



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía
Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales



**Caracterización de bacteriófagos para el control de bacterias
intestinales relacionadas con la obesidad en un modelo in
vitro**

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y
ALIMENTOS MEDICINALES**

Presenta

L.N. Annet Sarai Soto Angulo

Directores

Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz

Culiacán, Sinaloa, México

Junio de 2022

APROBACIÓN

Caracterización de bacteriófagos para el control de bacterias intestinales relacionadas con la obesidad en un modelo *in vitro*



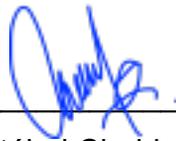
L.N Annet Sarai Soto Angulo

Alumna



Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez

Directora de Tesis.



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz

Director de Tesis



Dr. Osvaldo López Cuevas

Asesor de tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Asesor de tesis



M.C Jean Pierré González Gómez

Asesor de tesis



Dirección General de Bibliotecas



U n i v e r s i d a d A u t ó n o m a d e S i n a l o a

REPOSITORIO INSTITUCIONAL

UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.





DERECHOS DE AUTOR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán el día 8 del mes Mayo del año 2022, la que suscribe Annet Sarai Soto Angulo alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales con número de cuenta 53135636, de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez y Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz y cede los derechos del trabajo titulado "Caracterización de bacteriófagos para el control de bacterias intestinales relacionadas con la obesidad en un modelo *in vitro*", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Annet Soto

Annet Sarai Soto Angulo

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía al programa de posgrado por abrirme las puertas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por recibirme en su institución y brindarme todas las facilidades para la realización del trabajo.

A los miembros del comité de tesis Dres. Cristóbal Chaidez Quiroz, Osvaldo López Cuevas, Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala y Jean Pierre González por su apoyo, buena disponibilidad y comprensión, especialmente a la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez por aceptar ser mi guía durante toda mi formación en el posgrado, por su apoyo, confianza y aprecio.

A mis compañeros de posgrado, por acompañarme en esta trayectoria.

DEDICATORIA

A mis familiares y amigos.

RESUMEN

El desequilibrio en la cantidad y especies de bacterias que conforman la microbiota intestinal (disbiosis) se ha relacionado en los últimos años con distintas enfermedades crónico-degenerativas. La obesidad, por ejemplo, está íntimamente relacionada con *Enterobacter cloacae* y *Akkermansia muciniphila*. La predominancia de *E. cloacae* tiene un efecto en el aumento de peso, mientras que *A. muciniphila* está inversamente relacionada con la obesidad. Por lo tanto, el control de estas especies bacterianas presentes en la microbiota intestinal debe realizarse sin alterar otros grupos microbianos.

Los bacteriófagos, son virus que selectivamente atacan a bacterias, y se han propuesto como alternativa al uso de antibióticos para la modulación de la microbiota bacteriana intestinal.

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar fagos con actividad lítica contra *E. cloacae*. Los fagos se aislaron de muestras de aguas residuales recolectadas en Sinaloa usando a *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 como hospedero. El aislamiento de fagos se realizó mediante el método de enriquecimiento y el de doble capa de agar se utilizó para confirmar la actividad lítica de los fagos. Se determinó la estabilidad de los fagos a diferentes rangos de temperatura de la 30 °C a la 60 °C, se determinó la estabilidad de los fagos a diferentes condiciones de pH exponiéndolos a un rango de 1 a 13 durante 60 min, y se verificó que éstos no fueran capaces de infectar a *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA-835).

Al fago PHEcl1 se le realizó secuenciación de genoma completo. El ADN del fago PHEcl1 se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo, se realizó la preparación de bibliotecas genómicas mediante el kit Nextera XT y la secuenciación se llevó a cabo en el equipo.

Se aislaron 9 fagos que mostraron actividad lítica contra *E. cloacae* (PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7, PHEcl8). Cuando se determinó la estabilidad de los fagos a diferentes condiciones de pH, se encontró que los 9 fagos eran viables desde pH 3 hasta

pH 12, pero los fagos se inactivaron a los pH 1, 2, 12, 13 y 14. En el caso de estabilidad térmica, se encontró que los fagos mantenían su actividad hasta 60 °C y se observó una reducción de la actividad a temperaturas más altas.

En la prueba de goteo para determinar el efecto lítico de los fagos contra la cepa de *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835 y se observó que ninguno de los fagos aislados fue capaz de infectarla.

Se observó que el genoma del fago PHEcl1 consta de ADN de doble cadena con una longitud de 49,578 pb y un contenido de 47.8% GC. Además, se clasificó taxonómicamente dentro de la subfamilia *Tempevirinae*, perteneciente a la familia *Drexlerviridae*, del orden *Caudovirales*. No se observaron genes relacionados con virulencia, resistencia a antibióticos ni lisogenia en su genoma y su ciclo de vida fue predicho como virulento.

Los fagos aislados en este estudio son prometedores para más estudios *in vitro* e *in vivo* y tienen potencial para ser utilizados en terapia con fagos, para modular la microbiota intestinal como alternativa para el tratamiento de la obesidad.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| DERECHOS DE AUTOR | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| DEDICATORIA | iii |
| RESUMEN | iv |
| ÍNDICE | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS | ix |
| ANEXOS | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 Obesidad..... | 4 |
| 2.2 La microbiota intestinal | 5 |
| 2.2.1 Factores que alteran la microbiota intestinal..... | 6 |
| 2.2.2 Relación entre la dieta y la microbiota intestinal | 6 |
| 2.2.3 <i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>) | 7 |
| 2.2.4 <i>Akkermansia muciniphila</i> (<i>A. muciniphila</i>)..... | 8 |
| 2.3 Tratamiento para la obesidad | 9 |
| 2.4 Los bacteriófagos | 9 |
| 2.4.1 Clasificación de los bacteriófagos | 10 |
| 2.4.2 Fagoterapia | 23 |
| 2.4.3 Características de los fagos como agentes terapéuticos..... | 25 |
| 2.4.4 Productos en el mercado | 26 |
| 3. HIPÓTESIS | 28 |
| 4. OBJETIVOS | 29 |
| 4.1 Objetivo general..... | 29 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 29 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 5.1 Obtención de fagos a partir de muestras de aguas residuales .. | 30 |
| 5.1.1 Preparación de medios y cultivo de <i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 13047) | 32 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1.2 | Enriquecimiento de muestras para la obtención de fagos..... | 32 |
| 5.1.3 | Preparación de medios para aislamiento de fagos | 32 |
| 5.1.4 | Recuperación de fagos a partir de las muestras de aguas residuales | 32 |
| 5.1.5 | Purificación de fagos | 33 |
| 5.1.6 | Propagación de los fagos | 33 |
| 5.2 | Evaluación de termoestabilidad..... | 34 |
| 5.3 | Evaluación de la susceptibilidad del fago a diferentes pH..... | 34 |
| 5.4 | Prueba de infección a <i>Akkermansia muciniphila</i> | 34 |
| 5.5 | Caracterización genética | 35 |
| 5.6 | Análisis estadístico | 36 |
| 6. | RESULTADOS | 37 |
| 6.1 | Aislamiento de los bacteriófagos | 37 |
| 6.1.1 | Purificación de fagos | 40 |
| 6.1.2 | Propagación de los fagos..... | 43 |
| 6.1.3 | Prueba de infección a <i>Akkermansia muciniphila</i> | 43 |
| 6.1.4 | Evaluación de termoestabilidad | 43 |
| 6.1.5 | Evaluación de estabilidad de los fagos a diferentes pH.. | 45 |
| 6.1.6 | Caracterización genética del fago vB_EcIS_AS1 (PHEc1)..... | 47 |
| 7. | DISCUSIÓN | 53 |
| 8. | CONCLUSIONES | 59 |
| 9. | RECOMENDACIONES | 60 |
| 10. | BIBLIOGRAFÍA | 61 |
| | ANEXOS | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Descripción | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1. | Estructura general de los fagos del orden <i>Caudovirales</i> | 14 |
| 2. | Morfología de las tres familias de fagos pertenecientes al orden <i>Caudovirales</i> | 16 |
| 3. | Ciclo de vida de los fagos..... | 18 |
| 4. | Esquema de una curva típica de lisis en ciclo..... | 21 |
| 5. | Prueba SPOT de las muestras de aguas residuales. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8..... | 38 |
| 6. | Aislamiento, purificación y concentración de fagos..... | 42 |
| 7. | Comparación de las diferentes temperaturas sobre los fagos..... | 44 |
| 8. | Estabilidad de los fagos a distintos pH..... | 46 |
| 9. | Mapa genómico del bacteriófago <i>Enterobacter phage</i> <i>vB_EclS_AS</i> | 48 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Descripción | Página |
|--------------|--|---------------|
| 1. | Muestra de fagos obtenidos de aguas residuales..... | 31 |
| 2. | Características principales de los fagos líticos contra de <i>E. clocae</i> aislados en la prueba SPOT de las muestras de aguas residuales.... | 39 |
| 3. | Proceso de purificación de los fagos..... | 41 |
| 4. | Características y funciones generales de los ORF del fago vB_EclS_AS1..... | 49 |

ANEXOS

| Anexo | Descripción | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1. | Certificado de presentación de poster científico en el XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN) 2021..... | 67 |

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020) la ha definido como la condición en la cual, el exceso de tejido adiposo afecta de manera adversa la salud y el bienestar; se caracteriza por una serie de desórdenes metabólicos e inflamación, cuya magnitud y distribución condicionan la salud del individuo. La obesidad es el principal factor de riesgo para diferentes enfermedades crónicas, incluyendo diabetes y enfermedades cardiovasculares (Estrada-Velasco *et al.*, 2015). Su etiología se atribuye a una ingesta excesiva de energía, a un estilo de vida sedentario y a otros factores como predisposición genética o la privación del sueño; y más recientemente a la disbiosis intestinal (Muniz, 2016).

En los últimos años, la microbiota intestinal (MI) de humanos y animales ha sido objeto de estudio, y se ha propuesto como un factor que contribuye a la protección de diversas patologías. Numerosos estudios han revelado que una amplia diversidad de microorganismos en la MI está directamente correlacionada con una buena salud. La pérdida o desbalance de esta diversidad microbiana está directamente vinculada con la obesidad y otras patologías. Se han encontrado cambios cualitativos en la composición de la microbiota intestinal en personas con sobrepeso y obesidad, demostrando una reducción de bacterias beneficiosas como *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) (Cani & de Vos, 2017). La evidencia acumulada ha relacionado la abundancia de *A. muciniphila* con sus efectos beneficiosos en diversos trastornos metabólicos, como la obesidad. *A. muciniphila* se encuentra principalmente en la capa de moco y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera intestinal, que podría estar estrechamente relacionada con el intercambio de nutrientes, el intercambio de información, el desarrollo del sistema inmunológico y la resistencia a la invasión de microorganismos patógenos (Ji-Chao & Xiao-Wei 2019).

Por otro lado, un aumento en la cantidad de las bacterias perjudiciales como *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), han demostrado ser una causa de inflamación crónica en humanos y ratones (Keskitalo *et al.*, 2018; Seekatz *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el aumento de la ingesta de energía relacionada con la dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) aumenta la permeabilidad intestinal en ratones, lo que lleva a una elevación crónica del lipopolisacárido (LPS) circulante. Este estado, llamado endotoxemia metabólica, se ha relacionado aún más con el peso corporal elevado y el peso del tejido adiposo. Por lo tanto, parece posible que ciertas bacterias intestinales puedan contribuir con la endotoxemia metabólica y desempeñar un papel en el desarrollo de la obesidad y las enfermedades metabólicas. Curiosamente, se ha informado que el LPS de *E. cloacae* exhibe una actividad de endotoxina significativamente mayor que el LPS de otras bacterias (Keskitalo *et al.*, 2018; Sen *et al.*, 2017).

Con base en lo anteriormente mencionado, se han propuesto nuevas terapias para el tratamiento de la obesidad mediante la modulación de la MI, como la terapia con bacteriófagos (fagos). Los fagos, virus que infectan bacterias y arqueas, representan una de las alternativas prometedoras para ser utilizadas en el control de estas bacterias. Por medio de ellos, las bacterias podrían ser lisadas de forma selectiva y específica, sin perturbar la microbiota normal. Sin embargo, para fines de uso terapéutico, es necesario comprender en primera instancia, la naturaleza biológica y la forma en que se comporta el fago ante diferentes condiciones fisicoquímicas, para obtener una mejor posibilidad de éxito en la terapia con fagos (Reina & Reina, 2018).

La terapia con fagos puede ser usada como una alternativa novedosa y prometedora para reducir la obesidad mediante la modulación de especies bacterianas potencialmente responsables de la disbiosis intestinal de los humanos. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar biológica y molecularmente a bacteriófagos líticos contra la bacteria *Enterobacter cloacae*, con el fin de realizar más investigaciones *in*

vitro y ensayos clínicos para determinar los diversos efectos del uso de dicho tratamiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), la obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por el aumento de la grasa corporal, asociada con un mayor riesgo para la salud. La obesidad ha avanzado en forma alarmante en la mayoría de los países durante las últimas décadas. En el año 2016, más de 1.900 millones de adultos tenían sobrepeso u obesidad; de los cuales, el 39% de la población tenía sobrepeso y el 13% tenía obesidad (más de 650 millones de personas). Esta condición es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (OMS, 2020).

Según los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2018), México actualmente se encuentra en los primeros lugares de obesidad a nivel mundial, donde, de manera alarmante, la obesidad infantil ocupa el primer lugar con 35.6% (ENSANUT, 2018) y en segundo lugar el sobrepeso y obesidad en adultos (75.2%). Para el caso particular de Sinaloa, se estima que 7 de cada 10 personas tienen sobrepeso u obesidad, según los datos de la ENSANUT (2018).

La obesidad se desarrolla por un desequilibrio prolongado entre la ingesta calórica y el gasto energético (Muniz, 2016). A esto se suman otros factores que incluyen: predisposición genética, privación del sueño, desequilibrios hormonales, factores epigenéticos y la disbiosis intestinal.

Hoy en día, numerosos estudios han demostrado que nuestros hábitos alimenticios influyen fuertemente en la composición y función de la MI y eventualmente pueden contribuir al inicio o a la protección contra la obesidad (Cani & de Vos, 2017) y otras enfermedades asociadas.

Se cree que la perturbación de la composición y la actividad de la MI, también conocida como disbiosis, está involucrada en la aparición de la obesidad.

2.2 La microbiota intestinal

La microbiota, hace referencia al conjunto de microorganismos que colonizan una área del cuerpo en particular, ya sea la piel, el intestino, membranas mucosas, entre otras. Está conformada tanto por bacterias como por otros microorganismos como fungi, virus o arquea, los cuales conviven en una relación simbiótica con el ser humano (Del Campo-Moreno *et al.*, 2018).

Estudios recientes han demostrado que la MI está compuesta por 5 filos principales que habitan primordialmente en el intestino grueso (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019); donde, aproximadamente el 90% de las especies bacterianas pertenecen a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguidos de otros filos como *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Sin embargo, al ser la MI tan compleja y variable, es difícil establecer patrones similares entre individuos por la dominancia de algún tipo de bacteria (enterotipos). Entre las funciones de la MI se conoce que tiene diversos beneficios para el organismo humano, los cuales surgen a partir de muchos procesos fisiológicos por medio de interacciones con el huésped, como el fortalecimiento de la integridad intestinal a partir de moldear el epitelio del mismo, proteger contra patógenos, ayuda con la regulación del sistema inmune, participa en el metabolismo de algunos alimentos y medicamentos (Jandhyala *et al.*, 2015), la síntesis de vitaminas y ácidos biliares, entre otros (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019).

La MI tiene un rol importante en la regulación de la expresión de factores proinflamatorios en el huésped, lo cual se ha relacionado directamente con el mantenimiento y protección del sistema inmune. No obstante, existe la posibilidad de que estos mecanismos se vean interrumpidos por la alteración de la composición microbiana, conocida como disbiosis (Thursby & Juge, 2017). Esta disrupción microbiana puede presentarse por factores como una dieta inadecuada, mal uso de medicamentos y exposición a enfermedades crónicas, entre otros. Es decir, esto se relaciona con efectos adversos en la salud a corto y largo plazo como el sobrepeso, obesidad, asma, síndrome

metabólico e incluso el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas (Davis, 2016).

2.2.1 Factores que alteran la microbiota intestinal

La disbiosis intestinal se define como una alteración de la homeostasis de la microbiota intestinal, esta puede ser causada por la alteración del equilibrio ecológico en dicho órgano. Los diversos factores que alteran a la MI son el tipo de parto al nacer, si el recién nacido es alimentado con leche materna o fórmula, los alimentos con los que se inicie la alimentación complementaria, la genética de la persona, la edad, el nivel de actividad física que se realice, el tipo y la calidad de la dieta, el área geográfica en el que se encuentre el individuo, tratamientos crónicos con antibióticos, estrés, exposición a ciertos estados fisiológicos y patológicos, incluso se puede deber a alteraciones en el patrón del sueño (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019).

Adicional a lo mencionado anteriormente, hay un factor específico que juega un rol muy importante en el equilibrio bacteriano, y es la dieta del huésped. Ya que la MI participa en el metabolismo y síntesis de algunos nutrientes, se ha demostrado que la dieta puede inducir una disbiosis intestinal que puede resultar en obesidad, dislipidemia, inflamación, resistencia a la insulina, entre otros (Cuevas-Sierra *et al.*, 2019). O, por el contrario, algunos componentes de la dieta pueden favorecer a una MI relacionada con la protección del desarrollo de diferentes patologías. Esto quiere decir que el balance adecuado de la MI está íntimamente relacionado con los hábitos alimenticios y la dieta.

2.2.2 Relación entre la dieta y la microbiota intestinal

Se ha demostrado que un cambio en la dieta tiene un impacto en la composición de la MI dentro de las 24 h posteriores al momento en que se llevó a cabo ese cambio en la dieta (Proctor *et al.*, 2017). Los componentes de los alimentos son sustratos para la MI, las cuales, a su vez, producen pequeñas moléculas que, al ser metabolizadas en el hígado, afectan la

fisiología del huésped. Por ejemplo, los carbohidratos no digeribles en la dieta son fermentados por la MI para producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales han sido asociados como reguladores de la función inmunológica, la producción de hormonas intestinales y la lipogénesis (Albenberg & Wu, 2014).

También se ha demostrado que el consumo de dietas altas en grasa y dietas altas en azúcar se han asociado con una mayor producción de factores proinflamatorios bacterianos, como LPS. Un aumento de LPS circulantes generan un estado conocido como endotoxemia metabólica. La endotoxemia metabólica ha sido relacionada como un factor crucial desencadenante de inflamación sistémica, con la alteración de la función hepática, alteración en la ingesta de alimentos y promover la acumulación de grasa corporal (Sen *et al.*, 2017; Escobedo *et al.*, 2014).

Se ha mencionado también que la dieta que aporta mayor beneficio a la MI es la conocida como dieta mediterránea, la cual se compone de frutas, verduras, leguminosas, pescado, nueces, aceite de oliva y un bajo consumo de carnes rojas, grasas saturadas y azúcares (De Filippis *et al.*, 2016).

Finalmente, en estudios en los que se comparó la composición microbiana de sujetos obesos con delgados, se observó una menor diversidad y abundancia de algunas especies en la microbiota de los sujetos obesos (Radilla-Vázquez *et al.*, 2016) lo cual indica la relación entre la composición de la MI y el desarrollo de obesidad.

2.2.3 *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*)

E. cloacae es una bacteria anaerobia facultativa, de la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativa, flagelada y se ha demostrado que causa infecciones oportunistas graves en humanos (Schlossberg, 2015), así como infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias como diarrea, meningitis, infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemia, neumonía, infecciones del sitio quirúrgico y sepsis (Schlossberg, 2015).

E. cloacae es un miembro de la MI humana normal. Se ha informado que el LPS de *E. cloacae* exhibe una actividad de endotoxina significativamente más alta que el LPS de otras bacterias intestinales más abundantes (Keskitalo *et al.*, 2018).

Un estudio de caso realizado por Fei & Zhao (2013), relacionó el aumento de la presencia de *E. cloacae* en el intestino de humanos con la obesidad, donde la reducción de *E. cloacae* a niveles no detectables, se asoció con una reducción paralela en la carga de endotoxinas y una pérdida de peso significativa en una persona con obesidad mórbida. Además, la misma cepa bacteriana, aislada de esa persona, inició la obesidad y desencadenó la inflamación cuando se introdujo en ratones libres de gérmenes (Yan *et al.*, 2016). Los estudios antes mencionados sugieren que *E. cloacae* puede contribuir con el desarrollo de obesidad, posiblemente a través de una endotoxina o un mecanismo mediado por la inflamación inducida por flagelos (Keskitalo *et al.*, 2018).

2.2.4 *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*)

Es una bacteria Gram negativa, anaeróbica estricta, miembro de las *Verrucomicrobia*, representa alrededor de un 3% a 5% de las bacterias totales, lo que la hace una de las más abundantes en la MI. Vive en la capa mucosa del intestino, donde tiene la capacidad de degradar la mucina a oligosacáridos y AGCC, pero también de promover al mismo tiempo su síntesis, lo cual parece ser crucial para mantener la integridad de la capa de moco intestinal y su adecuada permeabilidad (Macchione *et al.*, 2019). A pesar de ser una bacteria Gram negativa, sus niveles se correlacionan inversamente proporcional con afecciones inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad y la diabetes.

2.3 Tratamiento para la obesidad

Actualmente, el tratamiento para la obesidad, generalmente se ha basado en los cambios de estilo de vida (actividad física y alimentación saludable), junto con el tratamiento farmacológico para las diferentes patologías o inclusive algunas intervenciones quirúrgicas. Con el conocimiento que se tiene ahora del papel de la MI en la obesidad, se ha tratado de modificar su composición con el uso de probióticos (principalmente los *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*), prebióticos (principalmente fructanos tipo inulina y los galactooligosacáridos) y simbióticos (probióticos y prebióticos) para crear un ambiente favorable para las bacterias benéficas (Álvarez-Mercado *et al.*, 2019).

Recientemente se han desarrollado estudios en modelos animales donde se ha utilizado la bacteria *A. muciniphila*, los cuales muestran evidencias que dicha bacteria puede contribuir a proteger contra trastornos metabólicos específicos y factores de riesgo cardiometabólicos asociados con un tono inflamatorio de bajo grado (Cani & de Vos, 2017). También se está proponiendo el uso de la terapia con fagos para la modulación de la MI y ser una nueva alternativa de tratamiento para la obesidad.

2.4 Los bacteriófagos

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias y arqueas. Fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 (Twort, 1915) y posteriormente, en 1917, por Félix d'Herelle, quien realizó grandes aportaciones al estudio de los fagos. Félix d'Herelle, les dio el nombre de bacteriófagos por su capacidad de lisar bacterias (del griego phagein: "comer") (d'Hérelle, 1917). Los fagos son las entidades biológicas más abundantes y antiguas que se encuentran en la biosfera, se estiman en un total de 10^{30} a 10^{32} en todo el planeta (Olszak, 2017), y juegan un papel importante en el balance de los ecosistemas bacterianos (Kutter, 2005).

2.4.1 Clasificación de los bacteriófagos

Existen 14 familias de fagos que se clasifican de acuerdo con la naturaleza de su genoma y con sus características morfológicas (ICTV, 2022). De acuerdo con su forma, los fagos se dividen en fagos con tallo (cola), poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Ackermann, 2003), de los cuales, los más abundantes (cerca del 96%) son los del orden *Caudovirales* (Hendrix, 2002; Ackermann, 2003).

Los *Caudovirales*, comprenden un orden de virus que infectan a células procariotas (bacterias y arqueas). Comprenden la mayor parte de los fagos. Según el esquema de clasificación de Baltimore los *Caudovirales* se integran en el Grupo I, ya que tienen genomas de ADN bicatenario de 18000 pares de bases y 500000 pares de base de longitud. Las partículas virales tienen una forma distintiva con una cabeza icosaédrica que contiene el genoma y que está conectada a una cola (Malik *et al*, 2017; Drulis-Kawa *et al* 2012). El orden abarca una amplia gama de virus, muchos de los cuales tienen genes similares o iguales. La secuencia de nucleótidos puede variar extensamente, incluso entre el mismo género.

Debido a su estructura característica, se cree que comparten un origen común y que fueron los ancestros de los herpesvirus, según análisis filogenéticos y estructurales (Ackermann H 1998). Los caudovirus infectan bacterias y arqueas de casi todos los filos. Desde su origen, los caudovirus aparentemente fueron los que ganaron la competencia a los demás tipos de virus procariotas y por ello son muy abundantes, se hallan con más frecuencia en los cultivos, muestras metagenómicas y endogenizados. Su forma de virión es la popularmente concebida para todos los fagos, a pesar de que los fagos pueden tener diferentes formas de virión al igual que los virus eucariotas (Maniloffi & Ackermann H., 1998).

Actualmente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2022) incluye catorce familias (*Ackermannviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*,

Guelinviridae, Rountreeviridae, Salasmaviridae, Saltoviridae, Schitoviridae, Zobellviridae, Drexelviriidae) dentro del mismo orden (ICTV, 2022).

La familia *Drexelviriidae*, nombrada en honor al investigador pionero del fago T1 Henry Drexler (n. 1927, r. 1991, Wake Forest University Medical Center, Winston-Salem, EE.UU.). Cuando se propuso originalmente en 1996, los "fagos similares a T1" incluían una sola especie, el fago T1 de *Enterobacteriaceae*. Desde entonces, se han introducido numerosos cambios taxonómicos, cambiando el nombre del género a "*T1likevirus*" a "*Tunlikevirus*" a "*T1virus*" y finalmente a "*Tunavirus*". En 2015, se introdujo la subfamilia *Tunavirinae*, que consta de cinco géneros: *Kp36virus*, *Rogue1virus*, *Rtpvirus*, *T1virus* y *Tlsvirus*. En 2018, se incluyeron tres géneros adicionales: *Eclunavirus*, *Hanrivervirus* y *Sertoctavirus*; y los géneros *Rogue1virus*, *T1virus* y *Kp3virus* pasaron a llamarse *Rogunavirus*, *Tunavirus* y *Webervirus*, respectivamente. En total, se han clasificado 31 especies. El GenBank ahora contiene las secuencias del genoma de 84 fagos relacionados con T1, lo que exige un nuevo examen de las relaciones dentro de la subfamilia. Los huéspedes pertenecen predominantemente al género *Escherichia*, pero también se han aislado y secuenciado fagos específicos contra los géneros *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Shigella*. Estos hospederos son todos miembros de la clase Gammaproteobacteria. Los genomas del fago tienen una longitud media de 48.9 kpb (46,0% en el contenido de G+C) y codifican aproximadamente 79 proteínas y de 0-2 ARNt. Esto resultó en la adición de 12 nuevos géneros y tres nuevas subfamilias (*Tempevirinae* [incluidos los géneros *Tlsvirus*, *Hanrivervirus* y *Warwickvirus*], *Rogunavirinae* [incluidos los géneros *Rogunavirus*, *Eastlansingvirus*, *Wilsonroadvirus* y *Lindendrivevirus*] y *Braunvirinae* [incluidos los géneros *Rtpvirus*, *Shandongvirus*, *Loudonvirus* y *Guelphvirus*]).

2.4.1.1 Fago T1

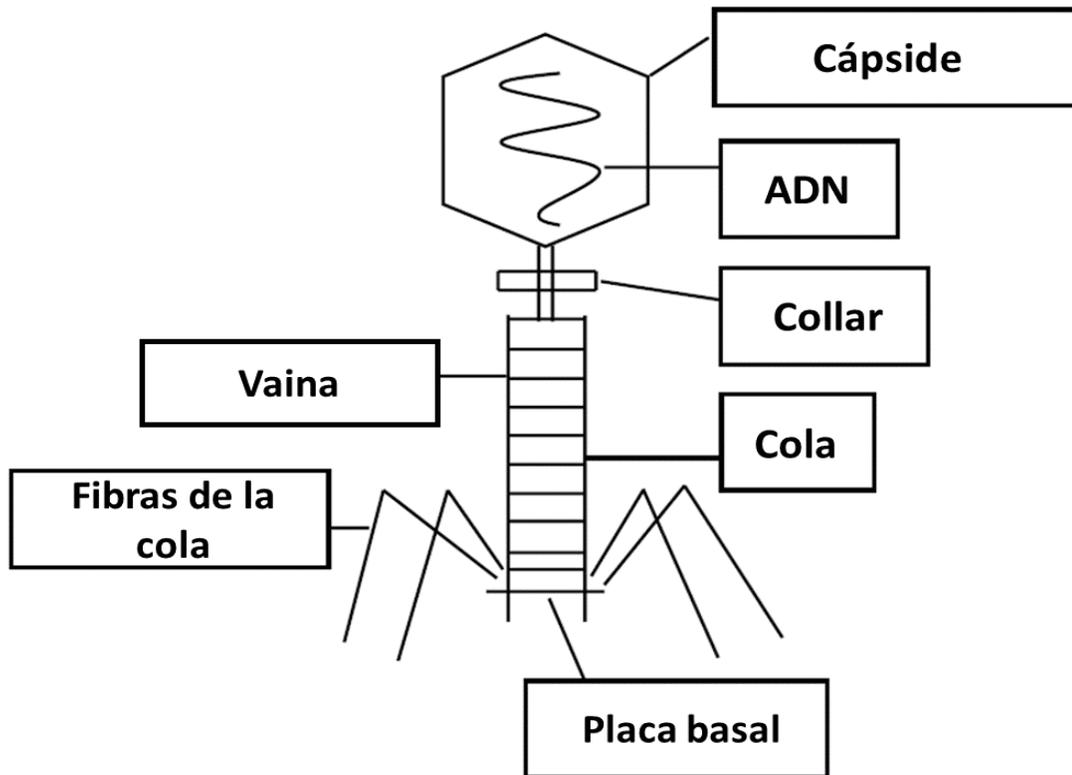
Los fagos similares a T1 tienen una cabeza icosaédrica de aproximadamente 60 nm y una cola delgada flexible de aproximadamente 150 nm, lo que los coloca en la familia recién formada de fagos con cola, *Drexlerviridae*, que consta de fagos similares a T1 de la familia *Siphoviridae* (Adriaenssens *et al.*, 2020). El fago T1 fue uno de los primeros fagos que se estudiaron a detalle por Drexler, H (1988), quien demostró que el fago T1 tenía propiedades únicas y pronto se hizo famoso. Hasta la fecha, se han aislado muchos más parientes del fago T1 y se ha secuenciado su genoma. Parece que los parientes cercanos del fago T1 sólo pueden infectar especies de *E. coli* y *Shigella*. Los fagos de este grupo se clasifican en el género *Tunavirus* y, junto con otros fagos similares a T1, se clasifican en otros dos géneros en la subfamilia *Tunavirinae*. La familia *Drexlerviridae* consta de tres subfamilias adicionales, que contienen muchos géneros de fagos similares a T1, todos los cuales se aislaron utilizando *Gammaproteobacteria* como huéspedes se clasifican en otros dos géneros en la subfamilia *Tunavirinae* (Niu *et al.*, 2014; E. M. Adriaenssens *et al.*, 2020).

Los fagos similares a T1 son virulentos y tienen altas tasas de adsorción, por lo que han ganado atención como fagos candidatos en el desarrollo de la terapia con fagos (Divya Ganeshan & Hosseinidoust, 2019). La tasa de adsorción del fago T1 es de alrededor de $3 \times 10^{-9} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$, que se considera una de las tasas más altas de adsorción de fagos, y el tiempo desde la infección hasta la lisis de la bacteria es corto, 15 a 20 min (Drexler, 1988) (German GJ, Misra R, & AM, 2016). Estas propiedades resultarían ventajosas para la terapia con fagos, ya que teóricamente conducen a una eliminación rápida de una bacteria infectante, siempre que la dosis de fago que llegue a la bacteria sea lo suficientemente alta.

2.4.1.2 Morfología de los bacteriófagos

Todos los fagos del orden *Caudovirales* presentan la misma estructura general. En ese sentido, todos poseen una cápside (en cuyo interior se empaqueta el ADN), un collar, una cola, una placa basal, así como fibras de la cola y vaina (Adriaenssens *et al* 2018; Ackermann H 1998)(**Figura 1**).

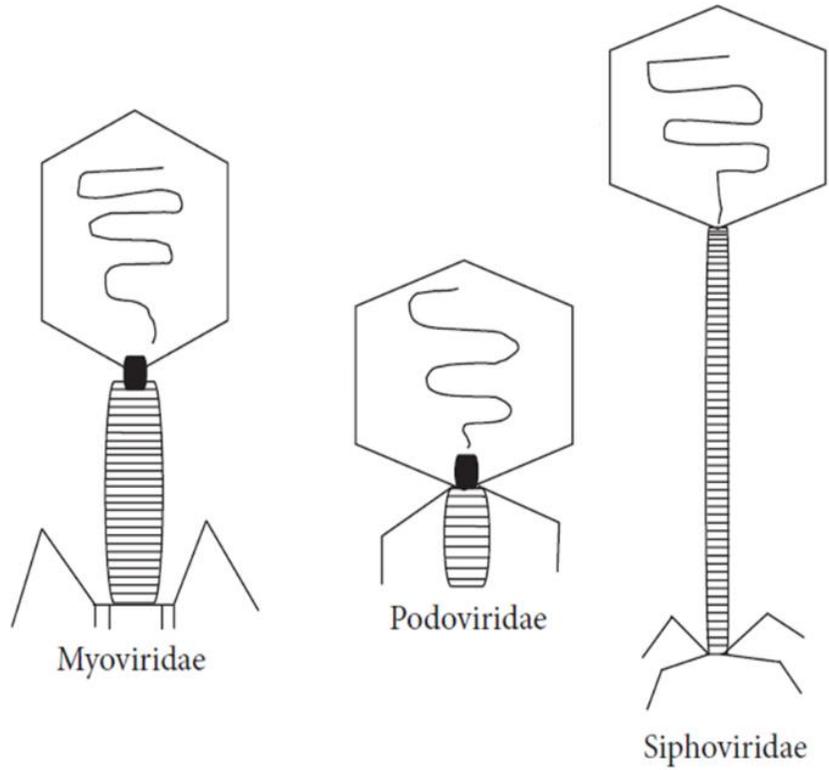
Figura 1. Estructura general de los fagos del orden *Caudovirales*.



Fuente: Imagen modificada de Elbreki *et al.*, (2014).

Actualmente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2022) incluye catorce familias, estas surgieron a partir de estas 3 familias, por lo que muestran una de estas tres morfologías. La familia *Myoviridae* tiene colas contráctiles y rígidas, *Podoviridae* colas cortas no contráctiles y *Siphoviridae* colas largas y flexibles. Los fagos pertenecientes a otras familias tienen morfologías altamente variables con genomas de diferente composición de ácidos nucleicos (**Figura 2**) (Buttimer *et al.*, 2017).

Figura 2. Morfología de las tres familias de fagos pertenecientes al orden *Caudovirales*.



Fuente: Imagen modificada de Elbreki *et al.*, (2014).

La mayoría de los virus se encuentran usualmente en un rango de tamaño de cápside entre 30 y 60 nm, aunque existen excepciones de virus con cápsides mayores de 60 nm y menores de 30 nm. Sin embargo, han sido reportados virus gigantes con cápsides de 200 a >700 nm en aguas dulces y ambientes marinos (Weinbauer, 2004).

2.4.1.3 Ciclo de vida de los fagos

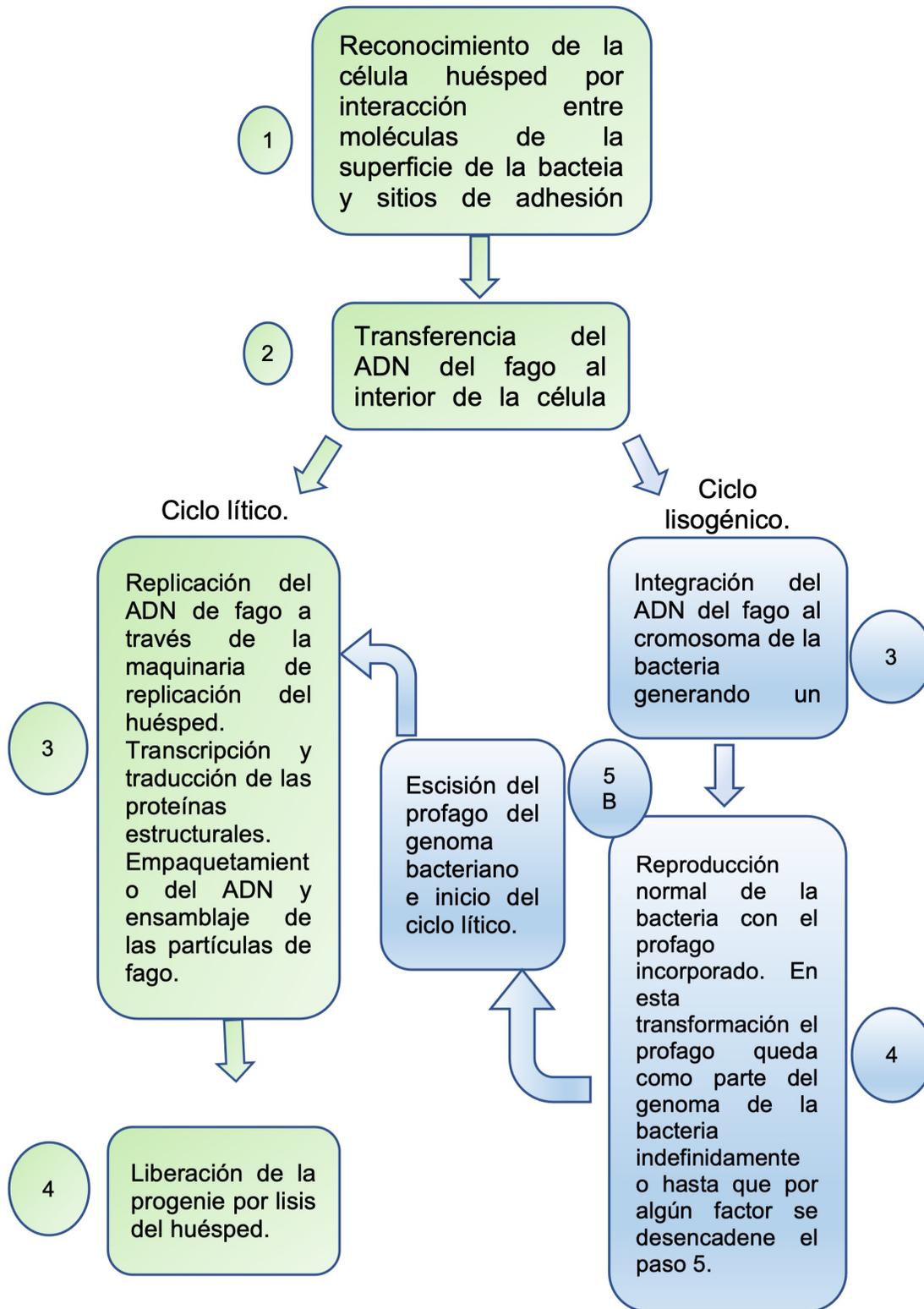
Los ciclos de vida de fagos se pueden dividir en dos tipos:

Ciclo lítico: el fago infecta a una bacteria, inserta su material genético, se replica en el interior de la bacteria, se produce la lisis y muerte celular liberando los nuevos viriones. (Zeng *et al*, 2010; Manrique *et al*, 2017)

Ciclo lisogénico: el fago infecta una bacteria e inserta su ADN en el cromosoma bacteriano, lo que permite que el ADN del fago (ahora llamado profago) sea copiado y transmitido junto con el propio ADN de la célula (WeinbauerMG, 2004).

Los procesos lítico y lisogénico se representan en el siguiente diagrama, **Figura 3.**

Figura 3. Ciclo de vida de los fagos.



2.4.1.3.1. El ciclo lítico

Los pasos implicados en el ciclo lítico de un fago juega un papel determinante en su predominio sobre otros con el mismo hospedero en un ecosistema determinado. En términos generales, Los fagos que infecten diferentes huéspedes, y generen mayor número de bacterias infectadas y mayor cantidad de viriones por célula en un lapso menor serán los fagos que predominen(Reina & Reina 2018).

2.4.1.3.1.1. Reconocimiento y adsorción.

El fago se une a la bacteria huésped de forma estable, se produce una unión por interacción de las fibras de la cola con moléculas de la superficie de la bacteria, que ayudan a posicionarse correctamente y generar la unión irreversible (Bertozzi et al, 2016; Duckworth 1987). El tipo de receptor de la superficie de la bacteria va a variar dependiendo si es bacteria Gram positiva (elementos del peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular) (Xia et al, 2011) y Gram-negativas (componentes de los LPS), y proteínas de la membrana externa como porinas y proteínas de transporte) (Marti et al, 2013). Cualquier componente de matriz externa que secrete la bacteria pueden ser utilizados como receptores, tal como los antígenos k de los exopolisacáridos capsulares o las proteínas de la capa S (Barr jj, 2017; Eh h, 2019). Un fago puede tener varias moléculas como receptoras y poseer adhesinas diferentes en su estructura. Cuantas más moléculas un fago pueda reconocer como receptores el rango de huésped será más amplio, es decir, el número de cepas, especies y en algunos casos géneros bacterianos que podrá utilizar como huéspedes será mayor (Letarov & Kulikov, 2017; Kutter & Sulakvelidze, 2015). La intensidad con la que interaccione la adhesina con su receptor determinará la eficiencia de adsorción del fago (Clokic & Kropinski, 2009).

2.4.1.3.1.2. Replicación: Eclipse y latencia

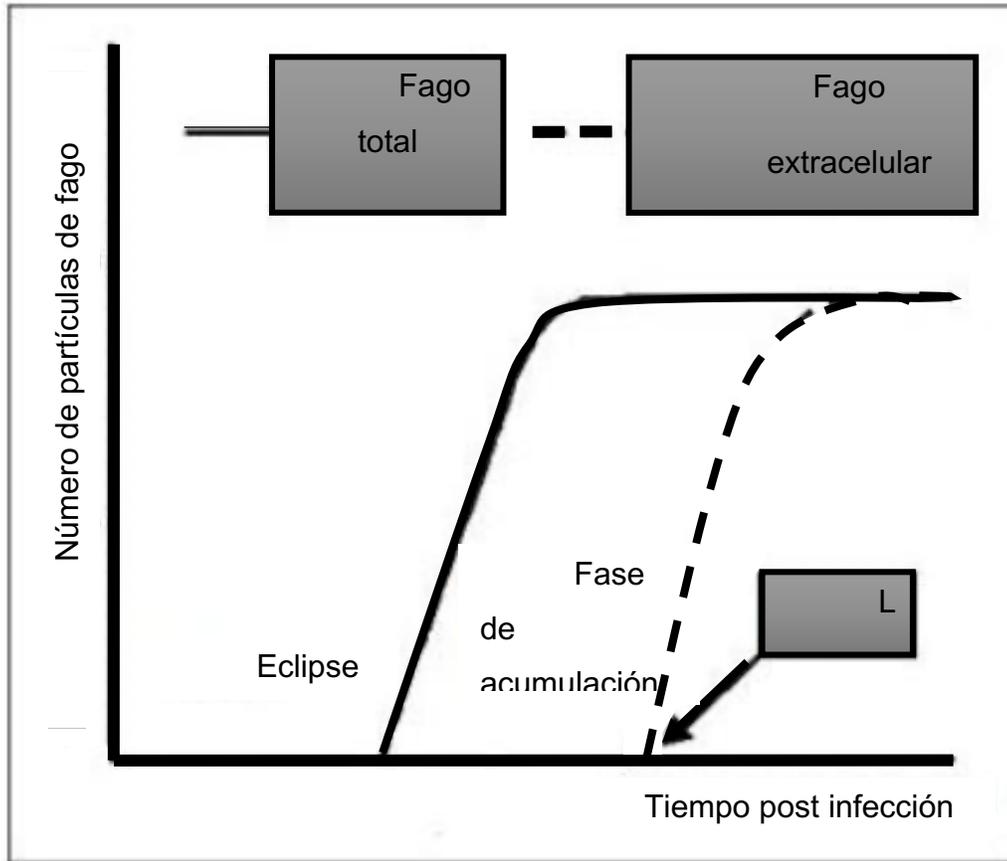
La eficacia en la replicación de los fagos dependerá de su naturaleza y del tipo de huésped, y las condiciones fisiológicas del hospedero. La rapidez con que se replique el ADN de un fago, y se generen las proteínas de cubierta y de ensamble, se establecerá lo que se conoce como periodo de eclipse, este se conoce como el tiempo transcurrido desde la infección hasta la formación de las partículas de fago completas (infectivas) (Clokier & Kropinski, 2009). El periodo que pasa de la infección del huésped a la liberación de partículas del fago por lisis del huésped que es inducida por el fago se le denomina periodo de latencia.

2.4.1.3.1.3. Liberación de la progenie de fagos.

En este paso del ciclo lítico, los nuevos fagos se liberan y pasan a infectar nuevos huéspedes (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994), comenzando nuevamente el ciclo de lisis. El número de partículas que se libera por cada bacteria infectada se denomina tamaño de explosión (“burst size”, en inglés) (Chow *et al.*, 1988; Dini *et al.*, 2012). El tamaño de explosión de los fagos podría variar en diferentes huéspedes, variando desde algunas unidades hasta miles.

En la **Figura 4** se muestra una típica curva de lisis en un ciclo.

Figura 4. Esquema de una curva típica de lisis en ciclo.



2.4.1.3.2. El ciclo lisogénico

Varios fagos tienen la capacidad de incorporarse de manera reversible al genoma del huésped, de forma que no puede multiplicarse de inmediato después de la infección, pero permitiendo que el ADN viral se replique como profago al mismo tiempo que sucede la replicación del ADN del huésped en el proceso de división celular, pasando la bacteria huésped a denominarse bacteria lisogénica. (Varona, 2017) Cuando el genoma de un fago se intercala en el genoma bacteriano se le conoce como profago (Fillol-Salom, 2019).

Los profagos generan un gran aporte a la diversidad genética de las bacterias (Miller et al., 2004). La mayoría de los profagos comparten una misma organización de sus genomas (Fillol-Salom, 2019).

Los profagos tienen una aportación muy relevante en la diversidad y evolución de las bacterias, ya que ejercen acciones en la transferencia de genes que pueden alterar el genotipo y fenotipo del huésped (Argov *et al*, 2017), tal como son los genes de virulencia, toxinas, resistencia a antibióticos, antígenos de superficie, etc (Boyd, 2012).

Los profagos pueden elegir seguir en el ciclo lisogénico o cambiar al ciclo lítico, dependiendo las condiciones ambientales (Los *et al*, 2012; Cenens *et al*, 2015). Esta elección dependerá del mecanismo denominado interruptor molecular, dominado por la presencia de dos proteínas CI y Cro que son producto de la expresión de dos genes. Estas proteínas se sintetizan después de la inyección de ADN viral en la bacteria huésped. El ciclo final del fago dependerá de la concentración de las proteínas CI y Cro en el citoplasma de la bacteria. Cuando la concentración de Cro es mayor que la concentración de CI se inhibiría el ciclo lisogénico y el fago entraría en el ciclo lítico. Y viceversa con la concentración de la proteína CI (Clokier & Kropinski, 2009; Calendar, 2006).

2.4.1.4 Secuenciación de los genomas de bacteriófagos

En la era genómica, durante la década de los años 70's del siglo XX, los fagos tuvieron un papel importante. El primer genoma secuenciado de la historia fue el del fago MS2 en 1976, el cual posee un genoma de ARN. Posteriormente fue secuenciado el genoma de ADN del fago ϕ X174, el primero obtenido con un nuevo método de secuenciación rápida desarrollado por Walter Gilbert y Fred Sanger (Frederick Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). En ambos casos los fagos poseen genomas pequeños con solo cuatro y diez genes, respectivamente (Koonin, 2003).

En 1982, se publicó el genoma del fago λ (F Sanger, Coulson, Hong, Hill, & Petersen, 1982). En 1983 se reportó la secuencia del genoma del fago T7 (Dunn, Studier, & Gottesman, 1983) y diez años después la secuencia del genoma del mycobacteriófago L5 (Hatfull & Sarkis, 1993). A partir de entonces, el número de secuencias de genomas de fagos ha ido en aumento (Hatfull, 2008). Para el año 2002 existían cerca de 100 genomas de fagos de cola secuenciados en las bases de datos. (Brüssow & Hendrix, 2002). En la actualidad el número alcanza más de 22000 genomas completos en las bases de datos de NCBI (Cook-Ryan *et al.*, 2020).

2.4.2 Fagoterapia

2.4.2.1 Historia

El concepto de fagoterapia, es el uso de fagos específicos contra bacterias patógenas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Esta práctica fue planteada por primera vez por Félix d'Herelle en 1917, como un posible tratamiento de *Shigella dysenteriae* en el tratamiento de enfermos de difteria (Abedon *et al*, 2011; d'Herelle 2017), desde inicios del siglo XX se ha utilizado la fagoterapia en países del Este de Europa (Luong, 2020; Bradley, 1967). En 1923 en la ciudad de Tbilisi, capital de la República independiente de Georgia, se fundó el instituto Eliava de fagos, microbiología y virología, por el científico Giorgi Eliava con la colaboración de Félix d'Herelle. Siendo actualmente uno de los principales institutos de investigación y desarrollo de

productos comerciales de fagos (Abedon *et al*, 2011). Durante y después de la Segunda Guerra Mundial, este instituto producía elevadas cantidades de fagos, para el control de infecciones bacterianas, hablamos de la era pre-antibióticos, donde no había muchas opciones para el tratamiento de infecciones bacterianas (Abedon *et al*, 2011).

Desde entonces la cantidad de tratamientos que se han realizado es enorme, y los resultados solo se han difundido a nivel local, y no han sido documentados correctamente. Este fenómeno ha ocasionado dudas a nivel global, ya que los trabajos que se pudieron recuperar carecen de controles y de información detallada, por lo que han recibido fuertes críticas (Kropinski, 2006; Cisek 2017).

Los ensayos clínicos que se han documentado sobre el uso de fagos como agentes terapéuticos fueron publicados por el “Instituto Hirszfeld” fundado en 1952 en Wroclaw, Polonia. Siendo el segundo más grande de Europa Oriental en investigación y desarrollo de terapia con fagos (Reina & Reina, 2018). Ellos han publicado los datos de alrededor de 2000 pacientes infectados con diferentes patógenos (resistentes a antibióticos) que fueron tratados con fago, teniendo una tasa de éxito del 60 y 90% (Mandal *et al.*, 2014).

En los países de Occidente, el uso desmedido de antibióticos a partir de los 40’s hizo de lado el desarrollo de la fagoterapia. El desarrollo de algunas formulaciones de fagos continuo solo de forma aislada y a pequeña escala durante los años 50 y 60 ‘s ‘ (Krylov *et al.*, 2014; Kutter, 2005).

El uso de antibióticos de manera excesiva, trajo al mismo tiempo la aparición de bacterias multirresistentes, bacterias resistentes a ellos, y el desarrollo de nuevos antibióticos, (Häusler & Häusler, 2006; Hesse & Adhya, 2019).

El problema de la resistencia a múltiples antibióticos se encuentra en crecimiento (Royer 2021), y al aumento del uso de antibióticos no solo para el tratamiento de las infecciones en humanos, y en veterinaria(Abedon, 2011),

sino para su uso preventivo y como promotores de crecimiento (Colavecchio *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2005).

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes, ha hecho que surja el interés en la fagoterapia como biocontrol de patógenos (Luong, 2020).

Ventajas del uso de fagos

- La alta especificidad de infección (Wittebole *et al.*, 2013).
- El costo y tiempo de producción (Loc-Carrillo & Abedon 2011).
- Mecanismo de acción diferente al de los antibióticos (Hanlon 2007).
- La dosis inicial de fagos se incrementa exponencialmente al alcanzar el foco de la infección (Loc-Carrillo & Abedon 2011).
- Los fagos tienen la habilidad de mutar ante la aparición de bacterias resistentes.

2.4.3 Características de los fagos como agentes terapéuticos

Los fagos que se escogen como agentes de biocontrol y fagoterapia deben ser altamente infectivos y específicos, pero en un amplio número de cepas del patógeno blanco, estos deben ser fagos líticos y no deben de recombinarse con el ADN de la bacteria huésped como profagos (WeinbauerMG, 2004; Drulis-Kawa *et al.*, 2012).

Los fagos no deben poseer genes de virulencia o de resistencia a antibióticos que puedan ser incorporados al genoma del huésped por transducción o bien, que no posea genes de alergenicidad para los pacientes.

El éxito del tratamiento con fagos va depender de las mejores características para la aplicación deseada (Casey 2018). Ejemplo: para ser utilizados *In vivo* deben ser inocuos para la flora comensal, para ser aplicados de manera oral, debe resistir la acidez estomacal y alcanzar la localización del patógeno en concentraciones aptas para que se produzca su eliminación (Koo *et al.*, 200; Dini *et al.*, 2012) así como resistir diferentes temperaturas sin disminuir su eficacia. (Hesse & Adhya, 2019).

2.4.4 Productos en el mercado

Existen actualmente varias compañías en el mundo dedicadas a la fabricación de cocteles comerciales de fagos, para las diferentes áreas de aplicación. Algunas de las compañías dedicadas a este tipo de productos fueron publicadas en el artículo “Phage therapy” (Housby & Mann, 2009).

Uno de los cocteles de fagos disponible comercialmente es PreforPro[®] cápsulas, preparadas por Deerland Enzymes (Kennesaw, GA, EE. UU.) que se ha utilizado en ensayos clínicos para ayudar con el tratamiento de problemas gastrointestinales por *Escherichia coli* y ha demostrado que la ingestión oral del cóctel de fagos era segura, tolerable y además mostraba niveles reducidos o indetectables de *E. coli* después del tratamiento y los fagos consumidos no alteraron globalmente la microbiota (Housby & Mann, 2009).

Compañías que en sus productos utilizan fagos, existen dos tipos de desarrollo:

- 1) Intralytix, BioControl, BioPhage Pharma y Novolytics, estas compañías emplean fagos líticos que se encuentran naturalmente en el ambiente o de mutantes espontáneos, de éstos se producen cocteles que infectan a un gran número de cepas de un patógeno determinado.
- 2) PhicoTherapeutics (UK) esta compañía genera fagos genéticamente modificados estos poseen el gen de una proteína que es generalmente tóxica para bacterias, o producen fagos para reconocer diferentes receptores o mutantes que no “destruyan” la bacteria durante la lisis. Teniendo como desventaja obstáculos regulatorios por ser microorganismos genéticamente modificados.

Bajo esa premisa, en la actualidad es necesaria la búsqueda de una alternativa de tratamiento o control de la obesidad. La comunidad científica ahora ha reconocido la importancia de mantener una microbiota intestinal equilibrada para mantener un estado saludable. Para ello se están estudiando

diversas terapias estratégicas para restaurar y/o mantener el estado eubiótico del ecosistema microbiano intestinal. Las principales estrategias terapéuticas, las más conocidas y adoptadas en la actualidad, incluyen (i) la administración de bacterias probióticas que probablemente desplacen a las bacterias potencialmente patógenas y promuevan un reequilibrio de la comunidad microbiana; (ii) la administración de prebióticos (es decir, formulaciones de nutrientes que se metabolizan preferencial o exclusivamente por bacterias probióticas) para favorecer el crecimiento excesivo de bacterias probióticas; y (iii) la administración de combinaciones de probióticos y prebióticos (llamados simbióticos) (Antonella-Gagliardi, 2018).

Se han propuesto enfoques terapéuticos más recientes, como la utilización de la terapia de fagos (Antonella-Gagliardi, 2018; Gordillo-Altamirano, 2019), que se dirija específicamente a afectar la presencia de bacterias asociadas con su desarrollo y por lo tanto visualizar una posibilidad de tratamiento probiótico para su control, sin embargo, esta línea de investigación por ahora tiene más preguntas que respuestas y esta investigación busca explorar y sentar las bases de la terapia de fagos para el control de la obesidad y poder así disminuir su alta prevalencia propia de nuestros días.

3. HIPÓTESIS

Existen fagos con características genéticas y biológicas adecuadas para su uso en terapia para revertir la obesidad que muestran actividad lítica contra *E. cloacae* pero que no infectan a *A. muciniphila* en un modelo *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener bacteriófagos con cualidades biológicas y genéticas aptas para ser utilizados para el control de *Enterobacter cloacae*.

4.2 Objetivos específicos

1.- Aislar fagos con actividad lítica contra las cepas de *Enterobacter cloacae* a partir de muestras de aguas residuales del estado de Sinaloa.

2.- Evaluar a actividad lítica de los bacteriófagos aislados contra cepas de *Enterobacter cloacae* y *Akkermansia muciniphila*.

3.- Caracterizar de forma genética a los fagos con actividad lítica contra cepas de *Enterobacter cloacae*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de fagos a partir de muestras de aguas residuales

Se obtuvieron 8 muestras de plantas tratadoras de aguas residuales provenientes del estado de Sinaloa, como se muestra en la **tabla 1**.

Los lugares elegidos para la recolección de muestras son similares a lo reportado en la literatura; el motivo de la toma de muestras en estos puntos específicos fue porque son plantas de tratamiento cercanas y tal como lo reporta la bibliografía, en aguas residuales hay grandes cargas de Enterobacterias y, por lo tanto, de fagos. (Leeuw *et al.*, 2017). Esto es de gran importancia ya que donde hay bacterias posiblemente estén sus respectivos fagos (Tomat *et al.*, 2014; Mattila *et al.*, 2015; McShan y Nguyen. 2016).

Tabla 1. Muestra de fagos obtenidos de aguas residuales.

| NUMERO DE MUESTRA | UBICACIÓN | CORDENADAS | FECHA DE TOMA DE MUESTRA |
|--------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|
| M1 | El Dorado, Sinaloa | 24°18'15.4"N 107°22'56.0"W | 22/11/20 |
| M2 | Influente el Dorado, Sinaloa | 24°18'15.4"N 107°22'56.0"W | 17/11/20 |
| M3 | Tratadora de agua. En el Dorado, Sinaloa | 24°18'15.4"N 107°22'56.0"W | 17/11/20 |
| M4 | Influente Mocorito | 25°28'43.8"N 107°56'11.1"W | 26/11/20 |
| M5 | Planta de tratamiento Guasave, Sinaloa. | 25°27'17.1"N 108°31'02.4"W | 13/11/20 |
| M6 | Influente Guamúchil, Sinaloa | 25°24'46.4"N 108°05'08.2"W | 26/11/20 |
| M7 | Influente Culiacán, Sinaloa | 24°42'26.7"N 107°25'00.7"W | 17/11/20 |
| M8 | Planta de tratamiento Guasave, Sinaloa. | 25°27'17.1"N 108°31'02.4"W | 13/11/20 |

De cada planta de tratamiento de aguas residuales se tomaron 10 litros de agua. A esta se le aplicó un proceso de ultrafiltración para reducir 10 litros a un volumen de 100 mililitros. Utilizando Filtros de diálisis de polisulfona de un solo uso (Modelo Optiflux® F180NR; Fresenius Medical Care, Waltham, MA, USA) se utilizaron para cada muestra. Este proceso se aplicó con la finalidad de concentrar los microorganismos en un volumen pequeño y aumentar la probabilidad de detección.

5.1.1 Preparación de medios y cultivo de *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047)

Se utilizó el medio de cultivo caldo Luria Bertani (LB) (Sigma, USA) preparado bajo las indicaciones del fabricante y se esterilizó durante 15 min a 121 °C (Tuttnauer autoclave- steam sterilizer, modelo 385ELVD Israel.).

Para la preparación del agar utilizamos 3 g de caldo LB, 120 mL de agua destilada y 1.8 g de agar. Se dejó hirviendo por 1 minuto con agitación, se ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 y se esterilizó. Se vertió el agar en cajas Petri y se dejaron solidificar hasta obtener una consistencia firme.

Activación de E. cloacae:

Se agregó 1 mL del caldo LB en un tubo de ensayo en ambiente estéril, después con un asa estéril se estriaron 3 cajas petris y se inocularon 3 tubos de ensayo. Los tubos de ensayo se dejaron en baño maría a 30 °C y las cajas Petri en incubación a 37 °C por 24 horas.

5.1.2 Enriquecimiento de muestras para la obtención de fagos

Se prepararon tubos con 20 mL de caldo LB 2x , se le agregaron 20 mL de la muestra de agua residual, 1 mL de la cepa de *E. cloacae* y se dejó en baño maría con agitación a 100 rpm por 24 horas a 37 °C.

5.1.3 Preparación de medios para aislamiento de fagos

Se preparó caldo de soya tripticasa (TSB) (BD Bioxon, México), TSB-agarosa 0.4% (para la capa suave de doble agar) en tubos de ensayo con 3 mL y agar de soya tripticaseína (TSA) (primera capa de doble agar). Este último se almacenó en caja Petri con 10 mL de agar en cada una.

5.1.4 Recuperación de fagos a partir de las muestras de aguas residuales

Las muestras de aguas residuales enriquecidas anteriormente se centrifugaron a 12,000 xg por 15 min y el sobrenadante (lisado) se recuperó cuidadosamente y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm de diámetro.

Se realizó prueba de goteo (spot) en donde se vertió el agar suave en cajas petri y se dejó secar a temperatura ambiente. En tubos de ensayo se agregaron 3 mL de agar suave mezclado con 1 mL de la cepa de *E. cloacae* y se vertió sobre la caja petri con agar y se dejó secar. La caja Petri se dividió en 4 y se rotuló dependiendo del número de muestra, a cada caja Petri previamente rotulada se le agregaron 500 µL de la muestra filtrada. Se dejó en incubación por 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo se observaron las placas para observar cuales mostraron zonas de lisis.

Con las muestras que mostraron zona de lisis, se procedió a tomar el filtrado y llevar a cabo la técnica de doble agar contra *E. cloacae*. Se utilizaron 100 µL del lisado de las muestras, y se inocularon en cajas Petri con TSA y se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C (Sambrook, MacCallum, & Russell, 2000).

Las placas producidas por los fagos se seleccionaron con base en su tamaño y claridad de la placa, estas se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 900 µL de Buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4.

5.1.5 Purificación de fagos

De la muestra directa de los fagos recuperados en la fase anterior, se hicieron diluciones en tubos Eppendorf de 1.5 mL, con 900 µL de PBS y 100 µL de la muestra directa, las diluciones fueron las siguientes 10^{-2} 10^{-7} . Las diluciones se ensayaron por la técnica de doble agar utilizando a *E. cloacae* ATCC13047 como hospedera y las placas obtenidas se recuperaron nuevamente. Este paso se repitió 3 veces para asegurar la purificación de un solo fago en cada muestra.

5.1.6 Propagación de los fagos

De la última purificación de los fagos, se sembraron 4 placas con TSA, 1 mL de la cepa de *E. cloacae*, y 100 µL de fagos (esto fue para cada fago obtenido) y se dejaron incubar por 24 horas a 37 °C. A las placas se le agregaron 4 mL de buffer de fosfatos y se dejaron reposar por 2 h con agitación

manual cada 15 minutos. El sobrenadante y la capa suave de las cuatro cajas Petri se recuperó en un tubo corning y éstos se centrifugaron a 12,000 xg por 15 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm. Cada fago propagado se ensayó por la técnica del doble agar para determinar su concentración final (Carlson 2004).

5.2 Evaluación de termoestabilidad

La prueba de estabilidad térmica del fago aislado, se realizó de acuerdo con la metodología utilizada por UI Haq *et al.* (2012). 500 µL del fago propagado fueron dispensados en tubos Eppendorf de 1 mL, los cuales fueron sometidos a temperaturas de 30, 37, 40, 50, 60 y 70 °C en termoblock, por 1 hora. Concluido el tiempo se determinó el título final de los fagos mediante la técnica de la doble capa de agar. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

5.3 Evaluación de la susceptibilidad del fago a diferentes pH

La evaluación de la sensibilidad de los fagos a diferentes pH fue realizada de acuerdo con la metodología utilizada por UI Haq *et al.* (2012). Cien microlitros de fago se dispensaron en tubos Eppendorf, los cuales contenían 900 µL de PBS con pH previamente ajustado en intervalos de 1 unidad de pH, desde 1 hasta 14, utilizando HCl 1N o NaOH 1N y se mantuvieron expuestos a 25 °C durante una hora. Concluido el tiempo, se determinó el título final de los fagos mediante la técnica de la doble capa de agar. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

5.4 Prueba de infección a *Akkermansia muciniphila*

Se realizó la prueba de goteo donde se utilizó 1 mL de la cepa de *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA-835) y *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), 3 mL de agar suave con 10 µL del fago purificado. Se dejó incubar de manera anaerobia a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación

se determinó la capacidad lítica del fago contra las bacterias evaluadas mediante la formación de placas de lisis.

5.5 Caracterización genética

El ADN genómico del fago se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook & Russell, 2006). Se transfirió 1 mL de suspensión de fago a un microtubo de 1.5 mL y se trató con 10 µL de DNasa I / RNasa A (10 mg/mL) a 37 °C durante 30 min, seguido de tratamiento con 50 µL de SDS (10%), 40 µL de EDTA (0.5 M) y 2.5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubación a 56 °C durante 2 h. Se añadió un volumen igual de fenol, se mezcló y se centrifugó a 3500 *xg* durante 10 min. La capa acuosa se transfirió y se mezcló con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugó dos veces a 3500 *xg* durante 10 min. La capa acuosa se recolectó nuevamente y se mezcló con un volumen igual de isopropanol grado biología molecular y se almacenó a -20 °C durante la noche. La mezcla se centrifugó a 15,000 *xg* durante 30 min y el botón de ADN se lavó tres veces con etanol al 75%. Finalmente, el botón de ADN se secó a temperatura ambiente (alrededor de 5 min), se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El ADN se preparó para la secuenciación utilizando el kit de preparación de bibliotecas Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas se cuantificaron utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y la secuenciación del genoma se realizó con la plataforma Illumina MiniSeq (protocolo de 2 × 150 pb extremos pareados, 300 ciclos). Las lecturas sin procesar se limpiaron con fastp v0.22.0 (Chen *et al.*, 2018) y se ensamblaron de novo utilizando SPAdes v3.15.3 (Bankevich *et al.*, 2012), lo que resultó en un solo contig con una cobertura de 20X.

Los marcos de lectura abiertos (ORF) se identificaron empleando el programa PHANOTATE v1.5.0 (McNair *et al.*, 2019) y curados manualmente usando Geneious v9.1.8. Las funciones de ORF se anotaron utilizando

Geneious v9.1.8 y la herramienta de búsqueda de alineación local básica de proteínas BLASTP del servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a través de una búsqueda de las secuencias en la base de datos de proteínas no redundantes, donde se estableció el criterio de >50 de “score” y el valor $e < 1.0 \times 10^{-3}$ para su anotación. La presencia de tRNA se determinó utilizando tRNAscan-SE (Lowe and Chan, 2016) y ARAGORN (Laslett and Canback, 2004). Los genes asociados con virulencia se examinaron con las bases de datos Victors (Sayers *et al.*, 2019) y VFDB (Chen *et al.*, 2005), y los genes asociados con resistencia a los antibióticos se examinaron con CARD (McArthur *et al.*, 2013) y NDARO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>). Para clasificar el estilo de vida de los fagos se utilizó la plataforma de software impulsada por IA PhageAI v0.10.0 (Tynecki *et al.*, 2020).

5.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de estabilidad a temperatura y pH fueron analizados por ANOVA de una vía para cada fago, con una significancia de $p < 0.05$, utilizando el programa RStudio v2021.09.0, seguido de una prueba de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre los niveles.

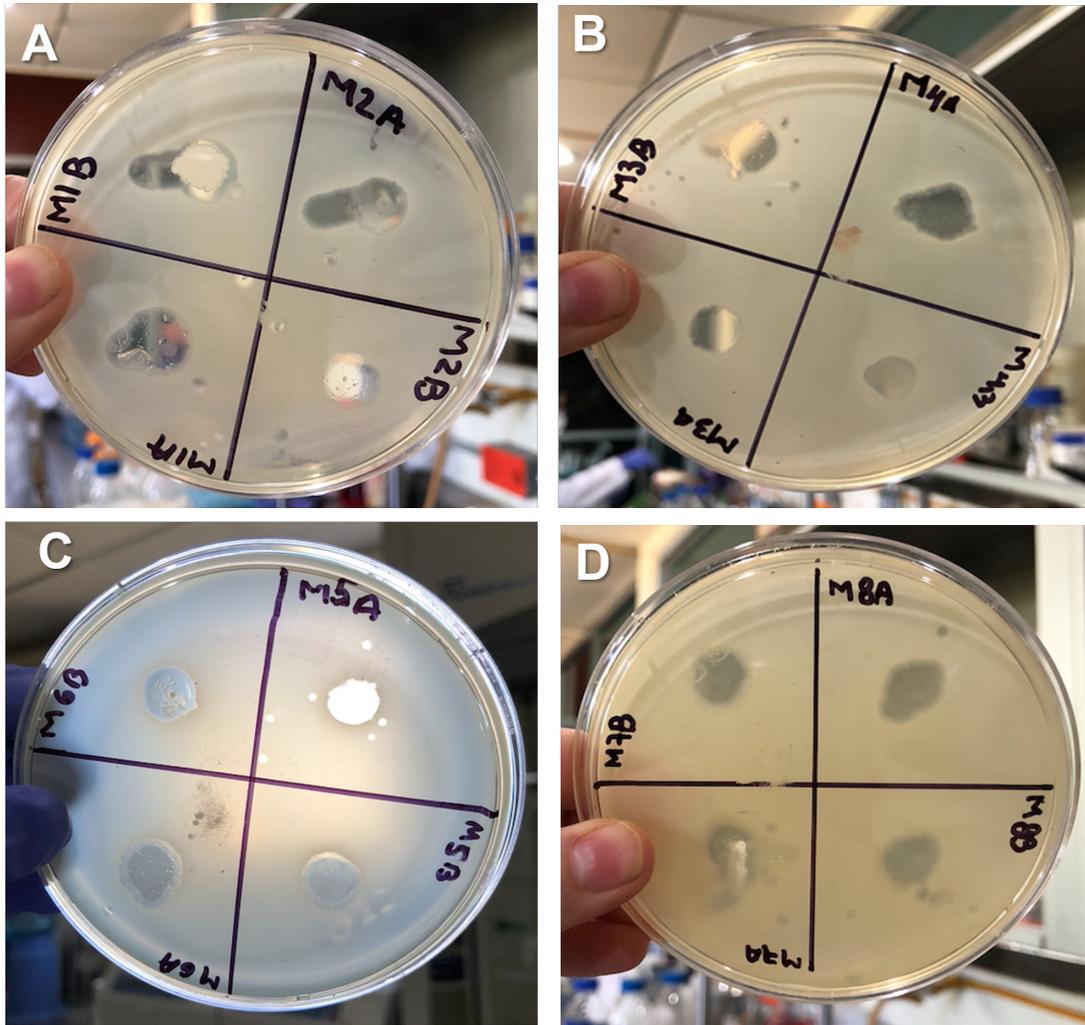
6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de los bacteriófagos

Las ocho muestras de agua residual analizadas mostraron presencia de fagos (zona de lisis) en la prueba de spot realizada (**Figura 5**).

Caracterizamos la turbidez y el diámetro de las placas formadas por los fagos de las muestras positivas (**Tabla 2**). De los ocho fagos, la mayoría formaron placas claras, típicas de los fagos líticos, mientras que uno de los fagos (PHEc14) formó placas turbias, que pueden indicar su capacidad para lisogenizar las células huésped (fagos templados). Para algunos fagos, observamos halos, es decir, zonas semitransparentes alrededor de las placas, lo que indica que es lítico de acuerdo con diversos autores (Wong *et al.*, 2014).

Figura 5. Prueba SPOT de las muestras de aguas residuales.
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.



A) La caja Petri muestra placas de zona de lisis de la muestra 1 y 2; B) La caja Petri muestra placas de zona de lisis de la muestra 3 y 4; C) La caja Petri muestra placas de zona de lisis de la muestra 5 y 6; D) La caja Petri muestra placas de zona de lisis de la muestra 7 y 8.

Tabla 2. Características principales de los fagos líticos contra *E. cloacae* aislados en la prueba de SPOT de las muestras de aguas residuales.

BACTERIÓFAGOS

| CODIGO | PHEcl1 | PHEcl2 | PHEcl3A | PHEcl3B | PHEcl4 | PHEcl5 | PHEcl6 | PHEcl7 | PHEcl8 |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| TAMAÑO | 2mm | 1mm | 2mm | 2mm | 3 mm | 2 mm | 4mm | 5mm | 1mm |
| CARACTERÍSTICAS | Centro claro/ con halo turbio | Centro claro/halo turbio | Centro claro/halo turbio | Centro claro/halo turbio | Centro semicristalino /halo turbio | Centro claro/ halo turbio | Centro claro/halo turbio | Centro claro/halo turbio | Centro claro |

Cuadro integrativo de las características (tamaño de placa, características de placa).

6.1.1 Purificación de fagos

En la **Tabla 3** se muestran los resultados del proceso de purificación de los fagos de acuerdo con las muestras tomadas, mostrando las zonas positivas y negativas de lisis (**Figura 6**).

Tabla 3. Proceso de purificación de los fagos.

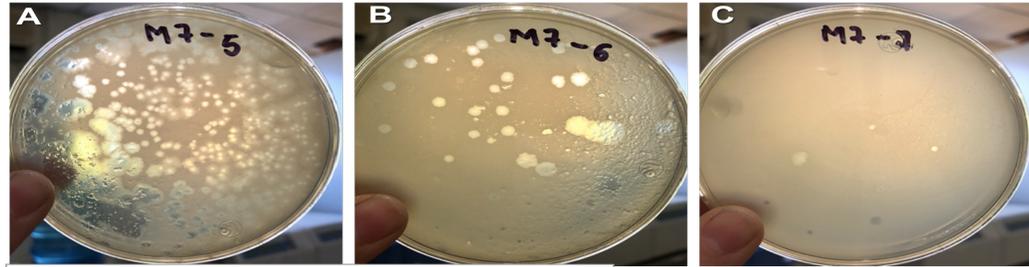
| Proceso de purificación de los fagos | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------|----|----|------------------------------|--------------|----|----|--------------------|--------------|----|----|----|----|----|----|
| MUESTRA | Primera Fase | | | OBTENCIÓN DEL FAGO | Segunda Fase | | | OBTENCIÓN DEL FAGO | Tercera Fase | | | | | | |
| | DILUCIÓN | | | | DILUCIÓN | | | | DILUCIÓN | | | | | | |
| | -4 | -5 | -6 | | -2 | -3 | -4 | | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | |
| M1 | + | + | - | -5 | + | + | + | -4 | | + | + | + | | | -4 |
| M2 | + | + | - | -5 | + | + | + | -3 | | | + | + | + | | -6 |
| M3 | + | + | - | -4,-5 POSIBLEMENTE DOS FAGOS | + | + | + | -4 | | | + | + | + | | -5 |
| | | | | | + | + | + | -4 | | + | + | + | | | -3 |
| M4 | D | - | - | D | + | + | + | -4 | | + | + | + | | | -5 |
| M5 | D | - | - | D | + | + | - | -3 | + | + | + | | | | -4 |
| M6 | + | + | + | -5 | + | + | + | -3 | | + | + | + | | | -3 |
| M7 | + | - | - | -4 | + | + | + | -4 | | | | + | + | + | -6 |
| M8 | ++ | + | - | -5 | + | + | + | -4 | | | | + | + | + | -6 |

+) Presencia de placas de lisis; -) No hubo placas de lisis; M) Muestra; -2, -3, -4, -5, -6, -7; Número de dilución de la que se tomó el aislado del fago para la siguiente dilución; D) Muestra directa de la que se tomó el aislado del fago para la siguiente dilución

Figura 6. Aislamiento, purificación y concentración de fagos.

Primera fase del proceso de purificación de fagos.

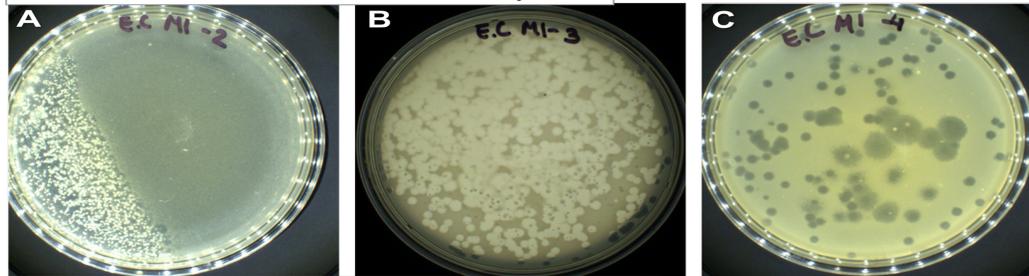
- Fagos de la muestra 1 con los resultados de las diluciones.



Los resultados de las diluciones A -4, B -5 y C -6.

Segunda fase del proceso de purificación de fagos.

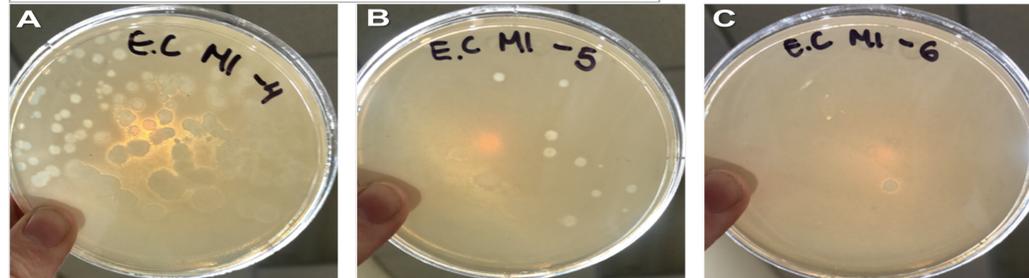
- Fagos de la muestra 1 con los resultados de las diluciones.



Con los resultados de las diluciones A -2, B -3 y C -4.

Tercera fase del proceso de purificación de fagos.

- Fagos de la muestra 7 con los resultados de las diluciones.



Con los resultados de las diluciones A -5, B -6 y C -7.

6.1.2 Propagación de los fagos

De la tercera etapa de purificación se eligieron las placas para realizar la propagación de los fagos.

Se obtuvo un total de 9 fagos aislados, un fago de cada muestra, solo de la muestra 3 se obtuvieron 2 fagos. Que fueron nombrados de acuerdo con la muestra de la que fueron obtenidos: PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7, PHEcl8.

6.1.3 Prueba de infección a *Akkermansia muciniphila*

En la prueba de goteo sobre la cepa *A. Muciniphila* (ATCC BAA-835) se observó que ninguno de los aislados de los fagos fue capaz de infectar a la cepa ATCC BAA-835.

6.1.4 Evaluación de termoestabilidad

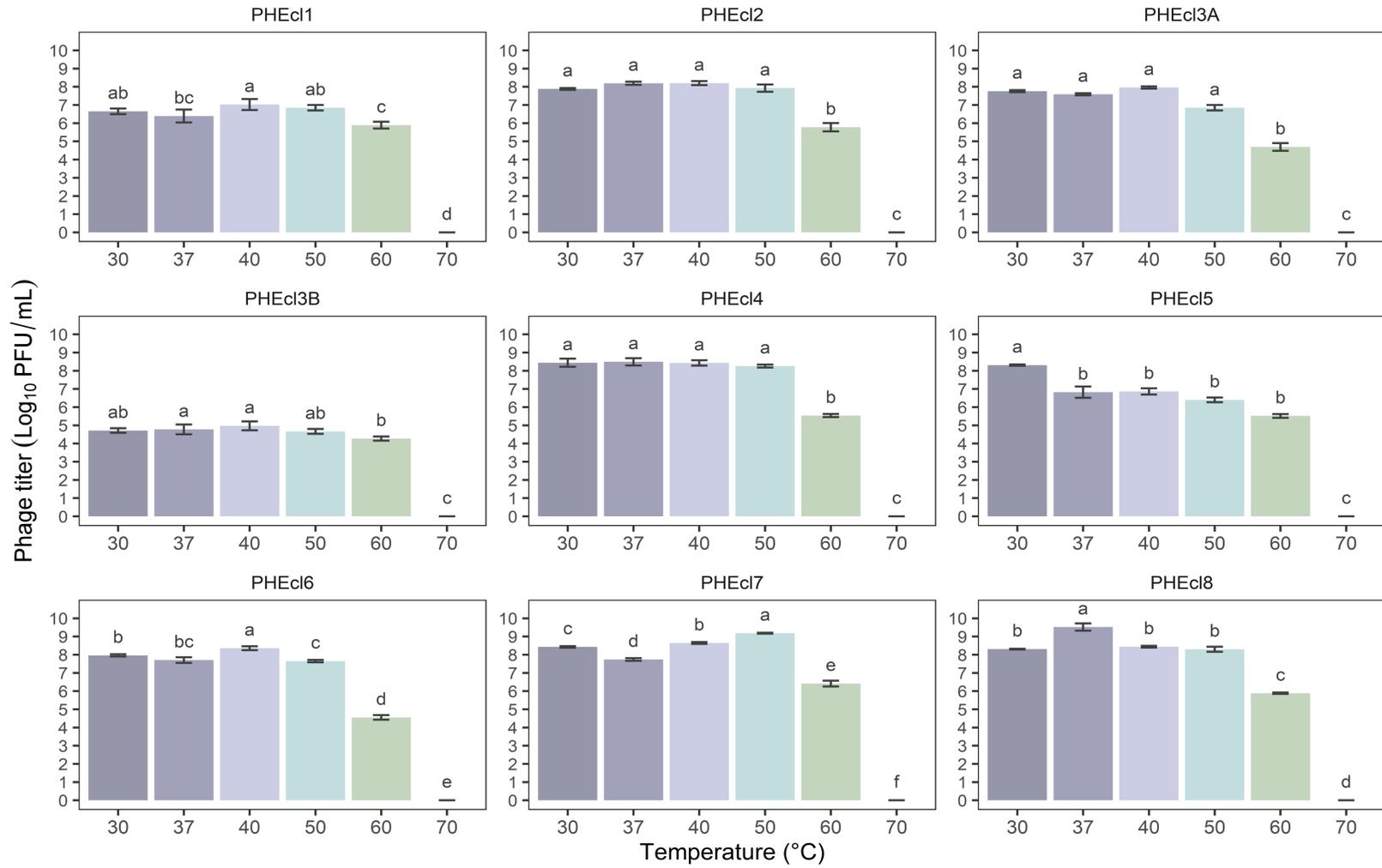
La Evaluación de termoestabilidad de los fagos PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7, PHEcl8 se realizó para conocer las temperaturas que afectan a las partículas virales, para determinar su idoneidad para su uso en terapia con fagos. Se evaluaron las temperaturas de 30 a 70 °C.

Según los análisis de anova encontramos que la temperatura afecta significativamente la concentración del fago ($p < 0.05$) en los niveles evaluados.

Los fagos PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B y PHEcl4 se mantuvieron estables de la temperatura de 30 °C a 50 °C y tuvieron una reducción significativa de 3 Log PFU/ml en la temperatura de 60 °C. Ninguno de los fagos mostro actividad lítica en la temperatura de 70 °C.

Los fagos PHEcl1, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7 y PHEcl8 mostraron actividad lítica de la temperatura de 30 °C a 50 °C con variaciones de 2 Log PFU/ml y en la temperatura de 60 °C mostraron una considerable reducción de hasta 6 Log PFU/ml. Ninguno de los fagos mostro actividad lítica a la temperatura de 60 °C. (**Figura 7**)

Figura 7. Comparación de las diferentes temperaturas sobre los fagos.



6.1.5 Evaluación de estabilidad de los fagos a diferentes pH

Al exponer la solución de fagos por 1 hora a diferentes pH se observó que esta condición de estrés afecta significativamente a la concentración de todos los fagos ($p < 0.05$).

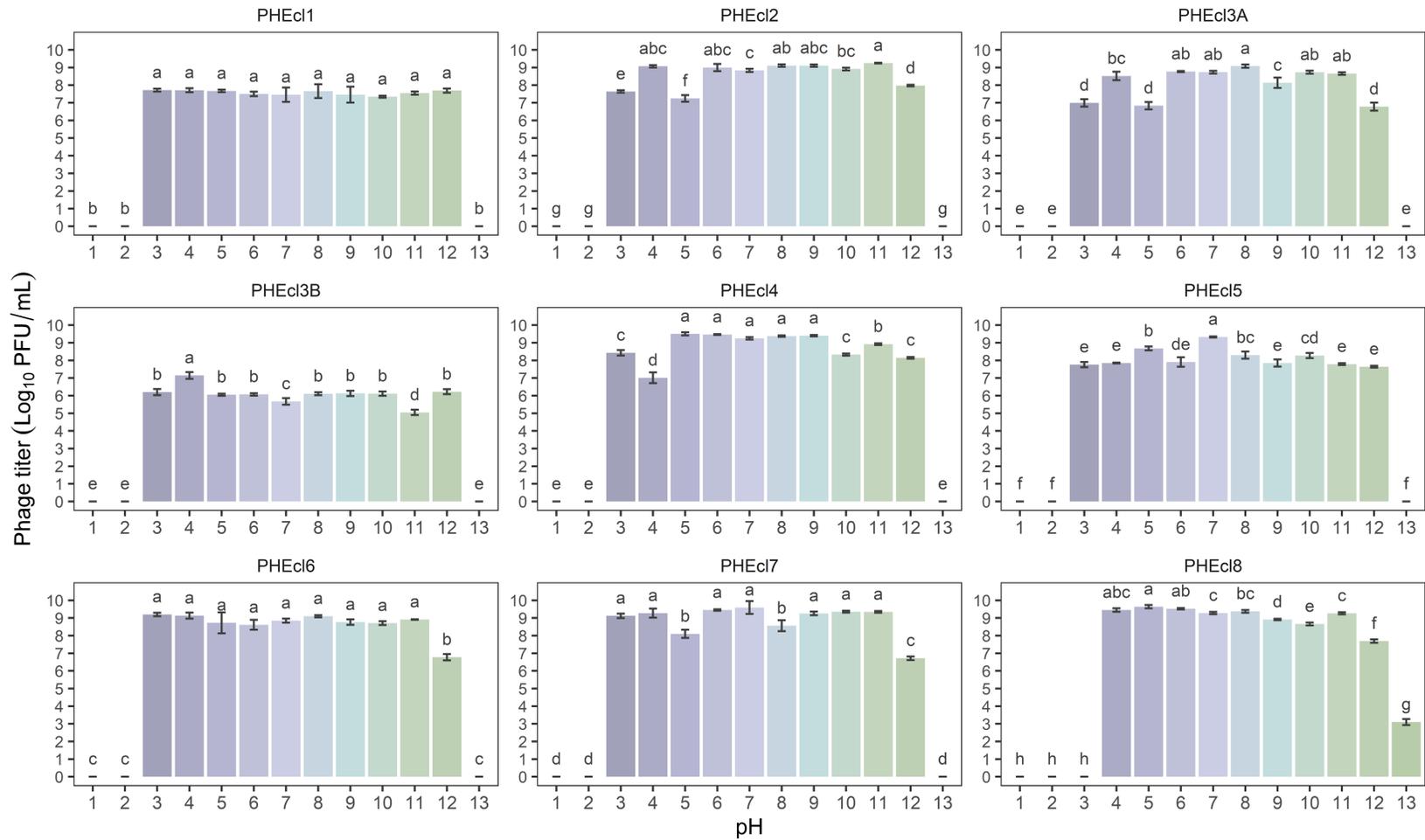
El fago PHEcl1 y el fago PHEcl6 mantuvieron su estabilidad del pH 3 al pH 11, sin mostrar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estos pH, tal como se muestra en la **Figura 8**. Solamente el fago PHEcl6 mostró diferencia significativa en el pH 12. Ninguno de los fagos mostró actividad lítica en los pH 1, 2 y 13.

Los fagos PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl7 mostraron actividad del pH 3 al pH 12, con una variación de hasta 2 Log PFU/ml. Ninguno de los fagos mostró actividad lítica en los pH 1, 2 y 13 (**Figura 8**).

El fago PHEcl8 mantuvo su estabilidad del pH 4 al pH 13, con una variación de 1.5 Log entre el pH 4 al pH 12. Y una mayor variabilidad con el pH 13 de 6 Log. El fago no mostró actividad lítica en los pH 1, 2 y 13 (**Figura 8**).

En general todos los fagos del 1 al 8 mostraron actividad del pH 3 al pH 12 (**Figura 8**).

Figura 8. Estabilidad de los fagos a distintos pH.



6.1.6 Caracterización genética del fago vB_EcIS_AS1 (PHEcI1)

El fago PHEcI1 se seleccionó para su secuenciación y fue renombrado de acuerdo con los lineamientos propuestos por Adriaenssens and Brister (2017). El fago se denominó vB_EcIS_AS1. El genoma de vB_EcIS_AS1 consta de ADN de doble cadena con una longitud de 49,578 pb y un contenido GC de 47.8%. De acuerdo con el porcentaje de identidad de nucleótidos (ANI), el fago vB_EcIS_AS1 se clasificó taxonómicamente dentro de la subfamilia *Tempevirinae*, perteneciente a la familia *Drexlerviridae* del orden *Caudovirales*. Los fagos de la familia *Drexlerviridae* están estrechamente relacionados con fagos similares a los fagos T1. Estos fagos son virulentos y suelen tener alta tasa de adsorción y capacidad lítica, lo que los hace candidatos en el desarrollo de la terapia de fagos. Tienen una cabeza icosaédrica de aproximadamente 60 nm y una cola delgada de aproximadamente 150 nm (Adriaenssens *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2014; German *et al.*, 2016).

El genoma de vB_EcIS_AS1 cuenta con 95 ORF (**Figura 9**), asociados con diversas funciones, pero ninguno relacionado con factores de virulencia, resistencia a antibióticos ni al ciclo lisogénico. No se identificaron secuencias de tRNA y su ciclo de vida fue predicho como virulento por la plataforma PhageAI. El orden de las transcripciones, así como el orden y tamaño de los ORF dentro de las transcripciones fue similar a otros fagos similares a T1 (**Tabla 4**). Además, el genoma de este fago tiene una identidad del 91.12% mediante BLASTN con el genoma del “*Enterobacter* phage N5822” (MW032452.1), el cual fue aislado y reportado en la India en el año 2021 (Nair, Vyawahare, & Khairnar, 2021).

Tabla 4. Características y funciones generales de los ORF del fago vB_EcIS_AS1.

| MINIMO | MAXIMO | LONGITUD | DIRECCION | PRODUCTO |
|---------------|---------------|-----------------|------------------|---|
| 2 | 610 | 609 | 5' - 3' | Recombinasa asociada a fagos |
| 653 | 1,075 | 423 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 1,106 | 3,181 | 2,076 | 3' - 5' | Fibra de cola de fago, proteína de fibra de cola lateral Stf |
| 3,286 | 4,242 | 957 | 3' - 5' | Fago ADN primasa/helicasa |
| 4,301 | 4,741 | 441 | 3' - 5' | Proteína de fago |
| 4,831 | 6,831 | 2,001 | 5' - 3' | Fago ADN helicasa |
| 6,834 | 7,250 | 417 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 7,323 | 7,601 | 279 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 7,603 | 8,349 | 747 | 5' - 3' | ADN adenina metiltransferasa, asociada a fagos |
| 8,349 | 8,459 | 111 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 8,459 | 8,707 | 249 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 8,784 | 8,993 | 210 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 8,983 | 9,231 | 249 | 5' - 3' | JK_65P |
| 9,326 | 10,444 | 1,119 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 10,444 | 10,614 | 171 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 10,742 | 10,957 | 216 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 10,960 | 11,454 | 495 | 5' - 3' | Lisina de fagos (EC 3.2.1.17) # Lisozima o muramidasa de fagos (EC 3.2.1.17) |
| 11,451 | 11,846 | 396 | 5' - 3' | Lipoproteína de fagos |
| 11,858 | 12,013 | 156 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 11,979 | 12,371 | 393 | 3' - 5' | Proteína de fago |
| 12,375 | 13,952 | 1,578 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 14,021 | 14,266 | 246 | 3' - 5' | Proteína de fago |
| 14,263 | 14,649 | 387 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 14,719 | 15,495 | 777 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 15,502 | 15,597 | 96 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 15,725 | 15,952 | 228 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 16,027 | 16,128 | 102 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 16,106 | 16,387 | 282 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 16,387 | 16,581 | 195 | 3' - 5' | Proteína de fago |
| 16,601 | 16,864 | 264 | 3' - 5' | Proteína hipotética |

| | | | | |
|---------------|--------|-----|---------|------------------------|
| 17,056 | 17,346 | 291 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 17,452 | 17,544 | 93 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 17,587 | 18,012 | 426 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 18,015 | 18,275 | 261 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 18,360 | 18,608 | 249 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 18,580 | 18,789 | 210 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 18,786 | 18,977 | 192 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 18,964 | 19,314 | 351 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 19,456 | 19,635 | 180 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 19,707 | 19,874 | 168 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 19,878 | 20,120 | 243 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 20,120 | 20,656 | 537 | 5' - 3' | Polinucleótido quinasa |
| 20,649 | 20,861 | 213 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 20,858 | 21,073 | 216 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 21,146 | 21,379 | 234 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 21,376 | 21,603 | 228 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 21,600 | 21,791 | 192 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 21,796 | 22,026 | 231 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 22,106 | 22,261 | 156 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 22,261 | 22,449 | 189 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 22,442 | 23,014 | 573 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 23,007 | 23,129 | 123 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 23,111 | 23,308 | 198 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 23,382 | 23,600 | 219 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 23,685 | 23,963 | 279 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 23,954 | 24,148 | 195 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 24,145 | 24,600 | 456 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 24,678 | 24,896 | 219 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 24,893 | 25,153 | 261 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 25,150 | 25,470 | 321 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 25,537 | 25,665 | 129 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 25,667 | 25,897 | 231 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 26,040 | 26,207 | 168 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 26,191 | 26,376 | 186 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 26,373 | 26,606 | 234 | 5' - 3' | Proteína hipotética |

| | | | | |
|---------------|--------|-------|---------|--|
| 26,676 | 27,206 | 531 | 5' - 3' | Terminasa del fago, subunidad pequeña |
| 27,209 | 28,780 | 1,572 | 5' - 3' | Terminasa del fago, subunidad grande |
| 28,837 | 30,126 | 1,290 | 5' - 3' | Proteína portal de fagos (conector) |
| 30,130 | 30,879 | 750 | 5' - 3' | Proteína de la cápside menor del fago (ACLAME 67) |
| 30,855 | 32,006 | 1,152 | 5' - 3' | Cápside y andamio de fagos |
| 32,019 | 32,504 | 486 | 5' - 3' | Proteína de fago (ACLAME 1504) |
| 32,547 | 33,266 | 720 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 33,348 | 34,310 | 963 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 34,363 | 34,635 | 273 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 34,679 | 35,077 | 399 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 35,077 | 35,448 | 372 | 5' - 3' | Proteína de fago (ACLAME 302) |
| 35,441 | 35,881 | 441 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 35,871 | 36,272 | 402 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 36,274 | 36,933 | 660 | 5' - 3' | Fibra de cola de fago |
| 37,009 | 37,323 | 315 | 5' - 3' | Proteína de fago (ACLAME 155) |
| 37,443 | 37,637 | 195 | 5' - 3' | Proteína de fago |
| 37,680 | 40,709 | 3,030 | 5' - 3' | proteína de cinta métrica |
| 40,727 | 41,065 | 339 | 5' - 3' | Proteína de cola menor de fagos |
| 41,135 | 41,887 | 753 | 5' - 3' | Punta de la cola del fago, proteína de ensamblaje L |
| 41,884 | 42,600 | 717 | 5' - 3' | Punta de la cola del fago, proteína de ensamblaje K |
| 42,600 | 43,199 | 600 | 5' - 3' | Punta de la cola del fago, proteína de ensamblaje I |
| 43,180 | 43,269 | 90 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 43,287 | 47,099 | 3,813 | 5' - 3' | Punta de la cola del fago, proteína J de especificidad del huésped |
| 47,096 | 47,302 | 207 | 5' - 3' | Proteína hipotética |
| 47,333 | 47,569 | 237 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 47,620 | 47,763 | 144 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 47,768 | 47,947 | 180 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 47,968 | 48,057 | 90 | 3' - 5' | Proteína hipotética |
| 48,072 | 49,130 | 1,059 | 5' - 3' | Exonucleasa de fagos. |
| 49,172 | 49,501 | 330 | 5' - 3' | Proteína hipotética |

Mínimo: Posición en el genoma donde comienza el gen

Máximo: Posición donde termina el gen

Longitud: Número de bases que mide el gen

Dirección: posición en que se encuentra el gen ya sea de 5 prima a 3 prima, o de 3 prima a 5 prima.

Producto: función que tiene esa región. Producto del gen y función.

7. DISCUSIÓN

E. cloacae es una bacteria que ha sido asociada positivamente con el trastorno de obesidad. Además, es reconocida como causante de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en personas inmunocomprometidas (Schlossberg, 2015).

E. cloacae forma parte de la microbiota intestinal humana. Su incremento poblacional se ha relacionado con la obesidad (Fei & Zhao, 2013). *E. cloacae* puede contribuir a la obesidad, posiblemente a través de una endotoxina o un mecanismo mediado por la inflamación inducida por flagelos (Keskitalo *et al.*, 2018).

El uso de fagos para la modulación de las poblaciones bacterianas presentes en la microbiota intestinal es una nueva estrategia que permite controlar diferentes patologías relacionadas con el desequilibrio de la microbiota intestinal incluyendo la obesidad.

Actualmente, la terapia con fagos está ganando atención en la modulación de la MI, ya que recientemente se ha visto como la disbiosis intestinal se relaciona con la obesidad. La terapia con fagos podría considerarse una de las opciones de tratamiento alternativas para la disbiosis intestinal. Este estudio es uno de esos esfuerzos para caracterizar los bacteriófagos que infectan a la bacteria de *E. cloacae*.

En este trabajo, se describió el aislamiento de nueve fagos que infectan a *E. cloacae*, y caracterizamos las propiedades biológicas de los nueve fagos y la secuencia genómica de un fago. Actualmente se han registrado muy pocos fagos para *E. cloacae*, y los fagos que se encontraron para *E. cloacae*, se enfocan en enfermedades infecciosas, y resistencia a antibióticos, a diferencia de este estudio, donde se busca su aplicación en la terapia de fagos para modular la MI y disminuir la disbiosis que provoca *E. cloacae*, siendo esto un área de oportunidad muy interesante, ya que es reciente la información que se tiene. Hasta hace pocos años se relacionó a la microbiota intestinal con la obesidad, y aún más recientemente, se están buscando nuevas estrategias

para el tratamiento de la obesidad por medio de la manipulación de la MI. Es por eso que el presente estudio abre la oportunidad para el desarrollo de más investigaciones.

Con relación a la estabilidad térmica de los nueve fagos aislados, se pudo determinar su idoneidad para su uso como terapia con fagos a través de la vía oral, ya que su estabilidad prolongada es muy importante con fines de terapia en humanos. Los fagos PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7, PHEcl8, mantuvieron su viabilidad de los 30 °C a 50 °C por 60 minutos con variaciones de concentración de hasta 2 Log UFP/mL, disminuyendo considerablemente esta concentración cuando la temperatura aumentaba a 60°C e inactivándose a los 70 °C. En un estudio desarrollado por Khawaja *et al.* (2016), la estabilidad de los fagos TSE1, TSE2 y TSE3 fue más alta en el tratamiento de 37 °C, igual que el fago PHEcl8 del presente estudio, mientras que se observaron menos placas a temperaturas de 60 °C, igual a los 9 fagos aislados en la presente investigación. Todos los fagos fueron estables hasta la temperatura de 60 °C, pero a partir de la temperatura de 50 °C se notó una disminución de viabilidad del fago PHEcl6. Caso similar a lo reportado en el estudio de Manohar *et al.* (2019), donde mencionan que la estabilidad para el virus *Enterobacter myPSH1140* mantenía su actividad hasta 55 °C y se observó una reducción en la actividad a temperaturas más altas. Caso contrario al fago PHEcl7 de esta investigación, que fue más estable a la temperatura de 50 °C y 40 °C. Posiblemente las limitaciones respecto a las temperaturas ambientales extremas se deban al origen natural de sus bacterias huésped, ya que *E. cloacae* se ha reportado en ambiente de aguas residuales, y la microbiota intestinal (Keskitalo *et al.*, 2018) donde las temperaturas se mantienen constantes.

El fago MSK de la familia *Drexlerviridae* previamente reportado (Khan *et al.*, 2021) demostró ser estable incluso a la temperatura de 100 °C, observándose que fue a partir de su exposición a temperatura superior a los 120 °C cuando el fago MSK dejó de formar placas. Para el caso de los fagos

de nuestro estudio, se pudo observar que a diferencia del fago MSK, el fago PHEcl1, de la familia *Drexlerviridae*, comenzó a reducir su concentración más notablemente a la temperatura de 60 °C.

La mejor temperatura evaluada para la estabilidad de los fagos PHEcl1, PHEcl2 PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5 y PHEcl8, se determinó de los 30 °C a 50 °C, igual a lo que se informa para otros fagos contra *E. cloacae* (Ul Haq *et al.*, 2012); esto se podría deber al origen natural de sus bacterias huésped, ya que para *E. cloacae*, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30 y 37 °C.

El tracto digestivo actúa a una temperatura aproximada de 30 a 37 °C, los fagos de nuestro estudio mostraron tener estabilidad a las diferentes temperaturas que se encuentran en el tracto digestivo, por lo que cumplen con los requerimientos de resistencia a estreses ambientales para su uso en terapia de fagos.

La supervivencia de los fagos en el ambiente adverso también es una característica deseada para su uso en la terapia con fagos. En las incubaciones a pH 5, 6 y 7, los fagos PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7 y PHEcl8 mantuvieron su estabilidad cercana al título inicial. El fago PHEcl5 fue el que tuvo mayor estabilidad al pH de 7, igual a lo reportado por Khawaja *et al.* (2016), donde los fagos TSE1, TSE2 y TSE3 su título máximo fue en el pH 7, pero diferente con los otros pH, donde no se observaron placas en los fagos TSE1, TSE2 y TSE3 en el pH 5, 9 y 10. Los fagos de esta investigación no mostraron placas cuando se expusieron a pH de 1, 2, 12 y 13, a excepción del fago PHEcl8, que no mostró placas en el pH 3, pero sí en el pH 13. Similar a lo reportado en el estudio de Manohar *et al.* (2019), donde el virus *Enterobacter myPSH1140* formó placas a partir del pH 4 y hasta al pH 11.

El fago PHEcl1, al igual que el fago MSK (Khan *et al.*, 2021), son de la familia *Drexlerviridae*. Ambos fagos mostraron tener estabilidad a los pH de 4

al 12. El fago PHEcl1 mostró placas en el pH 3, a diferencia del fago MSK, que mostró placas hasta el pH 4.

La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de aplicaciones futuras para terapia con fagos. En ese sentido, la exposición de los fagos de este estudio en el ambiente ácido, simulando una condición gastrointestinal, puede indicar su aptitud para su uso en fagoterapia, o su inaptitud, si su estabilidad se reduce significativamente. En un ser humano en ayunas, el pH gástrico medio es 1.7, en comparación con un pH superior a 6 en ciertas regiones del tracto digestivo. Para superar esta preocupación, con respecto a la disminución de la estabilidad de la acidez, la recomendación hasta este momento de acuerdo con los resultados, sería hacer acompañar a la terapia de fagos orales con el consumo simultáneo de un fármaco antiácido; o bien, que el fago se encapsule en matrices protectoras para conservar su vía de administración oral y que se garantice su llegada al tracto intestinal, donde se desea que ejerza su capacidad lítica (Divya Ganeshan & Hosseinidoust, 2019).

Los informes reportados de fagos de *Enterobacter* capaces de infectar varias cepas o especies son escasos (Li *et al.*, 2016; Pereira., *et a*, 2016).

Con respecto a la actividad lítica de los fagos aislados en el presente trabajo podemos decir que todos (9 fagos) mostraron actividad litica contra *Enterobacter* sin afectar a la bacteria de *A. muciniphila*. A este respecto se puede mencionar que no se encontraron otros estudios donde se hiciera esta prueba con *A. muciniphila*, ya que normalmente suele realizarse la prueba de rango de hospedero con bacterias de la misma especie. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, en nuestro estudio nos interesaba que nuestros fagos aislados no demostraran actividad lítica contra la cepa de *A. muciniphila* y que su capacidad lítica fuera específicamente para la bacteria *E. cloacae*, con el propósito de eliminar bacterias asociadas a la obesidad y hacer que prevalecieran bacterias protectoras del desarrollo de obesidad, como es el caso de *A. muciniphila*. En ese sentido, se espera que los 9 fagos aislados y caracterizados en el presente estudio sean aptos para la terapia de fagos y

ofrezcan un medio novedoso y selectivo de modificar la microbiota intestinal sin causar perturbaciones globales que pueden conducir a la disbiosis intestinal.

El fago PHEcl1 perteneciente a la familia *Drexlerviridae* formo placas con un diámetro de 2 mm, esto difiere con lo reportado con el fago SU57 (Koonjan *et al.*, 2020) y fago MSK (Khan *et al.*, 2021), que pertenecen a la misma familia, los cuales formaron placas circulares transparentes, con halos de aproximadamente 4 mm de diámetro. El fago PHEcl6 fue el que tuvo un diámetro similar al fago SU57 (Koonjan *et al.*, 2020) y al fago MSK (Khan *et al.*, 2021), que formaron placas de 4 mm de diámetro.

Los fagos PHEcl2 y PHEcl8 mostraron placas con un diametro de 1 mm, similar a lo reportado en el estudios previos, donde los fagos estudiados tenían un diámetro de 0.5 a 1mm de diámetro (Khawaja *et al.*, 2016; Morozova *et al.*, 2021).

Las observaciones del fenómeno antes descrito son esperadas, pues se sabe que el tamaño de placas formadas por cada fago puede variar en función de la cepa hospedera, e incluso, en función de la fisiología de la bacteria cuando es llevado a cabo el ensayo de doble capa de agar.

El análisis genómico del fago vB_EclS_AS1 mostraron que está estrechamente relacionado con los fagos tipo T1 de la familia *Drexlerviridae*, caso similar a lo reportado para el fago SU57 (Koonjan *et al.*, 2020) y al fago MSK (Khan *et al.*, 2021). Además, hay un fago previamente reportado, con una identidad de nucleótidos mayor al 90%, denominado *Enterobacter* phage N5822. El fago N5822 mostró actividad lítica contra cuatro cepas de *E. cloacae*, pero no fue capaz de infectar *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella typhimurim*, *Staphylococcus aureus* o *Klebsiella pneumoniae*, lo que demuestra su especificidad a nivel de género. El fago N5822 también mostró su capacidad para inhibir la formación de biopelículas de *Enterobacter* hasta en un 90%, además de mostrar un periodo de latencia de 13 minutos y un tamaño de explosión 422 partículas virales por

célula infectada. El fago vB_EcIS_AS1 reportado en este estudio, al tener una gran homología con el fago N5822, puede mostrar características biológicas muy similares a las reportadas; sin embargo, es necesarios demostrarlas en futuras investigaciones para poder avanzar hacia las pruebas *in vivo*. Cabe resaltar que no se encontraron genes relacionados con capacidad de virulencia, resistencia a antibióticos o lisogenia en el genoma del fago vB_EcIS_AS1, además de que su ciclo de vida fue predicho como lítico a partir de su contenido genético, por lo que es un candidato a ser usado en terapia contra *E. cloacae*, una vez que se complete su caracterización biológica y las pruebas *in vivo*.

8. CONCLUSIONES

A partir de las muestras de aguas residuales analizadas se logró aislar a los fagos PHEcl1, PHEcl2, PHEcl3A, PHEcl3B, PHEcl4, PHEcl5, PHEcl6, PHEcl7, PHEcl8 que lisaron de manera específica a la cepa de *E. cloacae* ATCC 13047, pero no tuvieron actividad lítica contra *A. muciniphila*, característica principal deseada en el planteamiento de esta investigación. Los nueve fagos aislados fueron estables a valores de pH de 3 a 9 y a temperaturas de 30 a 50 °C, perdiendo su viabilidad a temperaturas más altas.

El fago vB_EclS_AS1, de acuerdo con sus propiedades genéticas, se clasificó taxonómicamente dentro de la subfamilia *Tempevirinae*, perteneciente a la familia *Drexelviriidae*, del orden *Caudovirales*. Los fagos de la familia *Drexelviriidae* son similares a los fagos T1, se caracterizan por ser virulentos y estos suelen tener alta tasa de absorción e infección.

No se identificaron secuencias de tRNA en el fago vB_EclS_AS1 y su ciclo de vida fue predicho como virulento, no se relacionó con resistencia a antibióticos ni al ciclo lisogénico, por lo que, con los resultados mostrados hasta este momento, se puede considerar como un buen candidato para ser usado en terapia de fagos ya que, teóricamente, conducen a una eliminación rápida de una bacteria infectante.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar trabajando en el análisis de los datos de bioinformática y propiedades biológicas de los fagos para precisar con mayor evidencia la capacidad, efectividad y especificidad lítica para considerar la terapia de fagos en estudios *in vivo* y confirmar su uso como modulador terapéutico de la microbiota intestinal en personas con obesidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85. doi:10.4161/bact.1.2.15845
- Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol*, 154(4), 245-251. doi:10.1016/s0923-2508(03)00067-6
- Adriaenssens, E. M., Sullivan, M. B., Knezevic, P., van Zyl, L. J., Sarkar, B. L., Dutilh, B. E., . . . Krupovic, M. (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Archives of virology*, 165(5), 1253-1260. doi:10.1007/s00705-020-04577-8
- Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146(6), 1564-1572. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.058
- Álvarez-Mercado, A. I., Navarro-Oliveros, M., Robles-Sánchez, C., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M. J., Muñoz-Quezada, S., . . . Abadía-Molina, F. (2019). Microbial population changes and their relationship with human health and disease. *Microorganisms*, 7(3), 68.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., . . . Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19(5), 455-477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
- Barr, J. J. (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunol Rev*, 279(1), 106-122. doi:10.1111/imr.12565
- Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, 108(1), 13-16. doi:10.1016/s0092-8674(01)00637-7
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8, 34.
- Calendar, R. (2006). *The bacteriophages*. New York: Oxford University Press.
- Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: the case of Akkermansia muciniphila. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1765.
- Carlson, K. (2005). *Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches* (Vol. 1): CRC press Boca Raton, FL.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. doi:10.1093/bioinformatics/bty560
- Chow, J. J., Batt, C. A., Sinskey, A. J. J. A., & Microbiology, E. (1988). Characterization of Lactobacillus bulgaricus bacteriophage ch2. *54(5)*, 1138-1142.
- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, 74(2), 277-283. doi:10.1007/s00284-016-1166-x

- Clokie, M. K., Andrew. (2009). Bacteriophages: Methods and Protocols. In (Vol. Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, pp. 164-166).
- Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *10*(suppl_1), S17-S30. doi:10.1093/advances/nmy078
- d'Herelle, F. J. C. A. S. (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *165*, 373-375.
- Daly, C., Fitzgerald, G. F., & Davis, R. (1996). Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*(2), 99-110. doi:10.1007/BF00395928
- Davis, C. D. (2016). The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutr Today*, *51*(4), 167-174. doi:10.1097/nt.0000000000000167
- De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Storia, A., Laghi, L., . . . Ercolini, D. (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, *65*(11), 1812-1821. doi:10.1136/gutjnl-2015-309957
- De Leeuw, M., Baron, M., Brenner, A., & Kushmaro, A. (2017). Genome Analysis of a Novel Broad Host Range Proteobacteria Phage Isolated from a Bioreactor Treating Industrial Wastewater. *8*(1), 40.
- Divya Ganeshan, S., & Hosseinidoust, Z. (2019). Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *8*(3), 131. doi:10.3390/antibiotics8030131
- Drexler, H. (1988). Bacteriophage T1. In R. Calendar (Ed.), *The Bacteriophages* (pp. 235-258). Boston, MA: Springer US.
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S., Lavigne, R. J. C. P., & Science, P. (2012). Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *13*(8), 699-722.
- Dunn, J. J., Studier, F. W., & Gottesman, M. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 477-535. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80282-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80282-4)
- Elbreki, M., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*, *2014*. doi:10.1155/2014/382539
- ENSANUT. (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición . Cifras de Sobrepeso y Obesidad en México- ENSANUT MC 2018.
- Estrada-Velasco, B. I., Cruz, M., García-Mena, J., Valladares Salgado, A., Peralta Romero, J., Guna Serrano, M. d. I. R., . . . Burguete-García, A. I. (2015). La obesidad infantil como consecuencia de la interacción entre firmicutes y el consumo de alimentos con alto contenido energético. *Nutrición Hospitalaria*, *31*, 1074-1081.

- Fei, N., & Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *Isme j*, 7(4), 880-884. doi:10.1038/ismej.2012.153
- Fillol-Salom, A., Alsaadi, A., Sousa, J. A. M. d., Zhong, L., Foster, K. R., Rocha, E. P., . . . Haaber, J. J. P. p. (2019). Bacteriophages benefit from generalized transduction. *15(7)*, e1007888.
- German GJ, Misra R, & AM, K. (2016). The T1-like bacteriophages In I. C. R (Ed.), *The Bacteriophages* (2nd ed., pp. 211–224). New York: NY: Oxford University Press.
- Hatfull, G. F. (2008). Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*, 11(5), 447-453. doi:10.1016/j.mib.2008.09.004
- Hatfull, G. F., & Sarkis, G. J. (1993). DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Mol Microbiol*, 7(3), 395-405. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01131.x
- Häusler, T., & Häusler, T. (2006). *Viruses Vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotics Crisis? : Palgrave Macmillan UK.*
- Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*, 61(4), 471-480. doi:10.1006/tpbi.2002.1590
- Hesse, S., & Adhya, S. (2019). Phage Therapy in the Twenty-First Century: Facing the Decline of the Antibiotic Era; Is It Finally Time for the Age of the Phage? *Annu Rev Microbiol*, 73, 155-174. doi:10.1146/annurev-micro-090817-062535
- Housby, J. N., & Mann, N. H. (2009). Phage therapy. *Drug Discov Today*, 14(11-12), 536-540. doi:10.1016/j.drudis.2009.03.006
- Huh, H., Wong, S., St Jean, J., & Slavcev, R. (2019). Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 145, 4-17. doi:10.1016/j.addr.2019.01.003
- ICTV. (2022). Taxonomía de virus: la base de datos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787-8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
- Keskitalo, A., Munukka, E., Toivonen, R., Hollmen, M., Kainulainen, H., Huovinen, P., . . . Pekkala, S. (2018). Enterobacter cloacae administration induces hepatic damage and subcutaneous fat accumulation in high-fat diet fed mice. *PLOS ONE*, 13(5), e0198262. doi:10.1371/journal.pone.0198262
- Khan, M. S. I., Gao, X., Liang, K., Mei, S., & Zhan, J. (2021). Virulent Drexleriviral Bacteriophage MSK, Morphological and Genome Resemblance With Rtp Bacteriophage Inhibits the Multidrug-Resistant Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 706700. doi:10.3389/fmicb.2021.706700

- Khawaja, K., Abbas, Z., & Rehman, S. (2016). Isolation and characterization of lytic phages TSE1-3 against *Enterobacter cloacae*. *Open Life sciences*, *11*, 287-292. doi:10.1515/biol-2016-0038
- Koonin, E. V., & Galperin, M. Y. . (2003). *Sequence - evolution - function: Computational approaches in comparative genomics*. Boston: Kluwer Academic.
- Koonjan, S., Seijsing, F., Cooper, C. J., & Nilsson, A. S. (2020). Infection Kinetics and Phylogenetic Analysis of vB_EcoD_SU57, a Virulent T1-Like Drexlerviridae Coliphage. *Frontiers in Microbiology*, *11*. doi:10.3389/fmicb.2020.565556
- Kropinski, A. M. (2006). Phage Therapy - Everything Old is New Again. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, *17*(5), 297-306. doi:10.1155/2006/329465
- Krylov, V., Pleteneva, E., Shaburova, O., Bourkaltseva, M., Krylov, S., Chesnokova, E., & Polygach, O. (2014). Common preconditions for safe phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Advances in Microbiology*, 2014.
- Kutter, E. S. A. (2005). *Bacteriophages : biology and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*: Crc press.
- Letarov, A. V., & Kulikov, E. E. (2017). Adsorption of bacteriophages on bacterial cells. *Biochemistry (Moscow)*, *82*(13), 1632-1658. doi:10.1134/S0006297917130053
- Li, E., Wei, X., Ma, Y., Yin, Z., Li, H., Lin, W., . . . Zhao, R. (2016). Isolation and characterization of a bacteriophage phiEap-2 infecting multidrug resistant *Enterobacter aerogenes*. *Scientific reports*, *6*(1), 1-11.
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, *1*(2), 111-114. doi:10.4161/bact.1.2.14590
- Luong, T., Salabarria, A. C., & Roach, D. R. (2020). Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Clin Ther*, *42*(9), 1659-1680. doi:10.1016/j.clinthera.2020.07.014
- Macchione, I. G., Lopetuso, L. R., Ianiro, G., Napoli, M., Gibiino, G., Rizzatti, G., . . . Scaldaferri, F. (2019). Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *European review for medical and pharmacological sciences*, *23*(18), 8075-8083. doi:10.26355/eurrev_201909_19024
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., . . . Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, *249*, 100-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Mandal, S. M., Roy, A., Ghosh, A. K., Hazra, T. K., Basak, A., & Franco, O. L. (2014). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from

- peptides to phages utilization. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fphar.2014.00105
- Manohar, P., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., & Nachimuthu, R. (2019). Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00574
- Mattila, S., Ruotsalainen, P., & Jalasvuori, M. (2015). On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01271
- McNair, K., Zhou, C., Dinsdale, E. A., Souza, B., & Edwards, R. A. (2019). PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics*, 35(22), 4537-4542. doi:10.1093/bioinformatics/btz265
- McShan, W. M., & Nguyen, S. V. (2016). The bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631. doi:10.1126/science.1101630
- Morozova, V., Jdeed, G., Kozlova, Y., Babkin, I., Tikunov, A., & Tikunova, N. (2021). A New *Enterobacter cloacae* Bacteriophage EC151 Encodes the Deazaguanine DNA Modification Pathway and Represents a New Genus within the Siphoviridae Family. 13(7), 1372.
- Muniz, F. J. S. (2016). *La obesidad un grave problema de Salud Pública*. Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Nair, A., Vyawahare, R., & Khairnar, K. (2021). Characterization of a novel, biofilm dispersing, lytic bacteriophage against drug-resistant *Enterobacter cloacae*. *Journal of Applied Microbiology*, n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/jam.15420>
- Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., & Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Curr Med Chem*, 24(36), 3987-4001. doi:10.2174/0929867324666170413100136
- OMS. (2020). Obesity and overweight: Fact sheet N°311. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Radilla-Vázquez, R. B., Parra-Rojas, I., Martínez-Hernández, N. E., Márquez-Sandoval, Y. F., Illades-Aguilar, B., & Castro-Alarcón, N. (2016). Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia in Young Obese Mexican Subjects. *Obes Facts*, 9(1), 1-11. doi:10.1159/000442479
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy? [Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia?]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31(2), 101-104.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc*, 2006(1). doi:10.1101/pdb.prot4455
- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G., Hill, D., & Petersen, G. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162(4), 729-773.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Schlossberg, D. (2015). *Clinical Infectious Disease* (D. Schlossberg Ed. 2 ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Seekatz, A. M., Aas, J., Gessert, C. E., Rubin, T. A., Saman, D. M., Bakken, J. S., & Young, V. B. (2014). Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. *mBio*, 5(3), e00893-00814.
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836.
- Tomat, D. D., Quiberoni, A. d. L., & Balagué, C. (2014). Descontaminación de superficies sólidas mediante cócteles fágicos para prevenir la contaminación cruzada por *Escherichia coli* enteropatógena y shigatoxigénica.
- Twort, F. W. (1915). AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet*, 186(4814), 1241-1243. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- UI Haq, I., Chaudhry, W. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Isolation and partial characterization of a virulent bacteriophage IHQ1 specific for *Aeromonas punctata* from stream water. *Microb Ecol*, 63(4), 954-963. doi:10.1007/s00248-011-9944-2
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*, 28(2), 127-181.
- Wong, C. L., Sieo, C. C., Tan, W. S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., & Ho, Y. W. (2014). Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *Int J Food Microbiol*, 172, 92-101. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.034
- Yan, H., Fei, N., Wu, G., Zhang, C., Zhao, L., & Zhang, M. (2016). Regulated Inflammation and Lipid Metabolism in Colon mRNA Expressions of Obese Germfree Mice Responding to *Enterobacter cloacae* B29 Combined with the High Fat Diet. *Frontiers in Microbiology*, 7(1786). doi:10.3389/fmicb.2016.01786

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado de presentación de poster científico en el XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN) 2021.



www.slan2021.com



31 de octubre al 4 de noviembre, 2021
VIRTUAL

“Desde el Paraguay para Latinoamérica y el mundo”

Certificado de asistencia

Por la presente certificamos que

Annet Sarai Soto Angulo

ha asistido al

XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición (SLAN virtual 2021)

celebrado virtualmente del 31 de octubre al 4 de noviembre de 2021.



Dra. Wilma Freire
Vicepresidenta SLAN



Prof. Ángel Gil
Presidente del Consejo Científico



Dr. Rafael Figueredo
Presidente del Congreso