

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-13, 2023.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.583>

Endolisinas fágicas como herramientas moleculares contra las bacterias Gram-negativas

María Zulema Juárez-Cortés¹, Marinelys Castellón-Avalos¹,
Lina Angélica Zermeño-Cervantes¹ y César Salvador Cardona-Félix^{2*}

¹Departamento de Desarrollo de Tecnologías, ²CONAHCYT, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, Playa Palo de Santa Rita s/n, La Paz 23090, Baja California Sur, México. *E-mail: cscardonafe@conacyt.mx

RESUMEN

Las enzimas líticas codificadas por los bacteriófagos o fagos (endolisinas), actualmente se evalúan como una alternativa para combatir a las bacterias patógenas. El carácter antibacteriano de estas enzimas, resulta de su capacidad para hidrolizar el peptidoglucano que compone la pared celular bacteriana. Las endolisinas se caracterizan por su reducido espectro de acción, rápido efecto bactericida, baja probabilidad de desarrollar resistencia y por su efectividad contra los patógenos multirresistentes. Gracias a la accesibilidad de las plataformas de secuenciación y a los análisis masivos de datos, se han identificado una gran cantidad de genes codificantes de endolisinas. Por otro lado, la actividad bactericida de estas enzimas se puede incrementar al manipular sus dominios funcionales, a través de la ingeniería de proteínas. En particular, esta manipulación amplía su espectro de acción contra las bacterias Gram-negativas, las cuales en su mayoría son insensibles a su efecto debido a la baja permeabilidad de su membrana externa que limita el contacto con la pared celular. Es así que, la fusión de los péptidos permeabilizadores de la membrana externa ha expandido su aplicación contra los patógenos Gram-negativos de prioridad crítica. A la fecha, existen numerosos grupos de investigación internacional que se destacan por el desarrollo tecnológico que realizan y el resultado son las patentes en este campo. Sin embargo, en México es una línea de investigación poco explorada. El objetivo de este trabajo es, difundir esta nueva generación de antibacterianos.

Palabras clave: enzimas líticas de fagos, bacteriófagos, bacterias Gram-negativas, actividad antibacteriana, endolisinas.

Phage endolysins as molecular tools against gram-negative bacteria

ABSTRACT

Recently, lytic enzymes encoded by bacteriophages or phages (endolysins) have been proposed as an alternative to combat pathogenic bacteria. The antibacterial character of these enzymes results from their ability to hydrolyze peptidoglycan activity, which composes the bacterial cell wall. Endolysins are characterized by a narrow spectrum of action, rapid bactericidal effect, low probability of bacterial resistance, harmlessness, and effectiveness against antibiotic-resistant pathogens. Thanks to sequencing platform accessibility and massive data analysis, many endolysin-encoding genes have been identified within phage genomes. Moreover, their bactericidal activity can be enhanced by manipulating their functional domains through protein engineering. Notably, this manipulation can broaden their bactericidal spectrum against Gram-negative bacteria, which are mostly insensitive to their effect. The fusion of peptides capable of permeabilizing the outer membrane has expanded the application of these endolysins against pathogens of critical priority. There are research groups worldwide with outstanding developments and patents with this technology. However, in Mexico, it is a line of research little explored. With this work, we intend to disseminate this new generation of antibacterials.

Keywords: phage lytic enzymes, bacteriophages, Gram-negative bacteria, antibacterial activity, endolysins.

INTRODUCCIÓN

En la década de 1940, la incorporación de los antibióticos en la práctica clínica dio lugar a su uso excesivo en los humanos y en la producción animal. A lo largo de los años, esta situación provocó la selección progresiva de patógenos multirresistentes, algunos de ellos altamente refractarios a todos los antibióticos conocidos (Lima, Del Fiol & Balcao, 2019). En 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO, por sus siglas en inglés) resaltó la importancia de llevar a cabo un plan de acción urgente, porque nos dirigimos a una era post-antibiótica en la que no será posible tratar eficazmente las infecciones bacterianas comunes si las condiciones presentes prevalecen (WHO, 2020). A este problema se le denominó la “Pandemia silenciosa” (Mahoney, Safae, Wuest & Furst, 2021). El nombre es producto del acelerado incremento de patógenos multirresistentes durante el COVID-19 por la prescripción excesiva de antibióticos (Rusic *et al.*, 2021; Lai, Chen, Ko & Hsueh, 2021). Esta amenaza, aunada al limitado desarrollo de nuevas terapias por la industria farmacéutica, ha impulsado a la investigación de antimicrobianos alternativos, con nuevos mecanismos de acción y de un espectro de acción reducido (Terreni, Tacconi & Pregnotato, 2021). Desde 2017, la OMS y posteriormente en 2019 el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), publicaron un listado de bacterias para las que se necesita con urgencia nuevos antibióticos (WHO, 2017; CDC, 2019). Esta lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, alta y media, y fue elaborada en un intento por orientar y promover la investigación y el desarrollo (I + D) de nuevos antibacterianos, y destacar la amenaza de los patógenos Gram-negativos resistentes a múltiples antibióticos, con capacidad para evadir y resistir a los tratamientos, además de adquirir genes que les permiten incrementar su resistencia a los medicamentos actuales. Este grupo de patógenos representa una mayor amenaza en los hospitales, en personas inmunológicamente vulnerables, y en pacientes cuya atención médica requiere dispositivos como ventiladores y catéteres sanguíneos. Los principales patógenos multiresistentes pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y a varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y *Escherichia*) (Roberts *et al.*, 2022; Birrell, Horne & Rogers, 2021).

Es necesario el desarrollo de nuevos antibacterianos contra los cuales no exista resistencia cruzada (Theuretzbacher *et al.*, 2020), y en este contexto, la terapia con bacteriófagos y las enzimas líticas codificadas por estos virus representan una alternativa prometedora porque sus mecanismos de acción son diferentes a los antibacterianos tradicionales.

BACTERIÓFAGOS: LOS PRODUCTORES DE AGENTES ANTIBACTERIANOS

Los bacteriófagos o fagos, son virus descubiertos por Frederick Twort (1915) y descritos por Félix d’Hérelle (1917), quien les dio el nombre de “bacteriophagos” (devoradores de bacterias).

Término que proviene del griego *bakteria* “bastón” y *phagos* “comer” (Salmond & Fineran, 2015). En la naturaleza, los fagos son depredadores de bacterias y arqueas, por lo que tienen una gran influencia en las comunidades microbianas, regulan sus poblaciones y son mediadores de la transferencia horizontal de genes (Camarillo-Guerrero, Almeida, Rangel-Pineros, Finn & Lawley, 2021). Al igual que otros virus, los fagos emplean la maquinaria biosintética de la célula hospedera para lograr la propagación de su progenie. El ciclo de infección inicia con la adsorción irreversible del fago a la superficie de la bacteria susceptible (Prada-Peñaranda, Holguín-Moreno, González-Barrios & Vives-Flórez, 2015). Posteriormente el fago inyecta su material genético al interior de la célula bacteriana con la ayuda de las enzimas conocidas como lisinas, que causan la ruptura local de la pared celular. De esta manera, la denominada “cola” del bacteriófago se fusiona a la membrana citoplasmática bacteriana para transferir el ADN viral (São-José, 2018). Una vez introducido el material genético, comienza su replicación a través de alguno de los cuatro tipos de ciclos conocidos: *i*) desarrollo continuo, *ii*) pseudolisogénico, *iii*) lisogénico y *iv*) lítico. Los fagos de ciclo lítico o fagos virulentos, son los idóneos como agentes de control biológico, ya que su ciclo de replicación invariablemente conduce a la lisis o muerte bacteriana (Lin, Koskella & Lin, 2017). En el ciclo lítico, dos proteínas desempeñan un papel fundamental: las holinas y las endolisinas. Estas proteínas actúan una vez que los fagos han sido ensamblados y están listos para su liberación (Pohane & Jain, 2015). Básicamente las holinas le abren paso a las endolisinas a través de la membrana interna, para que accedan a la pared celular bacteriana y la degraden, liberando así los nuevos fagos (Love, Bhandari, Dobson & Billington, 2018) (Figura 1). Esta capacidad bactericida, suscitó un gran interés en la búsqueda y el estudio de fagos capaces de combatir a las bacterias patógenas de los humanos y de los organismos de interés comercial (Salmond & Fineran, 2015).

Aunque hubo un rezago en la investigación de la terapia con fagos en Occidente y Europa Occidental debido al descubrimiento de los antibióticos, es de llamar la atención que en la entonces URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas), Polonia y otros países de Europa Oriental, se continuó con el desarrollo de la terapia con fagos. Su legado es evidente en Georgia, donde se encuentra el Instituto de Bacteriófagos G. Eliava en donde se aplica la fagoterapia en humanos (<https://eliava-institute.org/?lang=en>). El aumento a nivel mundial de infecciones causadas por patógenos resistentes motivó que el estudio de la terapia con fagos fuera retomado en Occidente como una alternativa (Kortright, Chan, Koff & Turner, 2019).

En la actualidad está demostrada la eficacia y seguridad de la fagoterapia en la práctica clínica. Incluso contra infecciones bacterianas agudas en modelos animales y en pacientes con infecciones graves, a través de su aplicación por vía intravenosa (Górski *et al.*, 2018). Hoy en día se utiliza en el tratamiento

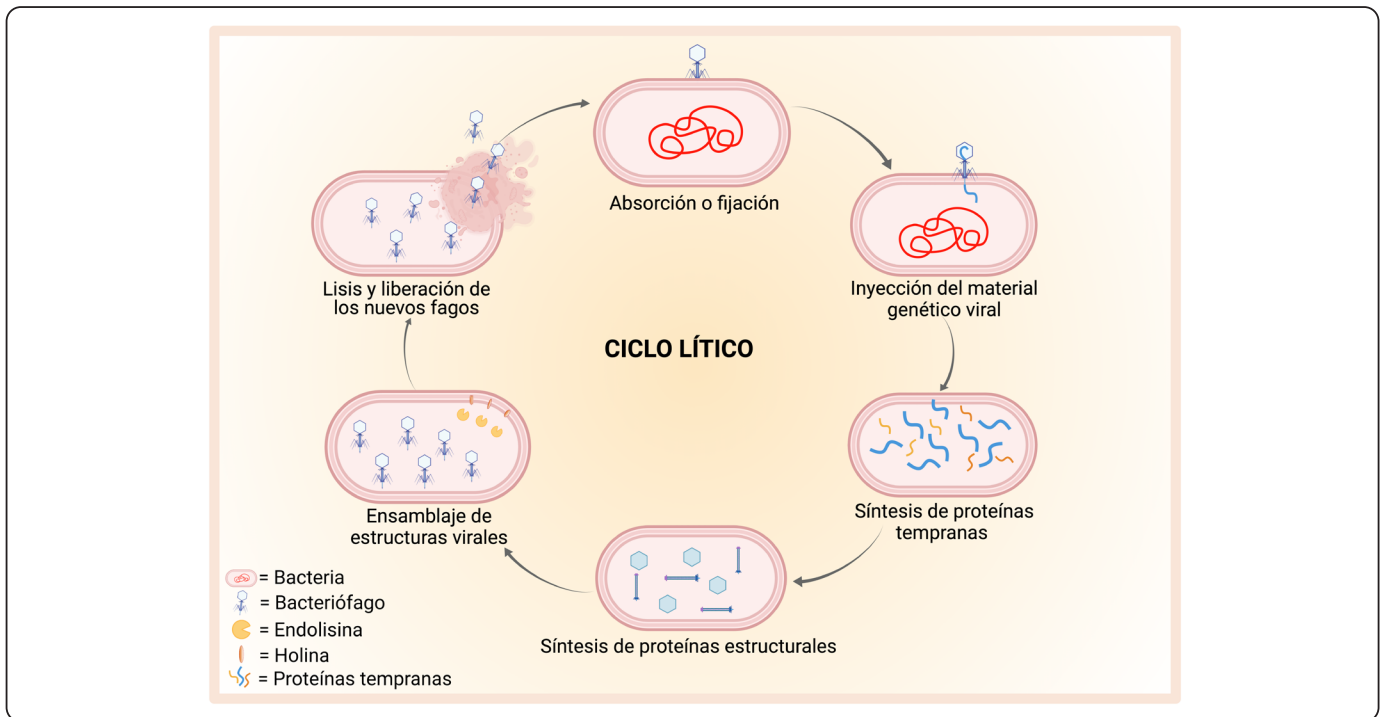


Figura 1. Descripción del ciclo de infección de los bacteriófagos líticos. Imagen creada con BioRender.

de las infecciones humanas (sólo en los países de la antigua URSS), agrícolas, veterinarias y en prevenir la contaminación de los alimentos (Doss, Culbertson, Hahn, Camacho & Barekzi, 2017). Sin embargo, aún existen desafíos para que la fagoterapia sea incorporada en la medicina Occidental moderna. Paradójicamente entre las limitantes a resolver, se encuentra la alta especificidad de los fagos. Esto quiere decir que, un fago no es capaz de reconocer todas las variantes o cepas de una misma especie, para ello son necesarios “cócteles” de fagos con un amplio espectro de acción. Además del riesgo de la transferencia de genes y la liberación de endotoxinas bacterianas tras la lisis, son otros factores limitantes (Reina & Reina, 2018). Además de los casos de éxito en el uso de los fagos, recién se ha identificado que las proteínas encargadas de la lisis bacteriana durante la última etapa del ciclo lítico, resultan asimismo prometedoras como agentes antibacterianos (Murray, Draper, Ross & Hill, 2021).

ENDOLISINAS: LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES DE LOS BACTERIÓFAGOS PARA LISAR BACTERIAS

¿Qué son las endolisinas?

Las endolisinas, también conocidas como “enzimas líticas de fagos”, son hidrolasas de mureína codificadas por los bacteriófagos en la etapa final del ciclo de infección (Gerstman, Criel & Briers, 2018). El nombre proviene de su mecanismo de acción natural que actúa “desde adentro” (Nelson *et al.*, 2012). Cumplen la función específica de debilitar la pared celular bacteriana a través de la hidrólisis del peptidoglucano

con el objetivo de liberar la progenie viral, lo que provoca la muerte celular (Fischetti, 2005; Zhang, Karra & Gorski, 2014). Son proteínas con un rango de peso molecular entre los 15-40 kDa (Abdelrahman *et al.*, 2021). Están formadas por un dominio catalítico, y en algunos casos, también por un dominio de unión a la pared celular. Este último es responsable del reconocimiento del sustrato y de su especificidad (Murray *et al.*, 2021; Lai, Chen, Ho, Xia & Leung, 2020), al limitar su efecto bactericida a un determinado género, especie, serotipo o cepa, en las endolisinas codificadas por fagos que infectan a las bacterias Gram-positivas (Nelson *et al.*, 2012). Aunque cumplen su función al final del ciclo lítico, se sabe que su expresión puede presentarse desde los tres minutos después de haberse iniciado la infección (Nguyen & Kang, 2014). Las endolisinas se consideran moléculas bactericidas altamente eficientes, por presentar un efecto lítico contra su cepa blanco en pocos minutos o incluso segundos (Briers *et al.*, 2014).

¿Cómo se organizan estructuralmente las endolisinas?

A lo largo del tiempo, las endolisinas han coevolucionado con el bacteriófago que las codifica y con su hospedero bacteriano, lo que determina diferencias en su arreglo estructural. Esto ha resultado en que las endolisinas codificadas por bacteriófagos que infectan bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sean diferentes entre sí (Pohane & Jain, 2015). Su estructura puede ser globular o modular. Las endolisinas globulares poseen solo el dominio catalítico, y provienen de fagos que infectan a las bacterias Gram-negativas (Callewaert, Walmagh, Michiels &

Lavigne, 2011; Fischetti, 2010). Las endolisinas modulares son codificadas principalmente por fagos que infectan a las bacterias Gram-positivas, y se caracterizan por tener uno o más dominios catalíticos, y uno de unión a la pared celular (Díaz, López & García, 1990). El arreglo que se encuentra con más frecuencia es el que presenta el dominio catalítico en el extremo N-terminal, y el de unión a la pared celular en el extremo C-terminal, conectados por una secuencia denominada “región enlazadora” (Kashani, Schmelcher, Sabzalipoor, Seyed Hosseini & Moniri, 2018). Otras endolisinas cuentan adicionalmente con un módulo central de unión al sustrato (Loessner, 2005). Por otro lado, las endolisinas de fagos que infectan a las bacterias Gram-negativas, en general no tienen un dominio de reconocimiento. Sin embargo, cuando este se encuentra presente, está dispuesto en el extremo N-terminal y no le confiere especificidad, sólo mayor afinidad (Briers *et al.*, 2007). Es importante señalar que en las endolisinas provenientes de fagos que infectan a las bacterias Gram-positivas, el dominio de unión tiene un papel fundamental, ya que les confiere un rango estrecho de especificidad y autopromueve la inactivación de la enzima por medio de la fuerte interacción con el sustrato. Es un mecanismo regulador que no permite que la enzima lise a otras células que pueden ser potencialmente hospederas de los fagos recién liberados (Fischetti, 2008; Pohane & Jain, 2015). No obstante, en las

endolisinas que carecen de un dominio de unión, la actividad catalítica no se ve limitada y es menos regulada (Low, Yang, Perego, Osterman & Liddington, 2005).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ENDOLISINAS

Las bacterias tienen un contenido celular delimitado por la pared celular. En su interior, se genera una alta presión osmótica de aproximadamente 5 atmósferas (0.5 MPa) en bacterias Gram-negativas y de hasta 30 atmósferas (3 MPa) en bacterias Gram-positivas (Bugg, 1999; Fischetti, 2005). La función de las endolisinas, es romper y debilitar esta pared. El proceso inicia cuando las endolisinas son sintetizadas y acumuladas en el citoplasma, enseguida acceden al peptidoglucano a través de alguno de los siguientes tres mecanismos: (Figura 2):

A) Sistema holina-endolisina: En este sistema de lisis, participan unas proteínas de membrana, denominadas holinas. Su propósito es crear poros en la membrana citoplasmática. Este mecanismo es una secuencia de eventos altamente regulados que únicamente se activa cuando la concentración de las holinas alcanza cierto umbral. Una vez alcanzado, las holinas se ensamblan y forman estructuras tipo “poro” que promueven la difusión pasiva de las endolisinas a través de la membrana citoplasmática, lo que les permite llegar al periplasma y degradar el peptidoglucano (Pohane & Jain, 2015).

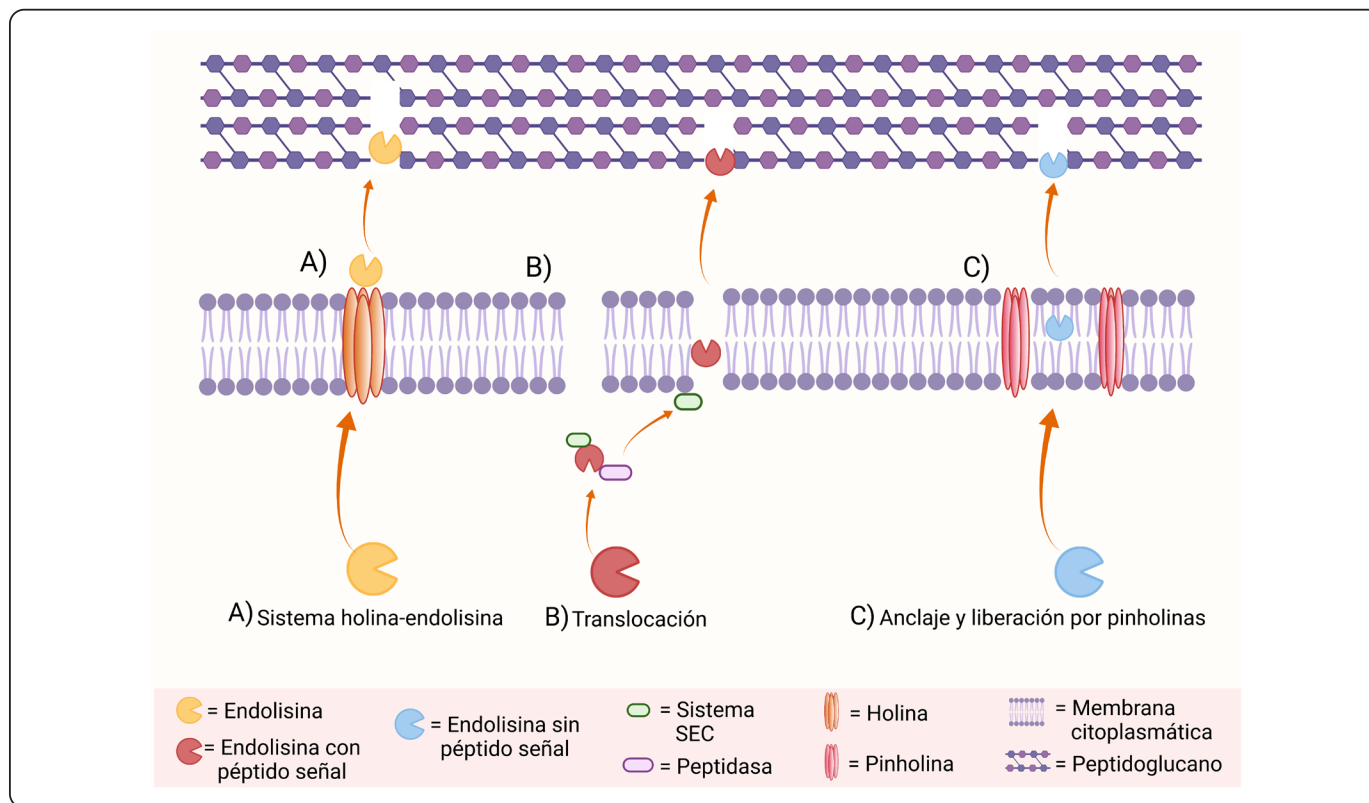


Figura 2. Mecanismos de transporte de las endolisinas. A) Sistema holina-endolisina; B) Translocación; C) Anclaje y liberación por pinholinas. Imagen creada con BioRender.

B) Translocación: Las endolisinas con un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal, tienen además una región con carga positiva, y una región hidrófoba que permite su translocación a través de la membrana citoplasmática. En este sistema de transporte, las enzimas utilizan un complejo proteico llamado translocasa que reconoce una secuencia de señal hidrofóbica o péptido líder. Ya en el espacio periplásmico, el péptido líder es procesado por peptidasas asociadas a la membrana interna, para liberar a la endolisina madura y funcional (García-Gómez & González-Pedrajo, 2011).

C) Anclaje y liberación por pinholinas: Las endolisinas con una secuencia señal de liberación en el extremo N-terminal, pero que carecen de la secuencia de reconocimiento, se acumulan y se asocian a la membrana citoplasmática con ayuda de la maquinaria de secreción de moléculas propia de la bacteria. Posteriormente, las pinholinas actúan formando poros nanométricos (<2 nm), por los que pasan los protones que ayudan a la despolarización de la membrana, y en consecuencia, liberan a las endolisinas (Young, 2014).

Clasificación y tipos de actividad enzimática de las endolisinas

El peptidoglucano de las bacterias está integrado por cadenas formadas de monómeros de N-acetilglucosamina (NAG)

unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 a residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM). Estas cadenas están unidas entre sí por péptidos cortos, que a su vez se unen entre ellas por enlaces interpeptídicos (Dörr, Moynihan & Mayer 2019). Las endolisinas tienen la capacidad de reconocer secuencias específicas del peptidoglucano y unirse a este, para romper uno de sus cuatro enlaces principales (Fischetti, 2005). A este proceso se le denomina especificidad catalítica. De acuerdo a la fracción que escinden en el peptidoglucano, las endolisinas se clasifican en (Figura 3): 1) Glucosidasas (N-acetilglucosaminidasas, N-acetilmuramididasas o lisozimas), cortan la fracción glucosídica del peptidoglucano mediante la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4 entre los monómeros de NAG y NAM (Ragland & Criss, 2017). En esta categoría también se encuentran las transglucosilasas líticas, que cortan el mismo enlace que las muramididasas pero su mecanismo de escisión no es hidrolítico. Es decir, son las únicas endolisinas que no son hidrolasas, así que forman un residuo de N-acetil-1,6-anhidro durante el corte glucosídico (Höltje & Tomasz, 1975). 2) Amidadas, rompen el enlace amida entre el NAM de la fracción glucosídica, y los residuos de L-alanina de la fracción peptídica (N-acetil-muroamil-L-alanina amidasa), y separan al polímero de glicano de la cadena peptídica. La desestabilización de la estructura causa una rápida lisis de las células hospederas (Nelson *et al.*, 2012).

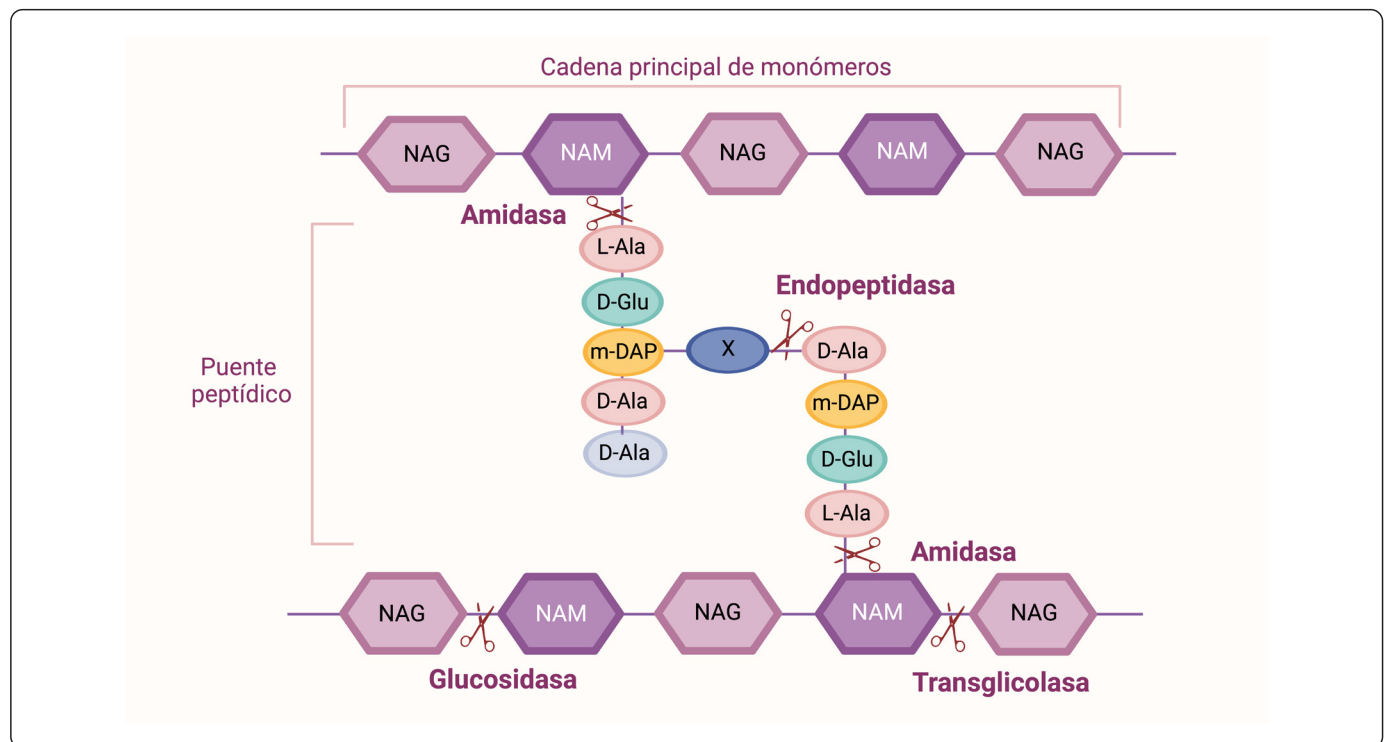


Figura 3. Estructura básica del peptidoglucano de la pared celular bacteriana. El tipo de actividad enzimática de las endolisinas y los enlaces que cortan están indicados con tijeras. En las bacterias Gram-negativas, el enlace inter-peptídico se establece entre el ácido meso-diaminopimélico (m-DAP) y el residuo D-Ala (Alanina), contrario a las bacterias Gram-positivas, en las que el m-DAP se une a un residuo de L-Lys (Lisina). Imagen creada con BioRender.

3) Endopeptidasas (proteasa), cortan los enlaces peptídicos o interpeptídicos (D-alanil-glicil y L-alanil-D-glutamato) (Korndörfer *et al.*, 2008).

LA MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA COMO BARRERA CONTRA LAS ENDOLISINAS

Sus características estructurales, actividad catalítica y especificidad, han permitido calificar a las endolisinas como excelentes candidatos antimicrobianos. Por ello, se han desarrollado estrategias para su producción vía recombinante y en particular para su aplicación frente a las bacterias Gram-positivas (Tamrakar, Singh, Chodhary & Kodgire, 2017). En 2001, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Vincent A. Fischetti en la Universidad Rockefeller (New York, EE. UU.), demostró por primera vez la eficacia antibacteriana de las endolisinas aplicadas de forma exógena a un cultivo de *Streptococcus pyogenes* (tipo A). Desde entonces, se ha demostrado en numerosos estudios su eficacia bactericida en ensayos *in vitro* e *in vivo* contra patógenos Gram-positivos (Ho, Zhang, Chen, Xia & Leung, 2022). No obstante, la aplicación exógena de las endolisinas se ha visto restringida contra las bacterias Gram-negativas, ya que su capa de peptidoglucano se encuentra protegida por la membrana externa (ME). Esta barrera natural limita, pero no impide el tratamiento con endolisinas (Murray *et al.*, 2021). Se estima que más del 50% del área superficial de la ME está ocupada por proteínas de membrana, por lo que pudiera considerarse como una capa rica en proteínas embebida en una cantidad relativamente pequeña de lípidos (Horne, Brockwell & Radford, 2020). Además, la ME es selectiva en cuanto al tránsito de las moléculas hacia el interior de la célula, con el propósito de protegerla de los compuestos tóxicos. Para mantener la homeostasis celular, establecen un intercambio de moléculas con el ambiente externo (p. ej. iones, aminoácidos y pequeños azúcares) a través de los canales de porinas. Estos canales en conjunto con la bicapa lipídica hidrofóbica, excluyen la entrada de las moléculas de tamaño superior a 600 Da (Gerstmans *et al.*, 2018). Esta bicapa lipídica está formada por fosfolípidos (FL) en la capa interna, y lipopolisacáridos (LPS) en la capa externa (MacNair, Tsai & Brown, 2020). Estas características, determinan la susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas a diferentes compuestos antimicrobianos (Ghai & Ghai, 2018). Conocer los componentes de la membrana externa ha sido el cimiento para el diseño de moléculas antibacterianas que penetren a esta barrera natural de las bacterias Gram-negativas (Delcour, 2009).

EVASIÓN DE LA IMPERMEABILIDAD BACTERIANA: ENDOLISINAS QUIMÉRICAS

A la fecha se han identificado endolisinas con regiones catiónicas y anfipáticas, cuya función es permeabilizar a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Gerstmans *et al.*, 2018). Aunque la membrana externa de estas bacterias es una barrera eficaz contra diversos compuestos, no es totalmente

impenetrable. Se ha demostrado que algunas endolisinas tienen la capacidad de atravesar la membrana externa y causar la muerte de patógenos como *Acinetobacter baumannii* (Lai *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Guo *et al.*, 2017; Larpin *et al.*, 2018), *E. coli* (Shavrina *et al.*, 2016), *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Antonova *et al.*, 2019) y *Citrobacter freundii* (Oliveira *et al.*, 2016a). Sin embargo, en general su aplicación exógena es bastante limitada (Briers *et al.*, 2007). Por lo anterior, se han usado desestabilizadores de membrana como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Yang, Wang, Yu & Wei, 2015), algunos ácidos orgánicos débiles entre ellos el cítrico, el málico, el láctico, el benzoico y el acético (Oliveira *et al.*, 2016b), así como algunos aceites esenciales (Diez-Martínez *et al.*, 2013). Lo anterior con el fin de facilitar el acceso de las endolisinas a la capa de peptidoglucano y favorecer su acción lítica. Otra estrategia es la encapsulación en liposomas catiónicos, para introducir la endolisina a la célula a través de la fusión liposoma-membrana (Bai, Yang, Chang & Ryu, 2019). No obstante, aunque estas estrategias son efectivas, la ingeniería de las endolisinas se perfila como la estrategia más eficaz y práctica para superar la impermeabilidad de la membrana externa. En la Figura 4, se ilustran las diferencias entre la aplicación exógena de las endolisinas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como las estrategias para mejorar su actividad.

La ingeniería molecular aplicada a las endolisinas implica el uso de herramientas de biología molecular, el modelado computacional y la biología estructural, para modificar la secuencia de las endolisinas con el propósito de obtener una variante mejorada. A esta nueva molécula, se le denomina “endolisina quimérica”, (Rosales, 2019). A través de la ingeniería genética se han diseñado endolisinas quiméricas que se abren paso hacia la membrana externa por diferentes mecanismos:

A) Artilisinas: Son endolisinas que en su estructura presentan diferentes fusiones traduccionales de péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos que ayudan a desestabilizar a la membrana externa (Briers *et al.*, 2014; Defraigne *et al.*, 2016). En casos exitosos, estas enzimas han mostrado actividad antimicrobiana potencializada, gracias a la fuerte atracción electrostática del péptido catiónico con las cargas negativas de la membrana externa (Briers *et al.*, 2014).

B) Innolisinas: Este diseño combina la capacidad muralítica de las endolisinas, con la capacidad de las proteínas de unión a receptores de fagos, que reconocen receptores superficiales de la membrana externa, como los LPS, proteínas, componentes de la cápsula, los pili y los flagelos (Zampara *et al.*, 2018).

C) Lisocinas: El nombre proviene de la fusión *lys*-*bacteriocin*, y consiste en la fusión de los dominios de unión de las bacteriocinas que reconocen receptores específicos para su

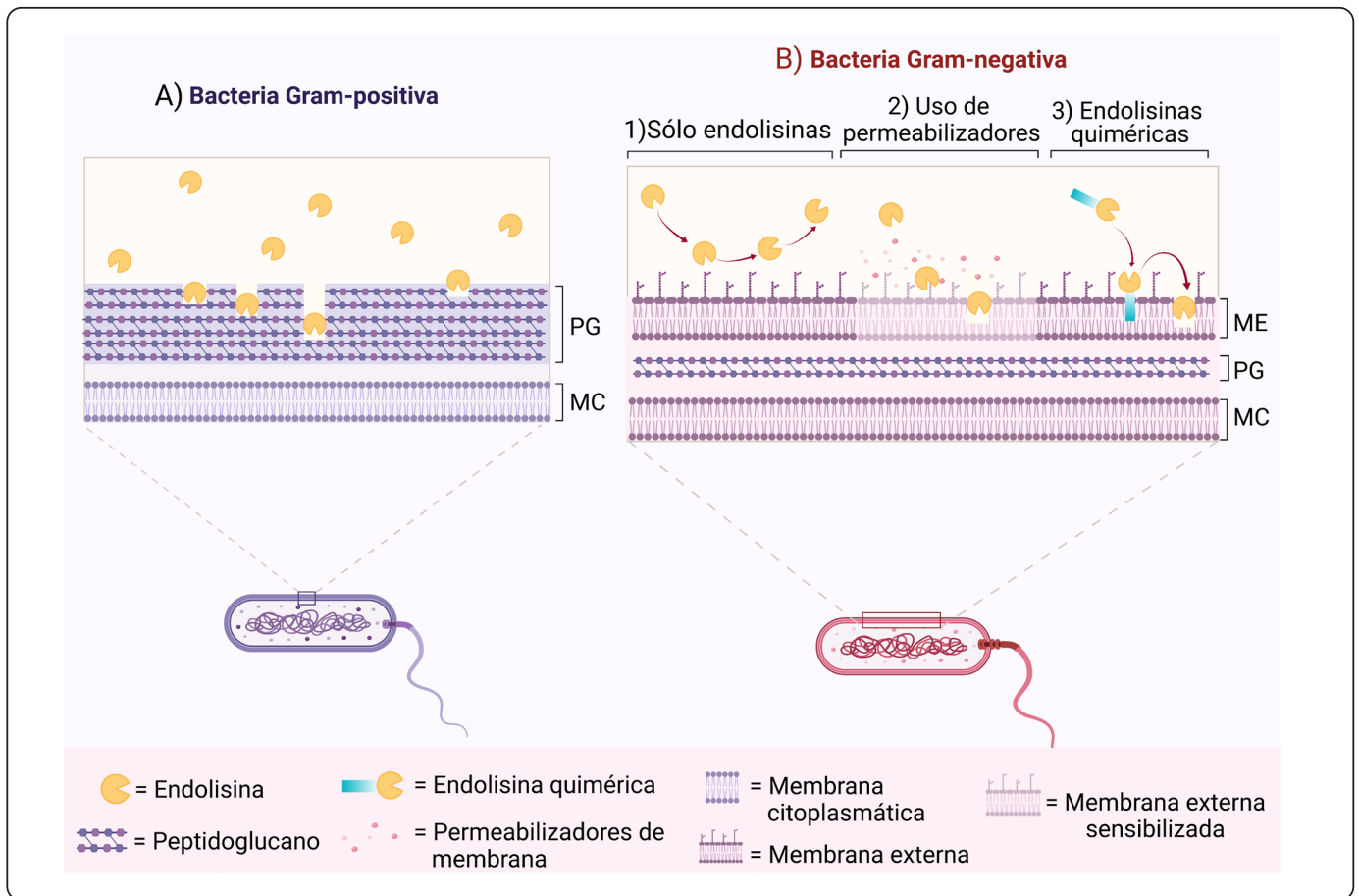


Figura 4. Aplicación exógena de las endolisinas contra las bacterias A) Gram-positivas y B) Gram-negativas. 1) Restricción del uso de las endolisinas por la presencia de la membrana externa; 2) y 3) Estrategias utilizadas para mejorar su actividad frente a las bacterias Gram-negativas. Imagen creada con BioRender.

translocación al espacio periplásmico. Esta aproximación es altamente selectiva (cepa-específica) y se ha demostrado su efecto bactericida contra las cepas de *Yersinia pestis* (Lukacik et al., 2012a; Lukacik, Barnard & Buchanan, 2012b), *Escherichia coli* (Yan et al., 2017) y *Pseudomonas aeruginosa* (Heselpoth, Euler, Schuch & Fischetti, 2019).

D) Artilisina-holina: Son la propuesta más reciente e incluyen en su diseño un péptido y una holina fusionados a una endolisina, unidos entre sí por secuencias repetidas de aminoácidos (Xu et al., 2021).

Un ejemplo de una endolisina quimérica con actividad contra bacterias Gram-negativas bajo condiciones *in vitro*, es la endolisina LysECD7-SMAP. Su diseño consiste en la fusión de un péptido de 29 aminoácidos denominado SMAP (del inglés, Sheep Myeloid Antimicrobial Peptide) al extremo N-terminal o C-terminal de la endolisina LysECD7. Esta enzima quimérica inhibe hasta el 100% del crecimiento de *Acinetobacter baumannii* a una concentración de 0.5 mg/mL. Contra *Klebsiella*

pneumoniae y *Pseudomonas aeruginosa*, los porcentajes de actividad antibacteriana se encuentran entre el 95-100% a una concentración de 50 µg/mL, y una actividad antibacteriana estable en un rango de pH 5-9 (Antonova et al., 2020).

Otro ejemplo son las “Artilisinas” que en su diseño contienen una holina y un enlazador formado por repetidos de los aminoácidos glicina y alanina. Este tipo de artilisinas han mostrado efectividad al inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* por 30 h con concentraciones que van de 100 a 500 µg/mL (Xu et al., 2021).

Si bien, existen diferentes propuestas para diseñar endolisinas quiméricas, la predicción estructural es fundamental para obtener las variantes. Con algoritmos computacionales se generan modelos tridimensionales a partir de secuencias de endolisinas conocidas. El conocimiento de la arquitectura modular de estas enzimas, así como de sus estructuras cristalográficas, ha facilitado el diseño de las endolisinas quiméricas mediante software bioinformáticos. Por lo que el diseño racional y la

ingeniería molecular de los dominios proteicos, son estrategias ampliamente utilizadas para mejorar algunas de sus propiedades y generar versiones más eficaces (Jarábková, Tišáková, Benešik & Godány, 2021). El diseño *in silico*, también denominado diseño racional, requiere del conocimiento profundo del sitio activo de las enzimas más cercanas filogenéticamente, con el fin de realizar comparaciones del tipo estructura-función (Martínez-Anaya & García-Guevara, 2014).

La predicción de la estructura de una proteína se logra con el empleo de diferentes software bioinformáticos, los cuales mediante un sistema de modelación por homología comparan la secuencia de interés con otra proteína hallada en el *Banco de Datos de Proteínas* (PDB, por sus siglas en inglés) (Alcalde-Alvites, 2016). Entre estos softwares destaca el servidor *I-TASSER* (del inglés, Iterative Threading ASSEmblly Refinement, <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) como el número uno, al presentar indicadores de precisión en el modelado estructural de las proteínas (Zhang, 2008). Por otro lado, *MODELLER* (<https://salilab.org/modeller/>) es un programa que como su nombre lo indica es utilizado para el modelado comparativo de las estructuras tridimensionales de las proteínas, y realiza lo que se conoce como modelado *de novo*, optimización de modelos y comparación de estructuras (Webb & Sali, 2016). La plataforma *PHYRE 2* es un conjunto de herramientas que permiten analizar la estructura, la función y el efecto de las mutaciones en las proteínas. Este software se caracteriza por emplear métodos avanzados de detección por homología para construir modelos en 3D y predecir sitios de unión de los ligandos (Kelley, Mezulis, Yates, Wass & Sternberg, 2015).

Otros tipos de software son necesarios para la visualización interactiva y el análisis de las estructuras moleculares. Respecto a lo anterior, *UCSF Chimera* (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>) es uno de los software disponibles de libre acceso para uso no comercial, con herramientas robustas, simples e interactivas (Pettersen *et al.*, 2004; Butt, Badshah, Shabbir & Rafiq, 2020). *CCP4mg* (<https://www.ccp4.ac.uk/MG/>) es otra herramienta para visualizar y analizar estructuras, con la posibilidad de crear gráficos y videos atractivos a través de una interfaz amigable, sus diversas opciones van desde la selección de átomos específicos, hasta la combinación de imágenes (McNicholas, Potterton, Wilson & Noble, 2011). El visor molecular *PyMOL* (<https://pymol.org/2/>), es una herramienta de gráficos muy versátil para la visualización tridimensional de diferentes tipos de moléculas. Este software cuenta con opciones para el análisis de la densidad electrónica, de superficie y de trayectorias. Además, es capaz de editar las estructuras de macromoléculas y generar videos dinámicos (Yuan, Chan & Hu, 2017).

Finalmente, una vez realizada la predicción estructural, en numerosos casos se requiere analizar las posibles interacciones

que se establecen entre la proteína de interés y otras moléculas. Un ejemplo más es, *AutoDock Vina* el software de acoplamiento de libre acceso más utilizado (Trott & Olson, 2009), que explora desde el punto de vista energético, la capacidad de interacción entre la molécula-receptora y la molécula-ligando (Pagadala, Syed & Tuszynski, 2017).

ACTIVIDAD INVENTIVA Y CAMPO DE APLICACIÓN DE LAS ENDOLISINAS

El país con mayor capacidad inventiva (patentes) e interés comercial en el uso y aplicación biotecnológica de las endolisinas, son los Estados Unidos de Norteamérica (EE. UU.) con 113 patentes concedidas. En segundo lugar está la Unión Europea con 38 patentes, y Australia en el tercer lugar. Otros países que destacan son Bélgica, China, Japón, Corea del Sur, Canadá y la Región Administrativa de Hong Kong.

Las empresas con el mayor número de patentes otorgadas en el campo de las endolisinas en los últimos 20 años son: Lysando AG en Tailandia (con 43), Microcos B.V. en Suiza (24), Gangagen Inc. en la India (25), Hypharm GmbH en Alemania (28) y Contrafect Corp en EE. UU. (20). Respecto a las universidades se encuentran: Rockefeller University en EE. UU. (37) y Leuven KU en Bélgica (22). Los titulares más sobresalientes en este ámbito son Yves Briens (Ghent University) con 27 patentes, Rob Lavigne (KU Leuven) con 28, Vincent A. Fischetti (Rockefeller University) con 30 y Stefan Miller (Lysando AG) con 37. El campo más importante de aplicación, sin duda, es el sector biotecnológico. Se tienen identificadas 947 aplicaciones de propiedad industrial y 349 patentes concedidas. Otros campos de aplicación son: el farmacéutico, la química de materiales, la química de alimentos y la tecnología médica, entre otros. La mayor aplicación y tendencia de uso de esta tecnología, es hacia las preparaciones médicas que contienen péptidos y enzimas antimicrobianas.

A la fecha existen algunas endolisinas en el mercado, la mayoría de aplicación tópica para infecciones en la piel. Otras vías de administración que aún se evalúan, son la intravenosa, la vía nasal y la encapsulación en materiales que permitan su liberación programada en el sitio de la infección (Murray *et al.*, 2021).

Los productos comerciales son Staphfect™, de venta libre en Europa desde 2017, con licencia como producto médico disponible es en la presentación de crema o gel. Es utilizada en el tratamiento de infecciones cutáneas provocadas por la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* y se ha demostrado que la cepa objetivo no desarrolla resistencia (Totté, van Doorn & Pasmans 2017). N-Rephasin® SAL200 que en 2019 completó la evaluación de seguridad y eficacia para su aplicación en dosis única de 3 mg/kg vía intravenosa, se usa como complemento en el tratamiento de bacteriemia persistente de *S. aureus* (Traczewski, Ambler & Schuch 2021).

CONCLUSIONES

El uso de las endolisinas es una alternativa novedosa para el control bacteriano gracias a sus ventajas de efectividad, un reducido espectro de acción en comparación con los antibióticos y una baja probabilidad de selección de bacterias resistentes. Sin embargo, a pesar de la abundante literatura que muestra sus ventajas como agentes antibacterianos contra los principales patógenos de importancia clínica, el conocimiento actual es limitado sobre la eficacia de estas enzimas contra otros patógenos relevantes en otros sectores que además implican otros ambientes. Es de llamar la atención que a nivel internacional hay importantes grupos de investigación científica con patentes basadas en esta tecnología. No obstante, en México es una línea de investigación poco explorada (Figura 5).

Diversos análisis de los repositorios de secuencias indican que el porcentaje de endolisinas estudiadas es extremadamente bajo, y su estudio se ha centrado en las que provienen de los genomas de fagos que infectan a las bacterias cultivables. Sin embargo, se han pasado por alto a los genomas de los fagos con hospedero no cultivable, los cuales representan cerca del 99%

de los existentes en la biosfera (Oliveira, São-José & Azeredo 2018; Vidová, Šramková, Tišáková, Oravkinová & Godány 2014). Las endolisinas estudiadas hasta ahora no abarcan todavía la diversidad de enzimas codificadas en los genomas de los fagos diseminados en los ecosistemas del planeta. Las investigaciones con base en la secuenciación masiva de las bacterias que habitan nichos ecológicos particulares, han revolucionado nuestra comprensión de la diversidad genética de los fagos, revelando genomas con linajes evolutivos completamente nuevos en una escala sin precedentes (Roux *et al.*, 2016; Paez-Espino *et al.*, 2016; Yutin *et al.*, 2018). Estos genomas son un recurso biológico para el descubrimiento de endolisinas con características únicas que ayuden al combate de los patógenos para los que se buscan urgentemente tratamientos a nivel global.

AGRADECIMIENTOS

María Zulema Juárez Cortés y Lina Angélica Zermeño Cervantes, agradecen a CONAHCYT la beca para estudios de Doctorado (738218) y para la Estancia Posdoctoral (30991), respectivamente. Este trabajo derivó del proyecto de Ciencia de Frontera CF-2019-549477 de CONAHCYT.

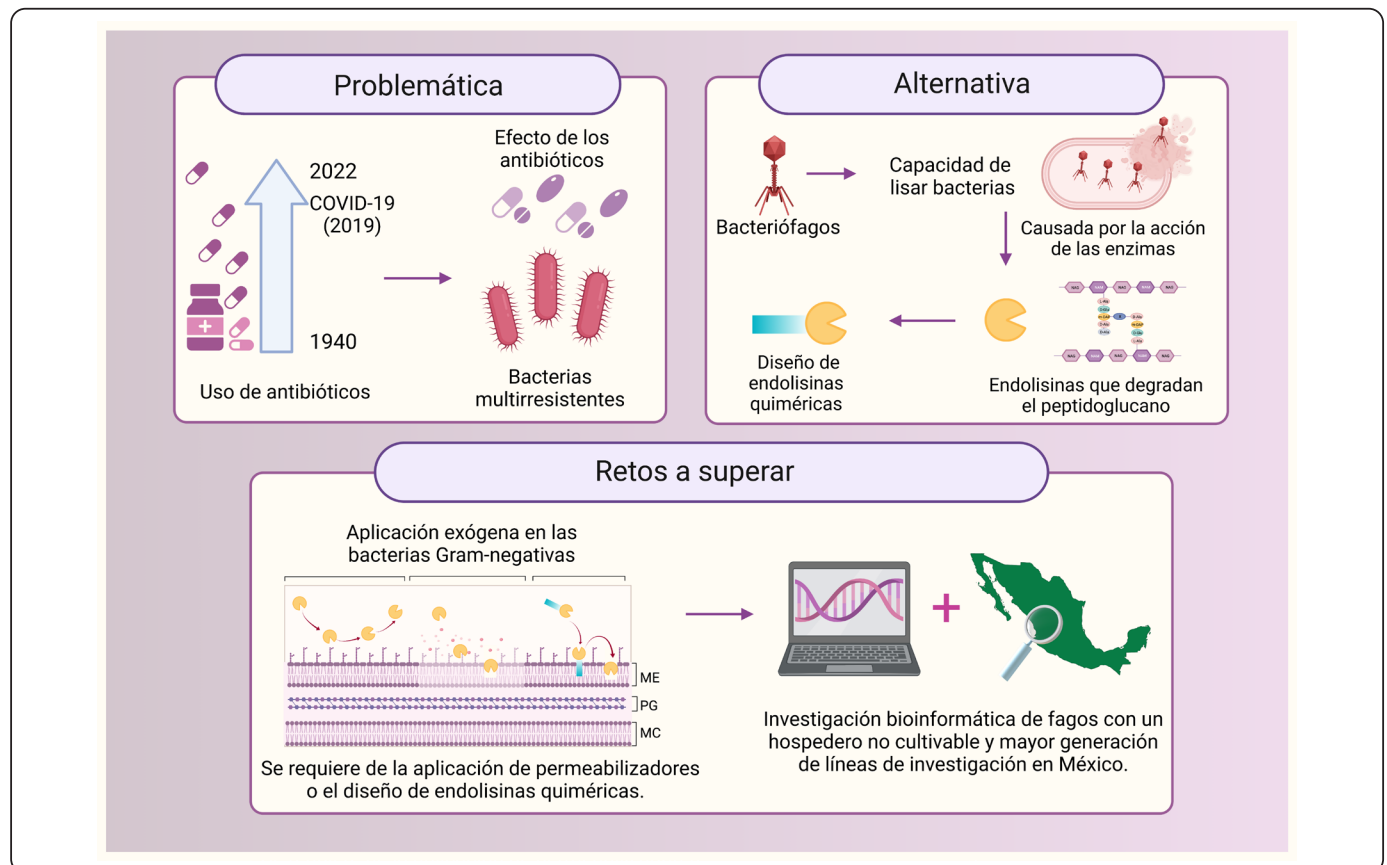


Figura 5. Las principales aportaciones de esta revisión consisten en mostrar el potencial bactericida de las endolisinas para combatir a las bacterias resistentes a los antibióticos, así como exponer los retos por superar en relación con la baja sensibilidad de las bacterias Gram-negativas. Además, ampliar la búsqueda de nuevas endolisinas, y crear líneas de investigación en México para su estudio. Imagen creada con BioRender.

REFERENCIAS

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., Khan, F. M., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S. & El-Shibiny, A. (2021). Phage-encoded endolysins. *Antibiotics*, 10(2), 124. DOI: 10.3390/antibiotics10020124
- Alcalde-Alvites, M. A. (2016). Software libre enfocados en diversos campos de las ciencias biológicas. *HAMUT'AY*, 3(1), 59-70. DOI: 10.21503/hamu.v3i1.1000
- Antonova, N. P., Vasina, D. V., Lendel, A. M., Usachev, E. V., Makarov, V. V., Gintsburg, A. L., Tkachuk, A. P. & Gushchin, V. A. (2019). Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins Lysam24, Lysecd7, and Lyssi3 against Gram-negative ESKAPE pathogens. *Viruses*, 11(3), 284. DOI: 10.3390/v11030284
- Antonova, N. P., Vasina, D. V., Rubalsky, E. O., Fursov, M. V., Savinova, A. S., Grigoriev, I. V., Usachev, E. V., Shevlyagina, N. V., Zhukhovitsky, V. G., Balabanyan, V. U., Potapov, V., Aleshkin, A., Makarov, V., Yudin, S., Gintsburg, A., Tkachuk, A. & Gushchin, V. A. (2020). Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion. *Biomolecules*, 10(3), 440. DOI: 10.3390/biom10030440
- Bai, J., Yang, E., Chang, P.-S. & Ryu, S. (2019). Preparation and characterization of endolysin-containing liposomes and evaluation of their antimicrobial activities against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 40-48. DOI: 10.3390/v10060288
- Birrell, M. T., Horne, K. & Rogers, B. A. (2021). Potential interventions for an antimicrobial stewardship bundle for *Escherichia coli* bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(4), 106301. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106301
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.-P., Miller, S., Volckaert, G. & Lavigne, R. (2014). Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *MBio*, 5(4), e01379-14. DOI: 10.1128/mBio.01379-14
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K. & Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65, 1334-1344. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05870.x
- Bugg, T. D. H. (1999). Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis and its Inhibition. *Comprehensive Natural Product Chemistry*, 3(371), 241-294. DOI: 10.1128/aac.31.7.1093
- Butt, S. S., Badshah, Y., Shabbir, M. & Rafiq, M. (2020). Molecular docking using chimera and autodock vina software for nonbioinformaticians. *JMIR Bioinformatics and Biotechnology*, 1(1), e14232. DOI: 10.2196/14232
- Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W. & Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164-171. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.012
- Camarillo-Guerrero, L. F., Almeida, A., Rangel-Pineros, G., Finn, R. D. & Lawley, T. D. (2021). Massive expansion of human gut bacteriophage diversity. *Cell*, 184(4), 1098-1109. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.029
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Recuperado 16 de abril de 2023 de: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- Defraigne, V., Schuermans, J., Grymonprez, B., Govers, S. K., Aertsen, A., Fauvart, M., Michiels, J., Lavigne, R. & Briers, Y. (2016). Efficacy of Artilysin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 3480-3488. DOI: 10.1128/AAC.00285-16
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808-816. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Díez-Martínez, R., De Paz, H., Bustamante, N., García, E., Menéndez, M. & García, P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5355-5365. DOI: 10.1128/AAC.01372-13
- Díaz, E., López, R. & García, J. L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes: A clue to the modular evolution of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 8125-8129. DOI: 10.1073/pnas.87.20.8125
- Dörr, T., Moynihan, P. J. & Mayer, C. (2019). Bacterial cell wall structure and dynamics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2051. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02051
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Barekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50. DOI: 10.3390/v9030050
- Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 13(10), 491-496. DOI: 10.1016/j.tim.2005.08.007
- Fischetti, V. A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 393-400. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.012
- Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357-362. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.002
- García-Gómez, E. & González-Pedrajo, B. (2011). Transglicosilasas líticas asociadas a los sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(2), 45-55. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=36156>

- Gerstmans, H., Criel, B. & Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnology Advances*, 36(3), 624-640. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009
- Ghai, I. & Ghai, S. (2018). Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, 11, 523-530. DOI: 10.2147/IDR.S156995
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., Jończyk-Matysiak, E., Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Bagińska, N., Letkiewicz, S., Dąbrowska, K. & Scheres, J. (2018). Phage Therapy: What Have We Learned?. *Viruses*, 10(6), 288. DOI: 10.3390/v10060288
- Guo, M., Feng, C., Ren, J., Zhuang, X., Zhang, Y., Zhu, Y., Dong, K., He, P., Guo, X. & Qin, J. (2017). A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 293. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00293
- Heselpoth, R. D., Euler, C. W., Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2019). Lysocins: Bioengineered antimicrobials that deliver lysins across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(6), e00342-19. DOI: 10.1128/AAC.00342-19
- Ho, M. K. Y., Zhang, P., Chen, X., Xia, J. & Leung, S. S. Y. (2022). Bacteriophage endolysins against gram-positive bacteria, an overview on the clinical development and recent advances on the delivery and formulation strategies. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 303-326. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1962803
- Horne, J. E., Brockwell, D. J. & Radford, S. E. (2020). Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10340-10367. DOI: 10.1074/jbc.REV120.011473
- Höltje, J. V. & Tomasz, A. (1975). Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5), 1690-1694. DOI: 10.1073/pnas.72.5.1690
- Jarábková, V., Tišáková, L., Benešik, M. & Godány, A. (2021). SH3 binding domains from phage endolysins: How to use them for detection of Gram-positive pathogens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 1215-1220. DOI: 10.15414/jmbfs.2020.9.6.1215-1220
- Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E. & Moniri, R. (2018). Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00071-17. DOI: 10.1128/CMR.00071-17
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053
- Korndörfer, I. P., Kanitz, A., Danzer, J., Zimmer, M., Loessner, M. J. & Skerra, A. (2008). Structural analysis of the l-alanoyl-d-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 64(6), 644-650. DOI: 10.1107/S0907444908007890
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 219-232. DOI: 10.1016/j.chom.2019.01.014
- Lai, M. J., Soo, P. C., Lin, N. T., Hu, A., Chen, Y. J., Chen, L. K. & Chang, K. C. (2013). Identification and characterisation of the putative phage-related endolysins through full genome sequence analysis in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(2), 141-148. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.04.022
- Lai, W. C. B., Chen, X., Ho, M. K. Y., Xia, J. & Leung, S. S. Y. (2020). Bacteriophage-derived endolysins to target Gram-negative bacteria. *International Journal of Pharmaceutics*, 589, 119833. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119833
- Lai, C. C., Chen, S. Y., Ko, W. C. & Hsueh, P. R. (2021). Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(4), 106324. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106324
- Larpin, Y., Oechslin, F., Moreillon, P., Resch, G., Entenza, J. M. & Mancini, S. (2018). *In vitro* characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS One*, 13(2), e0192507. DOI: 10.1371/journal.pone.0192507
- Lin, D. M., Koskella, B. & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162
- Lima, R., Del Fiol, F. S. & Balcão, V. M. (2019). Prospects for the use of new technologies to combat multidrug-resistant bacteria. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 692. DOI: 10.3389/fphar.2019.00692
- Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins—Current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 480-487. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.002
- Love, M. J., Bhandari, D., Dobson, R. C. & Billington, C. (2018). Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. *Antibiotics*, 7(1), 17. DOI: 10.3390/antibiotics7010017
- Low, L. Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. & Liddington, R. C. (2005). Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35433-35439. DOI: 10.1074/jbc.M502723200
- Lukacik, P., Barnard, T. J., Keller, P. W., Chaturvedi, K. S., Seddiki, N., Fairman, J. W., Noinaj, N., Kirby, T. L., Henderson, J. P., Steven, A. C., Hinnebusch, B. J. & Buchanan, S. K. (2012a). Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 9857-9862. DOI: 10.1073/pnas.1203472109

- Lukacik, P., Barnard, T. J. & Buchanan, S. K. (2012b). Using a bacteriocin structure to engineer a phage lysin that targets *Yersinia pestis*. *Biochemical Society Transactions*, 40 (6), 1503–1506. DOI: 10.1042/BST20120209
- MacNair, C. R., Tsai, C. N. & Brown, E. D. (2020). Creative targeting of the Gram-negative outer membrane in antibiotic discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 69-85. DOI: 10.1111/nyas.14280
- Mahoney, A. R., Safaei, M. M., Wuest, W. M. & Furst, A. L. (2021). The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. *IScience*, 24(4), 102304. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102304
- Martínez-Anaya, C. & García-Guevara, J. F. (2014). Ingeniería de proteínas para el mejoramiento de enzimas. Recuperado 16 de abril de 2023, de <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art93/>
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S. & Noble, M. E. M. (2011). Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 67(4), 386-394. DOI: 10.1107/S0907444911007281
- Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P. & Hill, C. (2021). The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses*, 13(4), 680. DOI: 10.3390/v13040680
- Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodríguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S. & Donovan, D. M. (2012). Endolysins as antimicrobials. *Advances in Virus Research*, 83, 299-365. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4
- Nguyen, H. M. & Kang, C. (2014). Lysis delay and burst shrinkage of coliphage T7 by deletion of terminator T ϕ reversed by deletion of early genes. *Journal of Virology*, 88(4), 2107-2115. DOI: 10.1128/JVI.03274-13
- Oliveira, H., Pinto, G., Oliveira, A., Oliveira, C., Faustino, M. A., Briers, Y., Domingues, L. & Azeredo, J. (2016a). Characterization and genome sequencing of a *Citrobacter freundii* phage CfP1 harboring a lysin active against multidrug-resistant isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 10543-10553. DOI: 10.1007/s00253-016-7858-0
- Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L. D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F. & Azeredo, J. (2016b). Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 208. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00208
- Oliveira, H., São-José, C. & Azeredo, J. (2018). Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: Challenges and future prospects for *in vivo* therapy. *Viruses*, 10(6), 292. DOI: 10.3390/v10060292
- Paez-Espino, D., Eloie-Fadrosch, E. A., Pavlopoulos, G. A., Thomas, A. D., Huntemann, M., Mikhailova, N., Rubín, E., Ivanova, N. N. & Kyrpidis, N. C. (2016). *Uncovering Earth's virome*. *Nature*, 536(7617), 425-430. DOI: 10.1038/nature19094
- Pagadala, N. S., Syed, K. & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102. DOI: 10.1007/s12551-016-0247-1
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084
- Pohane, A. A. & Jain, V. (2015). Insights into the regulation of bacteriophage endolysin: Multiple means to the same end. *Microbiology*, 161(Pt_12), 2269-2276. DOI: 10.1099/mic.0.000190
- Prada-Peñaranda, C., Holguín-Moreno, A. V., González-Barrios, A. F. & Vives-Flórez, M. J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 43-59. DOI: 10.11144/Javeriana.SC20-1.faci
- Ragland, S. A. & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006512. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006512
- Reina, J. & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿Una alternativa a la antibioticoterapia?. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159377/>
- Roberts, K. D., Zhu, Y., Azad, M. A. K., Han, M.-L., Wang, J., Wang, L., Yu, H. H., Horne, A. S., Pinson, J.-A., Rudd, D., Voelcker, N. H., Patil, N. A., Zhao, J., Jiang, X., Lu, J., Chen, K., Lomovskaya, O., Hecker, S. J., Thompson, P. E., Nation, R. L., Dudley, M. N., Griffith, D. C., Velkov, T. & Li, J. (2022). A synthetic lipopeptide targeting top-priority multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nature Communications*, 13(1), 1625. DOI: 10.1038/s41467-022-29234-3
- Rosales, A. J. (2019). Los retos actuales en la ingeniería de proteínas. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 26(3), 66. <https://www.redalyc.org/journal/104/10459650011/movil/>
- Roux, S., Brum, J. R., Dutilh, B. E., Sunagawa, S., Duhaime, M. B., Loy, A., Poulos, B. T., Solonenko, N., Lara, E., Poulain, J., Pesant, S., Kandels-Lewis, S., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Cruaud, C., Alberti, A., Duarte, C. M., Gasol, J. M., Vaqué, D., Coordinators, T. O., Bork, P., Acinas, S. G., Wincker, P. & Sullivan, M. B. (2016). Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature*, 537(7622), 689-693. DOI: 10.1038/nature19366
- Rusic, D., Vilovic, M., Bukic, J., Leskur, D., Seselja Perisin, A., Kumric, M., Martinovic, D., Petric, A., Modun, D. & Bozic, J. (2021). Implications of COVID-19 pandemic on the emergence of antimicrobial resistance: Adjusting the response to future outbreaks. *Life*, 11(3), 220. DOI: 10.3390/life11030220
- Salmond, G. P. & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage:

- Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786. DOI: 10.1038/nrmicro3564
- São-José, C. (2018). Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials. *Antibiotics*, 7(2), 29. DOI: 10.3390/antibiotics7020029
- Shavrina, M. S., Zimin, A. A., Molochkov, N. V., Chernyshov, S. V., Machulin, A. V. & Mikoulskaia, G. V. (2016). *In vitro* study of the antibacterial effect of the bacteriophage T5 thermostable endolysin on *Escherichia coli* cells. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1282-1290. DOI: 10.1111/jam.13251
- Tamrakar, A., Singh, A. K., Chodhary, M. & Kodgire, P. (2017). Fighting with Gram-negative enemy: Can outer membrane proteins aid in the rescue?. *Chemical Biology Letters*, 4(1), 9-19. <http://pubs.iscience.in/journal/index.php/cbl/article/view/551>
- Terreni, M., Taccani, M. & Pregnolato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. *Molecules*, 26(9), 2671. DOI: 10.3390/molecules26092671
- Theuretzbacher, U., Bush, K., Harbarth, S., Paul, M., Rex, J. H., Tacconelli, E. & Thwaites, G. E. (2020). Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 286-298. DOI: 10.1038/s41579-020-0340-0
- Totté, J. E., van Doorn, M. B. & Pasmans, S. G. (2017). Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin Staphfect SA. 100: A report of 3 cases. *Case Reports in Dermatology*, 9(2), 19-25. DOI: 10.1159/000473872
- Traczewski, M. M., Ambler, J. E. & Schuch, R. (2021). Determination of MIC quality control parameters for exebacase, a novel lysin with antistaphylococcal activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(7), e03117-20. DOI: 10.1128/JCM.03117-20
- Trott, O. & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334
- Vidová, B., Šramková, Z., Tišáková, L., Oravkinová, M. & Godány, A. (2014). Bioinformatics analysis of bacteriophage and prophage endolysin domains. *Biologia*, 69(5), 541-556. DOI: 10.2478/s11756-014-0358-8
- Webb, B. & Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1), 5-6. DOI: 10.1002/cpbi.3
- WHO, 2017. Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed. Recuperado 16 de abril de 2023 de: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO, 2020. Antibiotic resistance. Recuperado 16 de abril de 2023 de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Xu, D., Zhao, S., Dou, J., Xu, X., Zhi, Y. & Wen, L. (2021). Engineered endolysin-based "Artilynsins" for controlling the Gram-negative pathogen *Helicobacter pylori*. *AMB Express*, 11(1), 63. DOI: 10.1186/s13568-021-01222-8
- Yan, G., Liu, J., Ma, Q., Zhu, R., Guo, Z., Gao, C., Wang, S., Yu, L., Gu, J., Hu, D., Han, W., Du, R., Yang, J. & Lei, L. (2017). The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysin to lyse *Escherichia coli* extracellularly. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(12), 1627-1635. DOI: 10.1007/s10482-017-0912-9
- Yang, H., Wang, M., Yu, J. & Wei, H. (2015). Antibacterial activity of a novel peptide-modified lysin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1471. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01471
- Young, R. (2014). Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*, 52, 243-258. DOI: 10.1007/s12275-014-4087-z
- Yuan, S., Chan, H. S. & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(2), e1298. DOI: 10.1002/wcms.1298
- Yutin, N., Makarova, K. S., Gussow, A. B., Krupovic, M., Segall, A., Edwards, R. A. & Koonin, E. V. (2018). Discovery of an expansive bacteriophage family that includes the most abundant viruses from the human gut. *Nature Microbiology*, 3(1), 38-46. DOI: 10.1038/s41564-017-0053-y
- Zampara, A., Sørensen, M. C. H., Grimmon, D., Antenucci, F., Briers, Y. & Brøndsted, L. (2018). Innolysins: A novel approach to engineer endolysins to kill Gram-negative bacteria. *BioRxiv*, 408948. DOI: 10.1101/408948
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 40. DOI: 10.1186/1471-2105-9-40
- Zhang, M., Karra, S. & Gorski, W. (2014). Electrochemical coupled-enzyme assays at carbon nanotubes. *Analytical Chemistry*, 86(18), 9330-9334. DOI: 10.1021/ac502687z