[Title/Abstract]	98	4
	"lysine"[Title/Abstract] AND "e coli"[Title/Abstract]	1 513	16

Envoltura celular	"cell wall"[MeSH Terms] AND "gram negative"[Title/Abstract]	1 045	165
Bacteriófagos	"bacteriophages"[MeSH Terms]	61 520	3 660
	"bacteriophages"[MeSH Terms] AND "life cycle"[Title/Abstract]	377	68
	"bacteriophage resistance"[Title/Abstract]	139	18
Resistencias	"antibiotic resistance"[MeSH Terms]	181 491	20 322
	"antibiotic resistance" [Title/Abstract]	48 921	7 492
	"antibiotic resistance" [Title/Abstract] AND "mortality" [Title/Abstract]	2 833	743
	"antibiotic resistance" [Title/Abstract] AND "incidence" [Title/Abstract]	2 392	415
Alternativas a los antibióticos	"antimicrobial peptides"[Title/Abstract]	15 371	3 015
	"antimicrobial peptides"[MeSH Terms]	33 306	3 153
	"vaccine"[MeSH Terms] AND "antibiotic resistance"[MeSH Terms]	2 069	571
	"vaccine"[Title/Abstract] AND "antibiotic resistance"[Title/Abstract]	1 229	317
	"crispr"[Title/Abstract] AND "antibiotic resistance"[Title/Abstract]	355	55
	"phage therapy"[MeSH Terms]	748	280
	"bacteriophage therapy"[Title/Abstract]	617	170
	"phage therapy"[Title/Abstract]	2 199	619
Ensayos clínicos	"endolysin"[Title/Abstract] AND "clinical trials"[Title/Abstract]	14	11
Productos comercializados	"endolysin"[Title/Abstract] AND "commercial products"[Title/Abstract]	0	0
	"artilysin"[Title/Abstract]	7	4

La búsqueda bibliográfica se realizó principalmente en la base de datos PubMed, empleando los términos de búsqueda señalados en la tabla, entre las fechas 23 de enero y 20 de abril de 2023. Sin embargo, como muchas de las estrategias de búsqueda empleadas daban demasiados resultados se descartaron y se probó con otras, centrando la búsqueda en aquellas las que proporcionaban un número más manejable de resultados. Posteriormente, se eligieron aquellos

artículos que tenían el texto completo gratuito, que estaban redactados en inglés y que proporcionaban un contenido interesante y acorde a lo que se quería escribir.

En el apartado de ensayos clínicos se buscó, además de en PubMed, en ClinicalTrials.gov con el fin de ver los ensayos clínicos en curso o ya realizados con endolisinas en bacterias Gram-negativas.

Por otro lado, se eligieron revisiones cuando lo que se pretendía era ampliar la información ya escrita.

2. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos es uno de los mayores de la humanidad, puesto que han ayudado a salvar millones de vidas. Llevan con nosotros desde tiempos inmemoriales, ya que hay constancia de que muchas culturas antiguas los empleaban. Sin embargo, en los últimos años se ha empezado a mostrar gran preocupación ante la creciente resistencia a los antimicrobianos que incluso se considera una de las mayores amenazas para salud en todo el mundo (1). Por ello, surge la necesidad de buscar alternativas a los antibióticos y una de estas alternativas es el empleo de enzibióticos, como las endolisinas.

Las endolisinas derivadas de bacteriófagos son enzimas hidrolasas de la pared celular que son capaces hidrolizar la capa de peptidoglicano desde dentro y fuera de los patógenos bacterianos (2), pudiendo de esta forma servir como tratamiento frente a infecciones bacterianas.

2.1. Envoltura celular de Gram-negativas

La pared celular de las bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, es una estructura de vital importancia para la vida de la bacteria. Pese a que ambos tipos de bacterias presentan esta estructura, poseen algunas variaciones que las diferencian. La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas consta de dos subestructuras. Una bicapa lipídica que rodea el citoplasma bacteriano y una gruesa capa de peptidoglicano. Por otro lado, las bacterias Gram-negativas poseen una envoltura celular más compleja, ya que está compuesta de dos bicapas lipídicas que dejan un pequeño espacio entre ambas, el periplasma, donde se sitúa la capa de peptidoglicano (3).

Las bacterias Gram-positivas presentan una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que las Gram-negativas, que además la tienen unida a la membrana externa por medio de lipoproteínas. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas no se trata de una bicapa de fosfolípidos, sino que consta de fosfolípidos en el lado interno de la membrana y lipopolisacáridos en el externo (4). De hecho, la membrana externa está formada por un 40% de lipopolisacáridos, aproximadamente, lo que la convierte en una membrana muy hidrofílica impidiendo de esta forma la entrada de pequeñas moléculas hidrofóbicas, lo que incluye muchos tipos de antibióticos. Esto hace que las bacterias Gram-negativas sean resistentes de forma innata a muchos compuestos antimicrobianos (4, 5). Además, la membrana externa también puede presentar porinas, que consisten en proteínas con función de transporte. Son un tipo de proteínas que sirven como canales de difusión muy importantes puesto que todas las moléculas hidrofílicas las atraviesan a la hora de penetrar en la membrana externa de la bacteria. Forman poros que solo posibilitan el paso de solutos de bajo peso molecular, excluyendo a aquellos cuyo tamaño excede el del poro, pero también existen tipos de porinas específicas para una determinada clase de solutos (5).

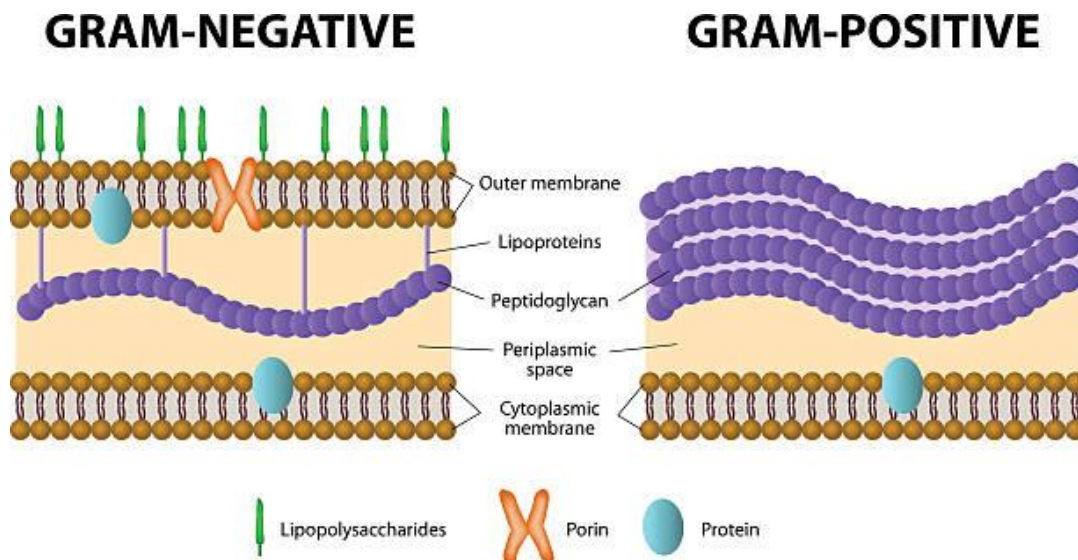


Figura 1. Comparación a modo de esquema de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y las Gram-positivas (27).

2.2. Ciclo lítico de bacteriófagos

Los fagos son una clase de virus que infectan a una bacteria hospedadora para así poder reproducirse. Se estima que el número total de bacterias en la Tierra es de 10^{30} , mientras que el de fagos es 10 veces mayor (6), por lo que son los microorganismos más abundantes del planeta y también los más diversificados debido a que se encuentran por toda la biosfera y son capaces de infectar a prácticamente cualquier tipo de bacteria (7).

Una vez que el bacteriófago ha infectado a una bacteria anfitriona, debe comenzar a replicarse y dividirse en lo que forma parte del ciclo de vida del fago. Existen 4 tipos de ciclos de vida: lítico, lisogénico, pseudolisogénico e infección crónica (Fig. 2). A su vez, cada ciclo presenta 5 etapas: adsorción, entrada del material genético, ensamblaje de nuevos fagos, lisis celular y transmisión (6).

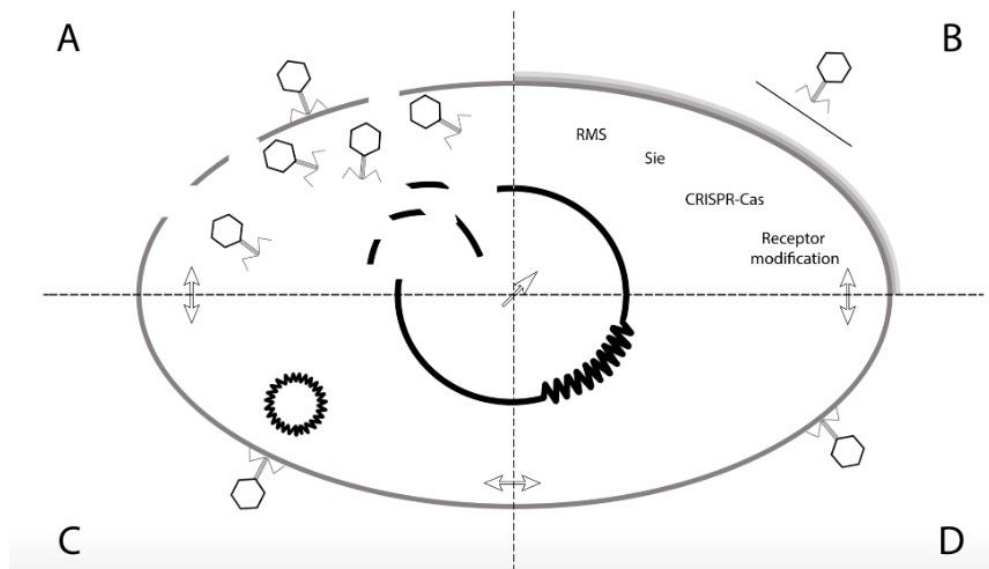


Figura 2. Diferentes tipos de infección de un fago. A – Ciclo lítico; B – Desarrollo del fago interrumpido por resistencia bacteriana; C – Ciclo pseudolisogénico; D – Ciclo lisogénico. Faltaría por representar la infección crónica (6).

Los dos ciclos más comunes son el ciclo lisogénico y el lítico. El ciclo lisogénico permite que un fago se pueda reproducir dentro de la célula huésped sin matarla. Esto ocurre debido a que una vez que el fago se ha fijado a la bacteria anfitriona y ha inyectado su material genético, se integra dentro del cromosoma bacteriano en forma de profago (8). De tal forma que cada vez que la bacteria se divida, lo hará con el profago, que queda en estado inactivo hasta que se den las condiciones necesarias para reactivarse, en ese momento sale de la lisogenia y entra en el ciclo lítico (9).

El ciclo lítico, por otro lado, tras la fijación y la penetración en la bacteria huésped, se caracteriza por la replicación y traducción del material genético del fago con el fin de ensamblar nuevos viriones. Una vez ensamblados, ocurre la salida de estos nuevos fagos al medio exterior por lisis de la bacteria anfitriona (6).

La ruptura de la envoltura celular bacteriana durante la lisis en ambos ciclos de replicación se produce por medio de unas enzimas líticas específicas como las endolisinas, holinas y las espaninas. Las endolisinas se encargan de hidrolizar la capa de peptidoglicano, mientras que las holinas y las espaninas de romper la membrana plasmática y la membrana externa, respectivamente. Por lo que las endolisinas no actúan solas, ya que las holinas y las espaninas son indispensables para su acción (6, 9).

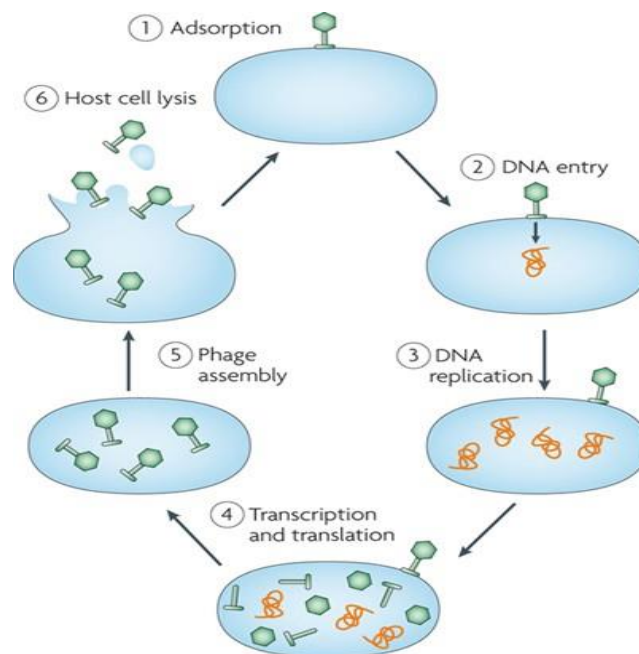


Figura 3. Etapas del ciclo lítico para la replicación de un bacteriófago (7).

2.3. Resistencia a los antimicrobianos

Uno de los mayores problemas a día de hoy es la resistencia a los antibióticos, la cual a través de diversos medios de comunicación se le ha empezado a denominar la pandemia silenciosa. En Estados Unidos alrededor de 2 millones de personas cada año desarrolla infecciones nosocomiales, de las cuales 100 mil resultan acabando en muertes, siendo la gran mayoría producidas a causa de la resistencia a los antimicrobianos (1), mientras que en 2019 hubo más de 1 millón de muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos. La revisión sobre la resistencia a los antimicrobianos, encargada por el gobierno del Reino Unido, argumentó que la resistencia a los antibióticos podría causar la muerte a 10 millones de personas cada año para 2050 (10). Las bacterias Gram-negativas multirresistentes son un problema de salud pública debido a su baja permeabilidad de membrana externa y a la facilidad de intercambio de genes de resistencia a los antibióticos (11).

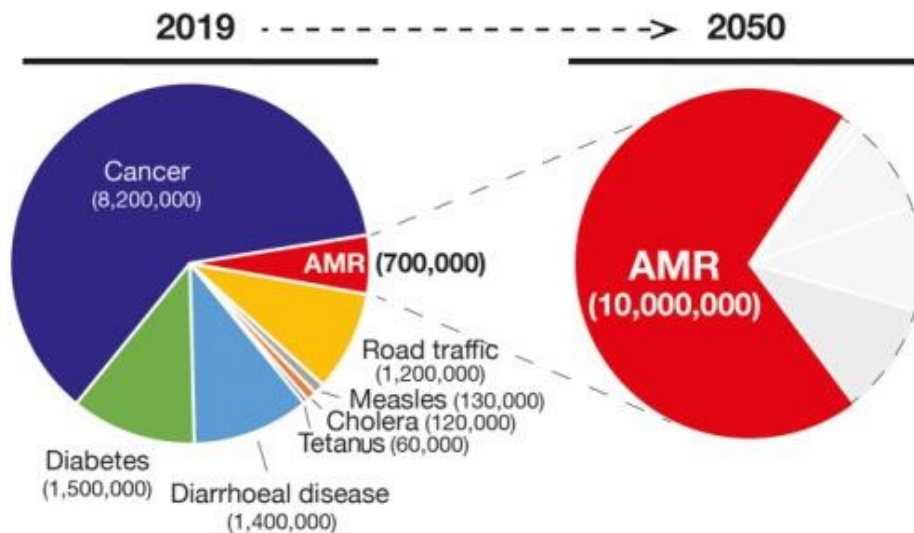


Figura 4. Comparación del número de muertes y causas principales en 2019 y lo esperado por resistencias a los antibióticos (AMR) para el año 2050 (34).

Es de tal magnitud este creciente problema que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya la ha considerado como “una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo” (28). Además, en 2017 publicó una lista de bacterias que requieren con más urgencia nuevos antibióticos, clasificándolas en 3 niveles acorde a su prioridad: media, alta o crítica (29).

PRIORIDAD MEDIA	PRIORIDAD ALTA	PRIORIDAD CRÍTICA
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Shigella spp.</i>	<i>Salmonellae spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Enterobacteriaceae spp.</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>	
	<i>Campylobacter spp.</i>	
	<i>Helicobacter pylori</i>	

Tabla 1. Clasificación de 12 familias de bacterias multirresistentes en función a la prioridad de encontrar antibióticos. Destacadas en negrita, se encuentran las bacterias Gram-negativas (29).

Revisando la lista se puede observar como 9 de las 12 familias de bacterias son Gram-negativas, incluyendo las 3 que ocupan el escalón de prioridad crítica. Este tipo de bacterias son capaces de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir el material genético a su descendencia (transmisión vertical) o a otras bacterias (transmisión horizontal), lo que permite una rápida diseminación de la farmacorresistencia (29).

La inactivación de los antimicrobianos por medio de enzimas, modificaciones de la permeabilidad o por mutación del sitio de unión son los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos (11). La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa en sincronía con los mecanismos anteriores, lo que proporciona resistencia a una amplia gama de antibióticos, como los betalactámicos, quinolonas, colistinas... Esto se debe a que cualquier cambio en la membrana, como variaciones en las propiedades hidrofóbicas o mutaciones en las porinas y otros factores, puede alterar su permeabilidad a los antibióticos creando así resistencias. Otro mecanismo muy frecuentemente empleado por las bacterias Gram-negativas es la expresión de bombas de flujo que, una vez que el antibiótico ha atravesado la membrana externa, lo expulsan al exterior evitando de esta forma que llegue a su sitio de acción (12, 13).

Las bacterias Gram-positivas carecen de esta capa externa de membrana, lo que las convierte en más susceptibles a las endolisinas que las bacterias Gram-negativas.

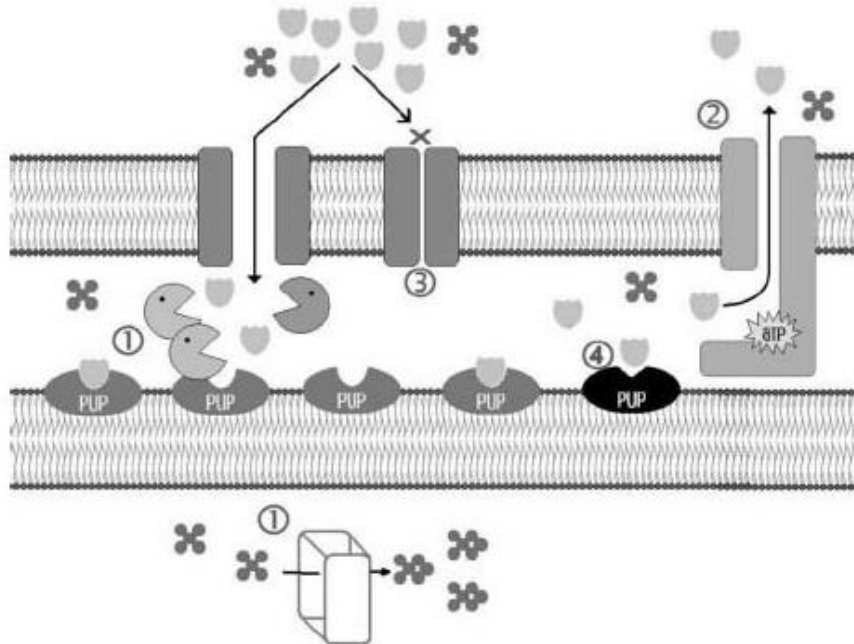


Figura 5. Distintos mecanismos de resistencia de bacterias Gram-negativas a los antimicrobianos. 1 – Enzimas inactivadoras de los antibióticos. 2 – Expulsión al exterior por medio de las bombas de flujo. 3 – Cierre de porinas (modificación de la membrana externa). 4 – Alteraciones del sitio de acción (13).

3. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS A LOS ANTIBIÓTICOS

3.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han atraído una gran atención como posible reemplazo de los antibióticos convencionales (30). Estos consisten en proteínas de bajo peso molecular y de origen natural que poseen propiedades antibióticas e inmunomoduladoras de amplio espectro contra bacterias infecciosas (tanto Gram-positivas como Gram-negativas), virus y hongos (31, 32). Además del pronunciado efecto bactericida, los AMP también pueden suprimir la formación de biofilms e inducir la disolución de los biofilms existentes, asimismo, algunos también presentan efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (30).

Estas proteínas han sido identificadas en todos los dominios de la vida, donde se ha visto que desempeñan una labor clave en la inmunidad innata (33).

Debido a sus propiedades anfipáticas, pueden interactuar con la membrana bacteriana fácilmente, por lo que el modo de acción más prevalente de los AMPs es mediante su directa actividad sobre la membrana. Las interacciones electrostáticas entre los péptidos antimicrobianos catiónicos y las membranas bacterianas aniónicas estabilizan su asociación, porque la mayoría de los AMP tienen una carga neta positiva. Esta unión produce un cambio en la permeabilidad de la membrana y, por lo tanto, conduce a la fuga de metabolitos, que lleva a la muerte de la bacteria (30). El tipo de interacción entre los AMPs y la membrana bacteriana, cuyos grupos aniónicos están altamente conservados, hace que las resistencias a estos péptidos aparezcan con mucha menor frecuencia que en el caso de los antibióticos convencionales (32).

Sin embargo, el uso clínico de AMPs se enfrenta con desafíos. Por ejemplo, el tejido infectado generalmente presenta una alta actividad proteolítica, lo que hace que los AMPs difícilmente puedan sobrevivir en ese entorno. Además, tienen una estabilidad fisicoquímica deficiente y una vida media corta, por lo que requieren altas dosis de administración (30). Por otro lado, se ha demostrado que algunos AMPs son altamente nefrotóxicos, en gran parte debido a esta alta dosis terapéutica que requieren (33).

Algunos estudios han demostrado que la administración combinada de estos péptidos con antibióticos puede reducir o evitar la aparición de resistencia a los antibióticos. Además, se ha observado sinergia *in vitro* entre muchos AMPs y antibióticos, por lo que la toxicidad o los efectos secundarios adversos de un fármaco pueden reducirse cuando se usa en combinación, en dosis más bajas (33).

3.2. Vacunas

Las vacunas son una alternativa prometedora a la resistencia a los antibióticos, ya que pueden ayudar a prevenir las infecciones bacterianas antes de que ocurran. Los antibióticos son medidas terapéuticas cuya administración se requiere una vez que la infección se ha producido. Por el contrario, las vacunas estimulan el sistema inmunológico para prevenir las infecciones, esta es su principal diferencia (34).

Las vacunas son capaces de reducir la aparición y propagación de las resistencias de forma directa e indirecta. En primer lugar, reducen la prevalencia del patógeno resistente así como el uso de antibióticos. Conviene recordar que una de las principales causas de la aparición de resistencias es el uso indiscriminado de antibióticos (35). Las vacunas también contribuyen a la reducción del uso de antibióticos a través del establecimiento de la inmunidad colectiva al detener los niveles de transmisión de bacterias patógenas a individuos potencialmente susceptibles, como personas inmunocomprometidas o inmunodeficientes y, por lo tanto, limitar el número de infecciones en la población general (36). Además, las vacunas pueden ser diseñadas para dirigirse específicamente a las bacterias farmacorresistentes, lo que ayudaría a prevenir la propagación de estas cepas. Por otro lado, la mayoría de los antibióticos tienen tan solo una diana de acción, mientras que las vacunas tienen muchas más, por lo que se necesitan más mutaciones para desarrollar resistencia a las vacunas (34).

En algunos casos, las vacunas han traído consigo la erradicación de patógenos y de la enfermedad causada por estos, como lo es el caso de la viruela y la eliminación casi completa de la poliomielitis. También han llevado a una disminución de más del 95% en la incidencia de patologías como la difteria, tétanos, sarampión, rubeola... (36). Sin embargo, pese a que muchos de los mencionados son virus, el desarrollo de vacunas eficientes frente a estos patógenos también tienen consecuencias indirectas en la reducción de las resistencias a través de reducir el mal uso de antibióticos ante estas infecciones virales o de prevenir sobreinfecciones bacterianas secundarias (35).

Desafortunadamente, todavía faltan vacunas frente a los principales patógenos resistentes. Sin embargo, su gran eficacia contra patógenos resistentes implica que las vacunas pueden tener un impacto significativo en el manejo de las resistencias a los antibióticos (37).

3.3. CRISPR/Cas

El sistema CRISPR-Cas es un sistema inmunitario adaptativo presente en muchos procariontes y presenta la capacidad de seleccionar y editar ácidos nucleicos con alta precisión y confiabilidad (38). Debido a esta función, este sistema supone una gran oportunidad para encontrar alternativas a los antibióticos.

La idea detrás de esta estrategia es utilizar la tecnología CRISPR/Cas para dirigirse a los genes de las bacterias resistentes y desactivarlos, es decir que no mata a las bacterias sino que silencia aquellos genes que hacen a los patógenos resistentes a los antibióticos para hacerlos de nuevo susceptibles a los tratamientos tradicionales. Además, puede apuntar simultáneamente a múltiples genes en la misma célula. CRISPR/Cas se puede diseñar de manera que sea específico de las bacterias patógenas, por lo que las eliminaría sin afectar a otras especies bacterianas. Los antibióticos convencionales de amplio espectro, en contraste, matan grandes poblaciones bacterianas, ya sean estas beneficiosas o no. (38, 39).

Varias empresas han empezado a intentar desarrollar antibióticos comerciales basados en este sistema CRISPR, pero hasta ahora todo esto no es más que una alternativa prometedora, puesto que todavía no ha sido probado ni si quiera en animales, tan solo se encuentra en fase de desarrollo temprano.

3.4. Terapia con fagos

La fagoterapia es una clase de terapia que emplea bacteriófagos con el fin de tratar infecciones bacterianas que causan enfermedades. De los ciclos de vida de fagos comentados anteriormente los fagos con ciclos líticos son los que mejor actúan en esta terapia (15).

En general, existen dos tipos distintos de aplicaciones: un uso compasivo y uno en ensayos clínicos.

Su utilización compasiva se emplea cuando una infección es tan grave que pone en peligro la vida del afectado y no se puede tratar de otras formas ya aprobadas. Se lleva a cabo una vez se ha demostrado, al menos *in vitro*, que los fagos empleados matan a la bacteria causante de la

infección. Esto implica asumir que los resultados *in vitro* van a poder ser reproducidos en el paciente infectado. Sin ninguna duda el paso clave y el más importante en esta clase de terapia es la preselección de los fagos que van a infectar a la bacteria patógena, que es un proceso largo y laborioso.

Respecto a su empleo en ensayos clínicos, estos sirven para establecer su seguridad, eficacia, dosis a administrar, etc. El número de ensayos clínicos con fagos que se ha realizado es relativamente bajo, aunque tanto sus éxitos como sus fracasos son muy informativos (16).

Sin embargo, la fagoterapia conlleva algunas limitaciones. Una limitación que se observó hace unos 100 años, en los primeros experimentos con fagos, fue el de la especificidad extrema de los bacteriófagos hacia las bacterias. Esto implica que es necesario hacer una selección de fagos “a la medida del paciente” en cada ensayo de fagoterapia. Por ejemplo, en 1923, la utilización de fagos por parte de Beckerish y Hauduroy fue exitosa, en concreto frente a la bacteria *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea. No obstante, un año después se comprobó que los mismos fagos no eran eficaces en una población de pacientes similar y se cree que fue porque se usaron fagos con un rango estrecho de huéspedes (15, 17).

Otro gran desafío al que se enfrenta la fagoterapia es la existencia de resistencia bacteriana a los fagos. La diferencia entre esta clase de resistencia con la resistencia a los antibióticos es que las bacterias se enfrentan constantemente a los fagos en su nicho ecológico, por lo que se da una coevolución de las bacterias y los virus en la que ambos luchan por sobrevivir. Esto provoca que las bacterias desarrollen mecanismos para resistir la infección de fagos y que a su vez estos adquieran contramedidas para poder invadir e infectar a las bacterias. Algunos de los mecanismos por los que las bacterias consiguen resistir la infección de los fagos son: 1, modificaciones del receptor de superficie celular para impedir el reconocimiento del fago; 2, la excreción de vesículas de membrana externa que actúan como un sumidero durante la invasión de fagos debido a que poseen características superficiales similares a las de la bacteria; 3, los sistemas de modificación mediante endonucleasas de restricción por los que se eliminan las secuencias de DNA exógenas; 4, el sistema CRISPR/Cas, entre otros. (18)

Además, los primeros experimentos farmacocinéticos que se realizaron mostraron que los fagos se eliminaban rápidamente del cuerpo a través del bazo, lo que cuestiona la eficacia sostenida de la fagoterapia a largo plazo.

También se vio que los resultados experimentales observados *in vivo* no siempre coincidían con lo visto en los experimentos *in vitro*. (15)

Un ensayo clínico en curso evalúa la eficacia y seguridad de AP-PA02 para el tratamiento de enfermedades pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con infecciones respiratorias graves como fibrosis quística o bronquiectasias no asociadas a fibrosis quística. AP-PA02 se compone de un cóctel de fagos naturales de *P. aeruginosa*. En las fases preclínicas demostraron una reducción significativa de biofilms *in vitro*, una distribución limitada a órganos sistémicos y fuera del objetivo, disminución de la mortalidad en modelo de ratón de infección pulmonar aguda por *P. aeruginosa*, entre otras. Además, no presentaba efecto antagónico en la administración con los antibióticos estándar y era activo en presencia de otras terapias para la fibrosis quística (41, 42, 43).

3.5. Endolisinas

Las endolisinas consisten en hidrolasas producidas por fagos con el fin de lisar la pared celular bacteriana y de esta forma poder liberar la progenie viral al final de su ciclo lítico (2). No obstante, como se mencionó anteriormente, las endolisinas no actúan solas, ya que junto a estas, los fagos liberan más enzimas debido a que para poder penetrar en la pared celular y acceder a su diana para ejercer su función, necesitan de la colaboración las holinas, las cuales actúan formando poros en la membrana bacteriana (6, 9).

Debido a sus características, se las está empezando a considerar una alternativa de gran valor ante la resistencia a los antibióticos.

4. ENDOLISINAS

El término “endolisina” fue utilizado por primera vez en la literatura científica por Jacob y Fuerst en el año 1958 con el fin de describir el tipo de lisinas cuyo mecanismo de acción era desde dentro de la célula, siendo aquellos enzibióticos que actuaban desde fuera denominados simplemente como “lisinas” (21).

Las endolisinas presentan ciertas ventajas respecto a los antibióticos convencionales de uso común, como por ejemplo su alta especificidad, es decir que exhiben una actividad bactericida específica y no alteran la microbiota beneficiosa. Otra ventaja que poseen es que no se ha detectado ninguna clase de resistencia bacteriana. No obstante pese a estas ventajas, su aplicación exógena frente a bacterias Gram-negativas es un inconveniente debido a la baja permeabilidad de la membrana externa, por lo que algunas endolisinas requieren esfuerzos adicionales para que puedan superar la barrera que supone dicha membrana y puedan alcanzar su diana, la capa de peptidoglicano (2, 11). Esto hace que mientras frente a las bacterias Gram-positivas el empleo de las endolisinas esté ampliamente desarrollado, contra las Gram-negativas tenga ciertas limitaciones.

4.1. Precedentes históricos

Los bacteriófagos fueron descubiertos por Frederick Twort en 1915, pero no fueron usados por primera vez hasta 1917 por Felix d’Herelle (11). No fue hasta 1919 cuando se usó por primera vez la fagoterapia en seres humanos, ya que en ese año se le administró a un niño que sufría disentería bacteriana y demostró ser exitosa. Sin embargo, la terapia con fagos fue rápidamente sobrepasada por el descubrimiento de la penicilina en 1928, que puso a los antibióticos a la cabeza de los tratamientos frente a las infecciones bacterianas. Unos años más tarde, en la llamada “edad dorada de los antibióticos”, se descubrieron y emplearon una gran variedad de antibióticos cuyo uso sigue vigente a día de hoy (9).

No obstante, este uso indiscriminado trajo consigo los primeros casos de resistencia bacteriana a los antibióticos. Durante la Segunda Guerra Mundial, la penicilina se distribuyó ampliamente entre los soldados, acelerando la selección natural de cepas de *Staphylococcus* resistentes a este

antibiótico. Unos pocos años más tarde, se observó que casi el 60% de los aislamientos de *Staphylococcus* en entornos hospitalarios eran resistentes a la penicilina (14). Con el paso de los años se ha ido viendo un incremento en los casos de resistencia, no solo por parte de *Staphylococcus*, sino por prácticamente todas las clases de bacterias. Además, la identificación y desarrollo de nuevos antibióticos se fue ralentizando, y desde los años 80 muy pocos antimicrobianos con mecanismos de acción de novedosos han llegado a la práctica clínica.

Con la entrada al nuevo siglo, la necesidad de encontrar alternativas a los antibióticos ha hecho que vuelva la popularidad de la fagoterapia, en concreto las terapias con endolisinas, cuyos ensayos clínicos ya se han generalizado (9).

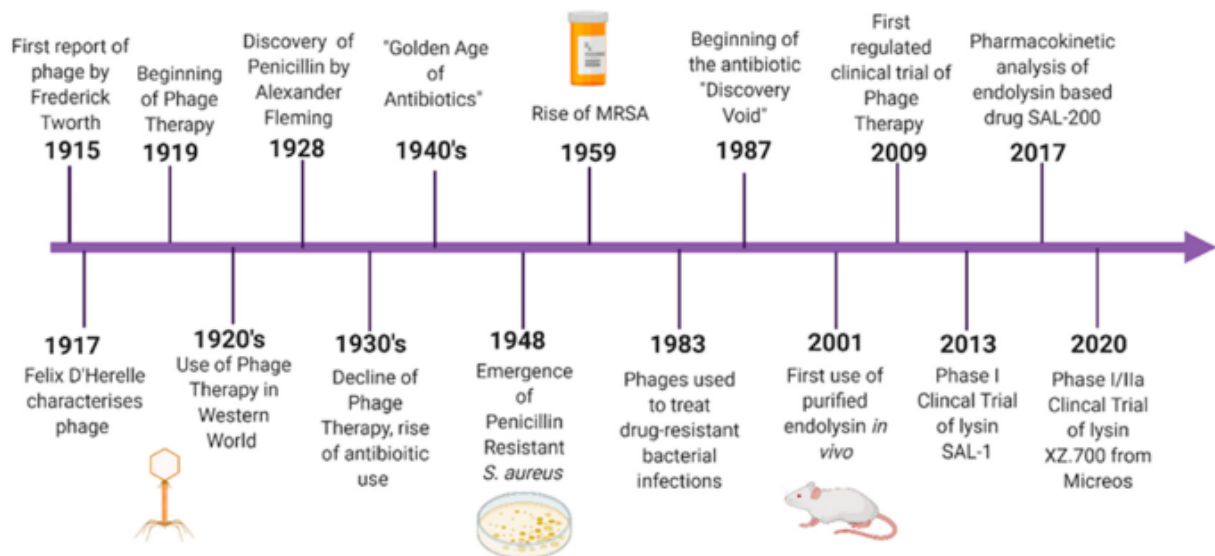


Figura 6. Evolución de la terapia con fagos y de la terapia con antibióticos (9).

4.2. Estructura y clases de endolisinas naturales

Las endolisinas de fagos son análogas a las lisinas bacterianas en estructura y función. Son enzimas que estructuralmente son muy distintas entre los fagos de Gram-positivos y Gram-negativos (2). Las endolisinas Gram-positivas presentan una estructura generalmente mayor de 25 kDa con dos dominios. Un dominio catalítico N-terminal en el que radica la función de la digestión del peptidoglicano y un dominio C-terminal de unión a la pared celular (Fig. 7) (9).

Por otro lado, las Gram-negativas son pequeñas proteínas globulares de entre 15 y 20 kDa formadas por un solo dominio que, normalmente, carecen de un dominio de unión a la pared celular determinado (2).

Algunos análisis recientes han puesto de manifiesto la gran diversidad estructural de las endolisinas, que pueden presentar hasta 24 tipos diferentes de dominios catalíticos y 15 de unión (19). En resumen, la estructura de las endolisinas es compleja y está compuesta por diferentes dominios funcionales que les permiten unirse específicamente al peptidoglicano y catalizar su hidrólisis.

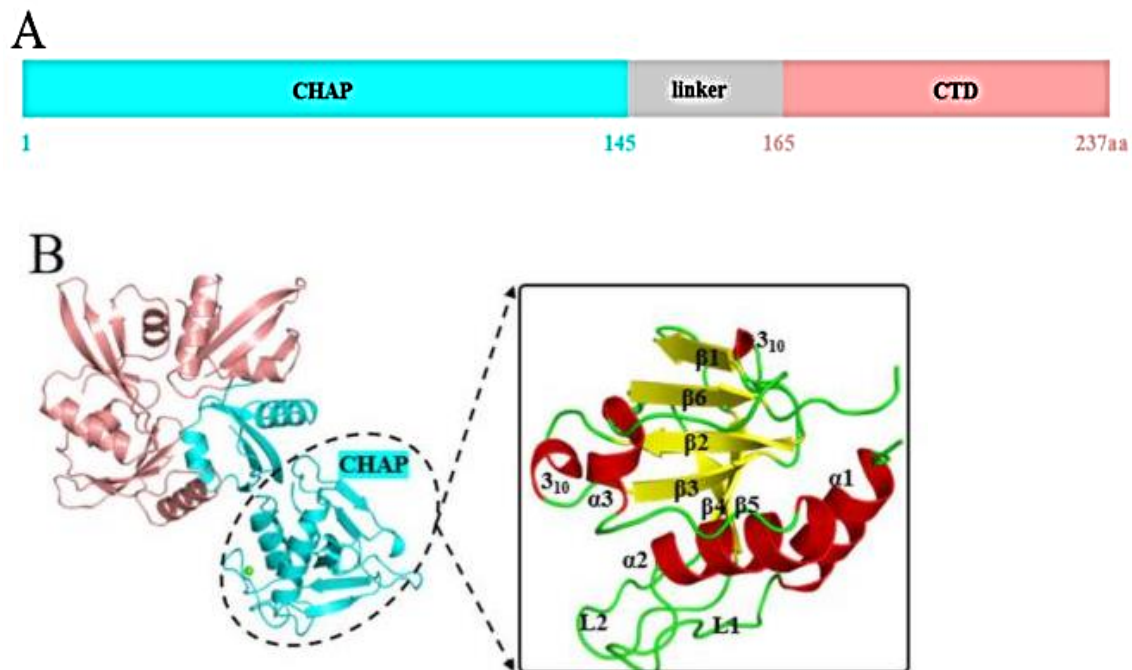


Figura 7. Estructura tridimensional de la endolisina EFm1_{D166Q}. A – Organización del dominio de EFm1. B – Estructura de EFm1_{D166Q} que incluye el dominio N-terminal (en azul), el C-terminal (en rojo) y un enlazador putativo (52).

La digestión del peptidoglicano puede darse por diferentes mecanismos lo que permite distinguir diferentes clases de endolisinas. De esta manera, se han descrito los siguientes grupos: lisoenzimas o muramidásas, glucosidasas, amidásas, endopeptidasas y transglucosilasas líticas (11) (Fig. 8).

El grupo de las lisoenzimas, también llamadas N-acetilmuramidásas lisan las bacterias a través de la hidrólisis específica del enlace glucosídico β -1,4 entre la N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico, que lleva a un estado de desequilibrio de la presión de turgencia y por ende a la lisis bacteriana. Las endolisinas de la clase de las glucosidasas, también llamadas N-acetil- β -D-glucosamidásas, favorecen la ruptura del peptidoglicano catalizando la hidrólisis del enlace glucosídico. Las amidásas o, en concreto, N-acetilmuramoyl-L-alanina amidásas, se caracterizan por llevar a cabo la hidrólisis del enlace amida que une la cadena de NAM con la L-alanina. Las endolisinas endopeptidasas actúan a través de la escisión del enlace peptídico entre los aminoácidos (2, 9, 20).

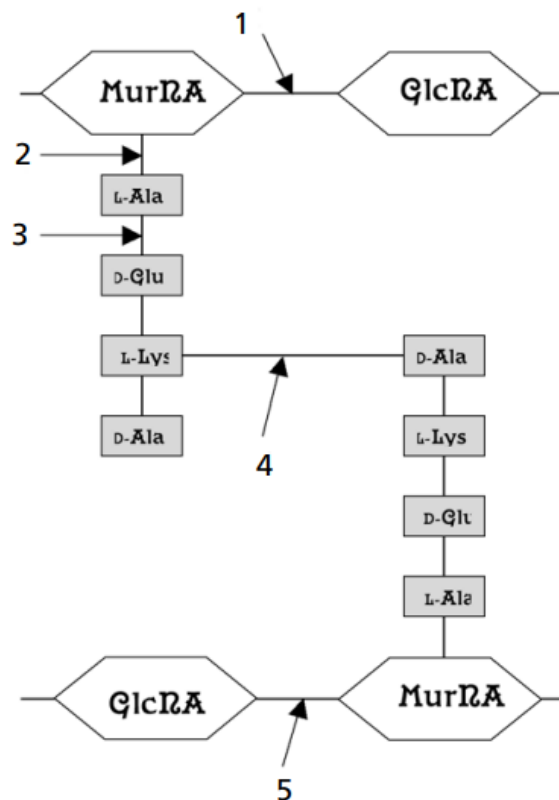


Figura 8. Distintos mecanismos de ruptura del peptidoglicano en función del tipo de endolisina. 1 – Lisoenzimas y transglucosilasas. 2 – Amidásas. 3 y 4 – Endopeptidasas. 5 – Glucosidasas (21).

MurNA – ácido N-acetilmurámico; GlcNA – N-acetilglucosamina; L-Ala – L-alanina; D-Glu – D-glutamina; L-Lys – L-lisina; D-Ala – D-alanina.

Sin embargo, el mecanismo de acción por el que digieren el peptidoglicano no es la única manera de clasificar las endolisinas. Por ejemplo se pueden dividir también de acuerdo a su especificidad, es decir específicas para bacterias Gram-positivas, para bacterias Gram negativas y endolisinas de amplio espectro (capaces de actuar en diferentes tipos de bacterias). También podrían diferenciarse respecto a su función, puesto que tenemos las endolisinas líticas y las autolíticas, también llamadas autolisinas, las cuales son enzimas producidas por la propia bacteria para su lisis. Se secretan en procesos como el crecimiento y división celular, recambio de la pared celular, secreción de proteínas y maduración del peptidoglicano (21).

Cabe destacar que aunque haya distintas formas de clasificar a las endolisinas, estas no son mutuamente excluyentes, por lo que una misma endolisina podría ser clasificada de diferentes maneras dependiendo del criterio utilizado.

4.3. Endolisinas recombinantes

Consisten en un tipo de endolisinas que han sido modificadas genéticamente con el fin de mejorar su actividad o especificidad hacia ciertas bacterias o incluso para que sean activadas por estímulos externos como la luz o el calor. Se producen mediante técnicas de ingeniería genética y se utilizan en diferentes aplicaciones biotecnológicas, como el control de infecciones bacterianas y la eliminación de biofilms.

Este tipo de agentes es de especial interés y en la última década, se han aplicado en muchos campos con la finalidad de combatir las bacterias MDR, “multidrug-resistant” (2).

La industria alimentaria se caracteriza por tener que afrontar con frecuencia toxi-infecciones derivadas del consumo de alimentos, siendo muchas de ellas causadas por bacterias Gram-negativas, como las producidas por *Salmonella spp.* y *E. coli*. Por ello, se están empezando a desarrollar una gran cantidad de endolisinas para impedir estas contaminaciones. Por ejemplo ante *Salmonella spp.* se han desarrollado endolisinas recombinantes derivadas de fagos de esta bacteria (23).

En un estudio del año 2020, Fursov et al. empleando la endolisina recombinante de amplio rango LysECD7, pudieron demostrar su eficacia frente a la formación de biofilms generadas por la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. En este estudio se observó que la endolisina no solo reducía

significativamente la formación y degradaba el biofilm de forma *in vitro*, sino que estos resultados fueron confirmados también en ensayos con animales (22).

Otro estudio, el realizado por Kim et al., demostró la eficacia antimicrobiana de la proteína recombinante LysSS frente a varias especies bacterianas, entre las que se encontraban *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras. En este estudio se observó la destrucción de *A. baumannii* después de 4 h y no se detectó viabilidad alguna tras 8h de incubación, por lo que se confirmó la muerte completa de la bacteria y por ende la potente actividad bactericida de LysSS frente a esta bacteria (24).

5. ENSAYOS CLÍNICOS

Una gran cantidad de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado el potencial de las endolisinas, o proteínas basadas en estas, como antibacterianos. Por ello, se ha pasado del estado preclínico a empezar a realizar ensayos clínicos con endolisinas.

Un efecto que puede tener la combinación de dos o más endolisinas entre ellas o bien con otros antibióticos es el de la sinergia antimicrobiana. Esto ocurre debido a que la escisión del primer enlace por medio de la primera endolisinas podría resultar en una mejora de la accesibilidad al segundo sitio de ruptura por parte de la otra endolisina, lo que tiene como consecuencia una degradación más rápida del sustrato.

Por otro lado, el mecanismo de la sinergia antimicrobiana resultante de la combinación de una endolisina con un antibiótico no está del todo claro. Sin embargo, se ha observado que estas combinaciones pueden volver a sensibilizar a las bacterias frente a los antibióticos a los que son resistentes, reduciendo así la aparición de mutantes resistentes, así como la dosis requerida de antimicrobiano y la duración del tratamiento (25).

En el año 2016 el estudio de Thummeepak et al. demostró la capacidad de la endolisina LysABP-01 para hidrolizar la pared celular de *A. baumannii* y su interacción sinérgica con la colistina. Se probó la combinación de la endolisina con una gran variedad de antibióticos, siendo la que más destacaba la realizada con colistina. Esta combinación resultó en la lisis de casi el 100% de la

población bacteriana, es decir que la combinación presentaba una actividad antibacteriana muy elevada. En el estudio se probó la administración de la endolisina sola y en combinación con colistina, demostrando de esta manera la sinergia antimicrobiana causada por la combinación de la endolisina con el antibiótico (26).

Un estudio realizado en el año 2022 demostró la actividad antibacteriana de la endolisina recombinante LysPA90, en concreto frente a *E. coli*. Esta actividad antibacteriana era dependiente del tiempo y la dosis, por lo que se probó a concentraciones de 0 a 2 μM durante 30 a 90 min. Sin embargo, se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (MIC) mayor de 128 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo así que la actividad bactericida intrínseca era relativamente débil (40).

5.1. Mejora de la permeabilidad de la membrana a las endolisinas

A pesar de la gran cantidad de ensayos con animales publicados, solo unas pocas endolisinas se han probado en humanos, y la mayoría de estas han sido endolisinas dirigidas a bacterias Gram-positivas (2). Las aplicaciones de endolisinas frente a Gram-negativas están limitadas debido a que la membrana externa evita que las endolisinas aplicadas de forma exógena lleguen hasta la capa de peptidoglicano. Por lo tanto, hasta ahora muchos estudios se están centrando en la mejora de la permeabilidad de la membrana externa a las endolisinas. Para esto se están utilizando quelantes (como EDTA), ácidos orgánicos débiles o alta presión hidrostática (26). Gracias a estos desestabilizadores de membrana se ha visto que la actividad de las endolisinas frente a bacterias Gram-negativas mejora significativamente.

En el trabajo de Walmagh et al. del año 2013, aparte de caracterizar 5 endolisinas frente a bacterias Gram-negativas, demostraron que *P. aeruginosa* con membranas permeabilizadas con EDTA era sensible a las 5 endolisinas (44). Otro estudio más reciente, el realizado por Guo et al. en 2017, concluyó que la endolisina LysPA26 frente a *P. aeruginosa*, en presencia de EDTA, mantenía su actividad en un 90% pudiendo reducir la viabilidad bacteriana en 4 unidades logarítmicas (10 000 veces) en media hora, al igual que en la formación de biofilms (45).

Respecto al empleo de endolisinas junto con ácidos orgánicos con el fin de sensibilizar la membrana externa, existen varios estudios publicados, como los de Oliveira et al. realizados en los años 2014 y 2016. En el primero de los estudios se utilizó la endolisina Lys68 frente a *Salmonella typhimurium* una vez que su membrana externa había sido permeabilizada con ácido cítrico y málico. Se vio como su administración combinada redujo de 3 a 5 log en la carga bacteriana/UFC tras 2 horas, y también fue capaz de reducir la formación de biofilms (46).

Por otro lado, en su estudio de 2 años después, se centraron en la combinación de la endolisina ABgp46 junto con los ácidos orgánicos débiles anteriores (ácido cítrico y málico) frente a la bacteria multirresistente *A. baumannii*. Este trabajo demostró la reducción significativa de la bacteria patógena, en concreto hasta en 2 órdenes de magnitud en un lapso de tiempo de 2 horas (47).

Aunque estos resultados son prometedores, es importante tener en cuenta que los ensayos clínicos son sólo una parte del proceso de desarrollo de nuevos tratamientos. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la eficacia y seguridad a largo plazo de las endolisinas, y para determinar su eficacia frente a diferentes tipos de bacterias y en diferentes tipos de infecciones.

6. PRODUCTOS COMERCIALIZADOS

En la actualidad, existen varios productos comerciales de endolisinas que se utilizan para el tratamiento de infecciones bacterianas en diferentes ámbitos, principalmente en el campo de la alimentación y la agricultura. Sin embargo, la mayoría de estos están dirigidos a bacterias Gram-positivas.

Artilysin® se trata de una plataforma antimicrobiana creada por las empresas Lysando y AiCuris que se centra en el desarrollo y comercialización de endolisinas capaces de atravesar la membrana externa de patógenos Gram-negativos (9). Además, se ha demostrado que frente a bacterias Gram-positivas son más eficaces que las endolisinas simples (48).

Art-175 consiste en una variante modificada de la endolisina KZ144 con una fusión N-terminal con SMAP-29, un péptido derivado de oveja. Art-175 es altamente bactericida frente a bacterias Gram-negativas multirresistentes clasificadas por la OMS de prioridad crítica, como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Un estudio demostró que Art-175 supera a los antibióticos convencionales en cuanto a actividad bactericida y tasa de destrucción contra *A. baumannii*. También se evaluó su efecto en combinación con dos antibióticos de primera línea contra las infecciones causadas por esta bacteria, ciprofloxacina y tobramicina, demostrando que son más efectivos en combinación que los antibióticos solos. La eficacia de esta mezcla fue comparable al efecto de Art-175 solo, por lo que no se observaron efectos antagónicos (9, 49). La aplicación de Art-175 en perros que sufrían de otitis causada por *P. aeruginosa* redujo la infección e inflamación del oído a los 6 días, mientras que con los antibióticos convencionales 3-6 semanas después no se detectaban signos de mejoría (9).

Por otro lado, frente a bacterias Gram-positivas hay bastantes más endolisinas comercializadas. Dos de las principales empresas líderes en este sector son Microcos y ContraFect. Microcos tiene en el mercado la crema tópica Gladskin derivada de la endolisina SA.100 y que actúa frente al patógeno *S. aureus*. Se ha demostrado que este compuesto reduce significativamente el eccema y el acné que esta bacteria produce (9, 50). Otro compuesto diseñado por esta empresa frente a *S. aureus* es la lisina XZ.700. Sin embargo, esta molécula se encuentra todavía en ensayos clínicos para evaluar su eficacia y seguridad. Consiste en una endolisina estructuralmente muy similar a SA.100 (50). ContraFect, por otro lado, es la empresa comercializadora de la lisina recombinante Exebacase (CF-301) diseñada frente a *S. aureus*. Pese a que aún no está comercializada, Exebacase se trata de la primera y única lisina que ha entrado en ensayos clínicos en humanos en Estados Unidos (51).

En resumen, aunque la utilización de endolisinas como terapia para infecciones bacterianas aún se encuentra en una fase temprana de investigación, ya existen productos comerciales a base de estas enzimas que han demostrado ser eficaces en diferentes ámbitos, como la alimentación y la agricultura. La utilización de endolisinas se presenta como una alternativa interesante y prometedora para el control de infecciones bacterianas en diferentes ámbitos, lo que abre la puerta a nuevas posibilidades en el futuro.

7. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El uso de endolisinas en el tratamiento de enfermedades causadas por los patógenos Gram-negativos ha sido objeto de una intensa investigación en los últimos años. Este aumento de interés en este campo es debido al alarmante aumento de resistencias a los antibióticos, el cual ya ha sido denominado por la OMS como una gran amenaza para la salud. Además, este problema es mucho mayor en las patologías causadas por las bacterias Gram-negativas, debido a la existencia de la membrana externa la cual impide el paso de los antibióticos al interior de la pared para que así puedan ejercer su acción bactericida.

No obstante, a pesar de los avances que se han logrado en los últimos años en este campo, por el momento existen algunas limitaciones en el empleo de las endolisinas con el fin de tratar infecciones producidas por bacterias Gram-negativas. La presencia de la membrana externa en este tipo de bacterias es el principal inconveniente, puesto que dificulta su entrada y por ende limita la capacidad terapéutica de cualquier antimicrobiano, incluidas las endolisinas. Sin embargo, a día de hoy se están realizando estudios para aumentar la permeabilidad de esta membrana a las endolisinas que, por el momento, están resultando ser muy prometedores. Otra desventaja radica en la elevada especificidad de las endolisinas, lo que origina que estos agentes tengan un espectro de acción reducido, aunque no tanto como el de los fagos. Además, la posible degradación con el calor y la luz limita la estabilidad de las endolisinas y su aplicación en algunos sistemas, al igual que la posibilidad de que sean inactivadas por ciertas enzimas proteolíticas. Pero sin duda la mayor de las incertidumbres es cómo va a responder el organismo a las endolisinas a largo plazo, porque varios estudios han demostrado que a corto plazo las endolisinas son totalmente seguras y eficaces, y sin embargo no se tiene idea alguna de que efectos tendrán tras un uso continuado a largo plazo.

Respecto a las perspectivas de futuro, las endolisinas tienen un potencial significativo en una gran variedad de campos de trabajo, incluida la medicina, la industria alimentaria y la agricultura. Pueden ser utilizadas en medicina como tratamiento ante infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, y su capacidad para actuar específica y selectivamente sobre las bacterias las convierte en un reemplazo potencial de los antibióticos.

Otra posible aplicación sería en el ámbito alimentario puesto que de esta forma favorecerían la conservación de los alimentos, evitando su contaminación. Pero, además este mismo uso se le podría dar para combatir aquellas bacterias que infectan a animales y plantas, sustituyendo así productos químicos que podrían tener efectos perjudiciales para la salud o para el medio ambiente.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, el campo de investigación de las endolisinas ha experimentado una aceleración significativa en la última década debido al alarmante aumento de casos de resistencia bacteriana a los antibióticos. Se presentan como una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente frente a bacterias Gram-positivas. La aplicación a Gram-negativas es más difícil, pero se están desarrollando estrategias para hacerla posible. Todavía la investigación en este campo se encuentra en sus etapas iniciales, y aún hay muchos aspectos los cuales se deben estudiar para determinar la eficacia, seguridad y viabilidad de las endolisinas como tratamiento de elección frente a infecciones bacterianas, y no solo a corto sino también a largo plazo. No obstante, los resultados obtenidos hasta la fecha son muy alentadores y sugieren que las endolisinas pueden ser una alternativa interesante y viable para el tratamiento de infecciones bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Infectious Diseases Society of America (IDSA), Spellberg, B., Blaser, M., Guidos, R. J., Boucher, H. W., Bradley, J. S., Eisenstein, B. I., Gerding, D., Lynfield, R., Reller, L. B., Rex, J., Schwartz, D., Septimus, E., Tenover, F. C., & Gilbert, D. N. (2011). Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clinical infectious disease: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52 Suppl 5 (Suppl 5), S397–S428. <https://doi.org/10.1093/cid/cir153>
2. Rahman, M. U., Wang, W., Sun, Q., Shah, J. A., Li, C., Sun, Y., Li, Y., Zhang, B., Chen, W., & Wang, S. (2021). Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1277. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111277>
3. Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2020). Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 29(3), 629–646. <https://doi.org/10.1002/pro.3737>
4. Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
5. Benz R. (1988). Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology*, 42, 359–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.002043>
6. Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current medicinal chemistry*, 24(36), 3987–4001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>

7. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews. Microbiology*, 8(5), 317–327.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
8. Manrique, P., Dills, M., & Young, M. J. (2017). The Human Gut Phage Community and Its Implications for Health and Disease. *Viruses*, 9(6), 141. <https://doi.org/10.3390/v9060141>
9. Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*, 13(4), 680.
<https://doi.org/10.3390/v13040680>
10. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
11. Gontijo, M. T. P., Jorge, G. P., & Brocchi, M. (2021). Current Status of Endolysin-Based Treatments against Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1143.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10101143>
12. Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
13. Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 227-232.
<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07>
14. Danis-Wlodarczyk, K. M., Wozniak, D. J., & Abedon, S. T. (2021). Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1497.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10121497>

15. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell host & microbe*, 25(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
16. Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual review of medicine*, 73, 197–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208>
17. Smith J. (1924). The bacteriophage in the treatment of typhoid fever. *British medical journal*, 2(3315), 47–49. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3315.47>
18. Caflisch, K. M., Suh, G. A., & Patel, R. (2019). Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. *Expert review of anti-infective therapy*, 17(12), 1011–1041. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1694905>
19. Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L. D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F., & Azeredo, J. (2016). Structural and Enzymatic Characterization of ABgp46, a Novel Phage Endolysin with Broad Anti-Gram-Negative Bacterial Activity. *Frontiers in microbiology*, 7, 208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00208>
20. Joshi, H., & Jain, V. (2017). Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein. *Analytical biochemistry*, 528, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.04.009>
21. Antifúngicos, Y. (s/f). Los enzibioticos como agentes terapéuticos antibacterianos *Academiadefarmaciadegalicia.gal* https://academiadefarmaciadegalicia.gal/wp-content/uploads/docs/DiscursoIngreso_gonzalez_villa.pdf

22. Fursov, M. V., Abdrakhmanova, R. O., Antonova, N. P., Vasina, D. V., Kolchanova, A. D., Bashkina, O. A., Rubalsky, O. V., Samotrueva, M. A., Potapov, V. D., Makarov, V. V., Yudin, S. M., Gintsburg, A. L., Tkachuk, A. P., Gushchin, V. A., & Rubalskii, E. O. (2020). Antibiofilm Activity of a Broad-Range Recombinant Endolysin LysECD7: In Vitro and In Vivo Study. *Viruses*, 12(5), 545. <https://doi.org/10.3390/v12050545>
23. Rodríguez-Rubio, L., Gerstmans, H., Thorpe, S., Mesnage, S., Lavigne, R., & Briers, Y. (2016). DUF3380 Domain from a Salmonella Phage Endolysin Shows Potent N-Acetylmuramidase Activity. *Applied and environmental microbiology*, 82(16), 4975–4981. <https://doi.org/10.1128/AEM.00446-16>
24. Kim, S., Lee, D. W., Jin, J. S., & Kim, J. (2020). Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.005>
25. Gerstmans, H., Criel, B., & Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnology advances*, 36(3), 624–640. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.009>
26. Thummeepak, R., Kittit, T., Kunthalert, D., & Sitthisak, S. (2016). Enhanced Antibacterial Activity of *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage ØABP-01 Endolysin (LysABP-01) in Combination with Colistin. *Frontiers in microbiology*, 7, 1402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01402>
27. 5071 imágenes de Bacteria gram positiva - Imágenes, fotos y vectores de stock | Shutterstock. (s. f.). Shutterstock. <https://www.shutterstock.com/es/search/bacteria-gram-positiva>
28. World Health Organization: WHO. (2020). Resistencia a los antibióticos. [www.who.int](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

29. World Health Organization: WHO. (2017, 27 febrero). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [www.who.int. https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)
30. Wang, C., Hong, T., Cui, P., Wang, J., & Xia, J. (2021). Antimicrobial peptides towards clinical application: Delivery and formulation. *Advanced drug delivery reviews*, 175, 113818. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.028>
31. Fry D. E. (2018). Antimicrobial Peptides. *Surgical infections*, 19(8), 804–811. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.194>
32. Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and peptide letters*, 27(1), 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
33. Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
34. Rosini, R., Nicchi, S., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2020). Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in immunology*, 11, 1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01048>
35. Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R., & Serruto, D. (2021). The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 19(5), 287–302. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>
36. Mishra, R. P., Oviedo-Orta, E., Prachi, P., Rappuoli, R., & Bagnoli, F. (2012). Vaccines and antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, 15(5), 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.002>

37. Tekle, Y. I., Nielsen, K. M., Liu, J., Pettigrew, M. M., Meyers, L. A., Galvani, A. P., & Townsend, J. P. (2012). Controlling antimicrobial resistance through targeted, vaccine-induced replacement of strains. *PloS one*, 7(12), e50688.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050688>
38. Wu, Y., Battalapalli, D., Hakeem, M. J., Selamneni, V., Zhang, P., Draz, M. S., & Ruan, Z. (2021). Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 401. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01132-8>
39. Tao, S., Chen, H., Li, N., & Liang, W. (2022). The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance. *Infection and drug resistance*, 15, 4155–4168.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S370869>
40. Hwang, Y. J., Jo, J., Kim, E., Yoon, H., Hong, H., Kim, M. S., & Myung, H. (2022). Motility increase of adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) induced by a sub-inhibitory concentration of recombinant endolysin LysPA90. *Frontiers in microbiology*, 13, 1093670.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1093670>
41. Estudio Ph 1/2 que evalúa la seguridad y tolerabilidad de AP-PA02 inhalado en sujetos con infecciones pulmonares crónicas por *Pseudomonas aeruginosa* y fibrosis quística (SWARM-Pa). (2022). *ichgcp.net*. <https://ichgcp.net/es/clinical-trials-registry/NCT04596319>
42. Ph 1/2 Study Evaluating Safety and Tolerability of Inhaled AP-PA02 in Subjects With Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infections and Cystic Fibrosis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (s.f.). <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04596319>
43. Armata Pharmaceuticals. (2022, 21 febrero). *Pseudomonas aeruginosa* Phage Product Candidates - Armata Pharmaceuticals. <https://www.armatapharma.com/pipeline/ap-pa02/>

44. Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Lavigne, R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(10), 4369–4375. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4294-7>
45. Guo, M., Feng, C., Ren, J., Zhuang, X., Zhang, Y., Zhu, Y., Dong, K., He, P., Guo, X., & Qin, J. (2017). A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00293>
46. Oliveira, H., Thiagarajan, V., Walmagh, M., Sillankorva, S., Lavigne, R., Neves-Petersen, M. T., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2014). A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PloS one*, 9(10), e108376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108376>
47. Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L. D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F., & Azeredo, J. (2016). Structural and Enzymatic Characterization of ABgp46, a Novel Phage Endolysin with Broad Anti-Gram-Negative Bacterial Activity. *Frontiers in microbiology*, 7, 208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00208>
48. Artilysin® - Overview - Lysando AG. (s. f.). <https://www.lysando.com/overview.html>
49. Defraigne, V., Schuermans, J., Grymonprez, B., Govers, S. K., Aertsen, A., Fauvart, M., Michiels, J., Lavigne, R., & Briers, Y. (2016). Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(6), 3480–3488. <https://doi.org/10.1128/AAC.00285-16>
50. O'Brien, T. (2023, 9 marzo). Microeos initiates clinical trial to evaluate world's first endolysin-drug as a therapy for Atopic Dermatitis - Microeos. Microeos. <https://www.micreos.com/micreos-initiates-clinical-trial-to-evaluate-worlds-first-endolysin-drug-as-a-therapy-for-atopic-dermatitis/>

51. Exebacase: ContraFect Corporation (CFRX). (s. f.).

<https://www.contrafect.com/pipeline/exebacase>

52. Zhou, X., Zeng, X., Wang, L., Zheng, Y., Zhang, G., & Cheng, W. (2022). The Structure and Function of Biomaterial Endolysin EFm1 from E. faecalis Phage. *Materials* (Basel, Switzerland), 15(14), 4879. <https://doi.org/10.3390/ma15144879>