



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía
Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales



**Efecto lítico de un coctel de bacteriófagos contra *Enterobacter cloacae*
en la microbiota intestinal asociada a la obesidad en un modelo *ex vivo***

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

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

Presenta:

LN. Sthefhany Nohemí Rodríguez Arellano

Culiacán, Sinaloa, México

Julio del 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

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



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme continuar con mi formación académica en la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, en el programa de posgrado en la Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales. Además, agradezco al CONAHCYT por la beca que me otorgaron durante este periodo de estudios.

Agradezco a mis directores de tesis, la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez y el Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto. Aprecio profundamente su tiempo, paciencia y la generosidad con la que compartieron sus conocimientos, introduciéndome al fascinante mundo de la nutrición en relación con la microbiología.

Agradezco a mi comité de tesis la Dra. Elisa María Barrón Cabrera y la Dra. Mónica Lizzete Castro Acosta, por su gran dedicación y responsabilidad en la formación de profesionales. Agradezco a Melissa Vega por sus contribuciones significativas en este proyecto.

Agradezco profundamente al Dr. Jean Pierre Gonzales Gómez por su constante disponibilidad, sus valiosas enseñanzas y sus buenos consejos. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A Salma Cristerna, Diana Reyes, Yaritza Arredondo, Ana Jiménez, Diana Ferreira y Eduardo Sarabia; Agradezco haber coincidido con ustedes. Me llevo muchas vivencias inolvidables y atesoro los momentos que compartimos. Los quiero mucho y siempre tendrán un lugar especial en mi corazón. Su amistad y el apoyo mutuo han enriquecido esta experiencia.

Agradezco a cada una de las personas que conforman el equipo de LANIIA. Todos ustedes han contribuido en mi trayectoria, brindándome conocimientos y apoyo en cada etapa de mi desarrollo profesional. Además, valoro profundamente su amistad, sus consejos, tanto personales como

profesionales, han sido invaluable, y me siento afortunada de haber formado parte de un equipo tan comprometido y talentoso.

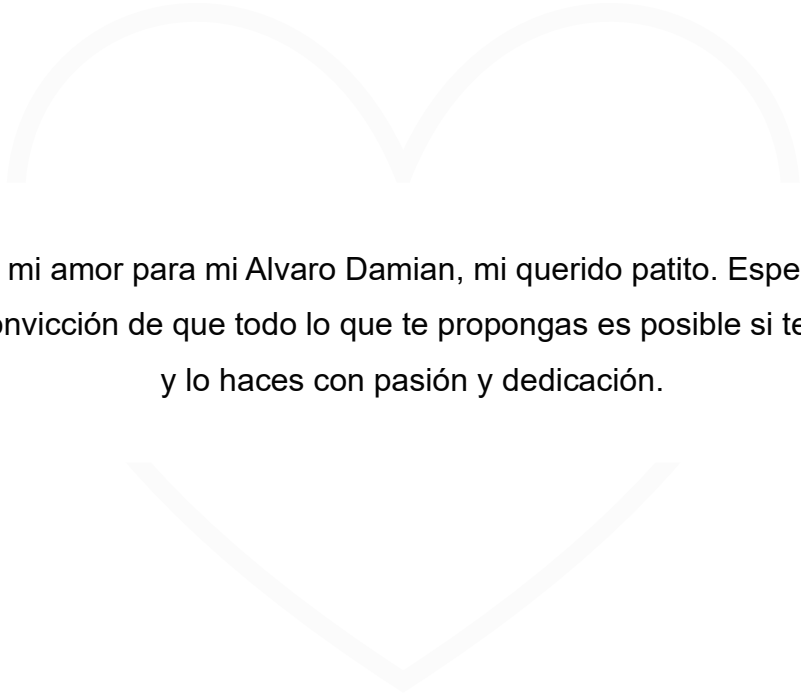
Agradezco a la Dra. Marisela Gonzáles Ávila y a su equipo: Yara Hinojosa, Juan Hernández, Fernanda Valdivia, Andrés Lomelí y Paola Herrera por recibirme en el laboratorio *ex vivo* y hacerme sentir en casa, compartiéndome siempre su apoyo y conocimientos.

A Alvaro Carrasco por haberme apoyado previo a entrar a la maestría y siempre impulsándome a que no soltara mis sueños.

Agradezco a mis hermanos, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo total. A mis padres, quienes son la piedra angular de mi vida, les debo todo lo que he logrado. Estoy aquí gracias a su amor incondicional y constante respaldo. Quiero que sepan que todo su esfuerzo se ve reflejado en este logro, y no podría haber alcanzado esta meta sin ustedes. Su apoyo ha sido esencial, y este momento es tanto mío como de ustedes.

Principalmente, quiero expresar mi agradecimiento a mi pequeña familia: César y nuestro bebé. Ustedes han estado a mi lado en cada etapa de este proceso, compartiendo conmigo cada clase, presentación, congreso y estancia. Con su amor incondicional y apoyo constante, han sido mi mejor equipo. Son mi fuente de motivación e inspiración constante. Los amo con todo mi corazón y estoy eternamente agradecida por tenerlos a mi lado.

DEDICATORIA



Con todo mi amor para mi Alvaro Damian, mi querido patito. Espero sembrar en ti la convicción de que todo lo que te propongas es posible si te esfuerzas y lo haces con pasión y dedicación.

RESUMEN

A nivel mundial, el sobrepeso y la obesidad afectan a más de 2600 millones de adultos, destacando a México como el quinto país con mayor prevalencia. La Organización Mundial de la Salud define al sobrepeso y a la obesidad como una acumulación anormal de grasa con efectos perjudiciales para la salud. La etiología del sobrepeso y la obesidad es multifactorial, e incluye aspectos genéticos, socioeconómicos, estilo de vida, alimentación, así como disbiosis intestinal. La microbiota intestinal de personas con obesidad es diferente a la de personas con normopeso, siendo menos diversa y con la presencia de bacterias que inducen procesos inflamatorios como *Enterobacter cloacae*. Las estrategias para modular la microbiota incluyen el tipo de dieta, el uso de pro/prebióticos, el trasplante de microbiota fecal y la fagoterapia. En esta última, se utilizan virus que solo infectan a células bacterianas con un rango de hospederos reducido que no altera la microbiota natural. El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto lítico de un coctel de bacteriófagos contra *Enterobacter cloacae* presente en la microbiota intestinal estandarizada de personas con obesidad. Para ello, se llevó a cabo una caracterización biológica de 9 bacteriófagos selectivos para *Enterobacter cloacae* y se procedió con la formulación de un coctel de 2 bacteriófagos a los cuales se les analizó su genoma. Para investigar su efecto lítico, se evaluó en la microbiota de personas con obesidad mediante un modelo *ex vivo*. El estudio incluyó la caracterización microbiológica y genómica, antes y después del tratamiento con el coctel de bacteriófagos. El inóculo utilizado se derivó de materia fecal de personas con obesidad. Se evaluaron 2 grupos: microbiota intestinal nativa y microbiota intestinal enriquecida con *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Se realizaron los análisis estadísticos en el software IBM SPSS, GraphPad Prims y RStudio, considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El título viral de los bacteriófagos fue de 7.55×10^{10} UFP/mL en promedio, con un rango de hospederos reducido a bacterias de la misma familia y una actividad lítica mayor a 7 horas en todos los bacteriófagos. Con

base en estos resultados se formuló el coctel, con los bacteriófagos AS5 Y AS6, evaluando su genoma encontramos que AS5 presenta una longitud de 49, 578 pb de longitud, un porcentaje de guanina-citocina del 47.9 %, no presenta ARNt y presenta ciclo de vida lítico. Mientras que el AS6, presentó una longitud de 171, 281 pb, un porcentaje de guanina-citocina del 39.8 %, presentó 19 ARNt y ciclo de vida lítico. El análisis bioinformático mostró la ausencia de genes relacionados a virulencia, resistencia a antibióticos y ciclo de vida lisogénico. Con respecto a la fermentación de la microbiota intestinal en los biorreactores, tuvimos un tiempo de estabilización de 28 días. Al inocular el coctel observamos un aumento del conteo de bacteriófagos en los biorreactores, así como la modulación de la microbiota intestinal en ambos grupos, sin embargo fue más significativa la disminución de enterobacterias en el grupo en el cual se enriqueció la microbiota intestinal. Concluimos que el coctel de bacteriófagos presentó un genoma adecuado para la fagoterapia, y los cambios en la composición bacteriana tras las digestiones evidencian el efecto lítico en la microbiota intestinal. Este estudio destaca el potencial de la fagoterapia como una estrategia prometedora para modular la microbiota intestinal en el contexto de la obesidad y su potencial para tratar la disbiosis inducida por *Enterobacter cloacae*.

Palabras clave: Obesidad, microbiota intestinal, bacteriófagos, disbiosis intestinal y fagoterapia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Definición de obesidad	3
2.2 Epidemiología mundial.....	3
2.3 Epidemiología nacional.....	4
2.4 Diagnóstico	4
2.4.1 Índice de masa corporal	4
2.5 Etiología y fisiopatología.....	5
2.6 Microbiota intestinal	8
2.6.1 Funciones de la microbiota intestinal.....	9
2.6.2 Microbiota intestinal de personas con obesidad	9
2.7 <i>Enterobacter cloacae</i>	10
2.7.1 Lipopolisacáridos.....	11
2.8 Terapia de la obesidad.....	17
2.8.1 Dieta	17
2.8.2 Probióticos.....	17
2.8.3 Prebióticos.....	18
2.8.4 Trasplante de microbiota fecal.....	18
2.8.5 Bacteriófagos	18
2.9 Fagoterapia	21
2.9.1 Ciclo de vida.....	23
2.9.2 Aislamiento	26
2.9.3 Actividad biológica	26
2.9.4 Genoma.....	28
2.9.5 Evaluación de la eficacia terapéutica	28
2.10 Sistema Intestinal Automático y Robótico.....	28
2.11 Gen ARNr 16s.....	31
3. HIPOTESIS.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo general.....	34

4.2 Objetivos específicos.....	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Tipo de estudio	35
5.2 Diseño del estudio	35
5.3 Formulación del coctel de bacteriófagos	41
5.3.1 Cálculo del título viral	41
5.3.2 Rango de hospederos	42
5.3.3 Cinética de lisis de <i>Enterobacter cloacae</i>	45
5.3.4 Extracción y secuenciación del ADN de los bacteriófagos	46
5.3.5 Análisis bioinformáticos	47
5.4 Estabilización de la microbiota intestinal	47
5.5 Administración del coctel de bacteriófagos al simulador del tracto digestivo	48
5.5.1 Simulación del estómago	49
5.5.2 Simulación del intestino delgado	49
5.5.3 Simulación de colon ascendente.....	49
5.5.4 Simulación de colon transverso.....	49
5.5.5 Simulación del colon descendente	50
5.6 Análisis microbiológicos.....	52
5.6.1 Conteo de bacterias en muestras de los biorreactores	52
5.6.2 Titulación de bacteriófagos en muestras de los biorreactores.....	53
5.7 Extracción y secuenciación del material genético.....	53
5.8 Análisis bioinformáticos	54
5.9 Análisis estadístico	55
6. RESULTADOS	56
6.1 Formulación del coctel de bacteriófagos	56
6.1.1 Cálculo del título viral	56
6.1.2 Rango de hospederos	59
6.1.3 Cinética de lisis de <i>Enterobacter cloacae</i>	62
6.1.4 Secuenciación del ADN genómico de los bacteriófagos.....	66
6.2 Estabilización de la microbiota intestinal	70
6.3 Administración del coctel de bacteriófagos al simulador de tracto digestivo	72

6.3.1 Análisis microbiológicos.....	72
6.3.2 Secuenciación del gen ARNr 16s	76
7. DISCUSIÓN.....	93
8. CONCLUSIONES	106
9. RECOMENDACIONES.....	108
10. REFERENCIAS	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etiología y fisiopatología de la obesidad	7
Figura 2. Arquitectura de la membrana plasmática de las bacterias Gram negativas.	13
Figura 3. Relación entre la microbiota intestinal y la obesidad	16
Figura 4. Estructura general de un bacteriófago	20
Figura 5. Pautas por seguir en el desarrollo terapéutico de la fagoterapia ..	22
Figura 6. Ciclo de vida del bacteriófago	25
Figura 7. Representación esquemática del simulador del tracto gastrointestinal humano	30
Figura 8. Flujo de trabajo	36
Figura 9. Bioensayo <i>ex vivo</i> de la microbiota intestinal de personas con obesidad.	51
Figura 10. Morfología de las placas formadas en una caja de agar	58
Figura 11. Actividad lítica exhibida en el rango de hospederos.....	61
Figura 12. Actividad bacteriolítica de los bacteriófagos aislados contra <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	63
Figura 13. Ensayo de exposición bacteriana de los cocteles.....	65
Figura 14. Genómica comparativa de los bacteriófagos AS5 y AS6	67
Figura 15. Análisis genómico del bacteriófago AS5.	68
Figura 16. Análisis genómico del bacteriófago AS6	69
Figura 17. Resultados del recuento bacteriano de la estabilización de la microbiota intestinal de personas con obesidad	71
Figura 18. Análisis microbiológicos de los biorreactores que simulan las porciones del colon	73
Figura 19. Resultados del recuento bacteriano de la intervención con el coctel de bacteriófagos en ARIS	75
Figura 20. Curvas de rarefacción.	78
Figura 21. Estimación de la beta diversidad	84
Figura 22. Mapa de calor de los filos y géneros más abundante durante el bioensayo del grupo MIN	86
Figura 23. Abundancia relativa de los géneros más abundantes de los cinco filos más abundantes del grupo MIN.....	87
Figura 24. Mapa de calor de los filos y géneros más abundante durante el bioensayo del grupo MIE	89
Figura 25. Abundancia relativa de los géneros más abundantes de los cinco filos más abundantes del grupo MIE.....	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del IMC según la OMS.....	38
Tabla 2. Grupos de estudio.....	40
Tabla 3. Cepario utilizado para la evaluación del rango de hospederos.....	43
Tabla 4. Titulo viral de los bacteriófagos.....	57
Tabla 5. Rango de hospederos.....	60
Tabla 6. Alfa diversidad del colon ascendente del grupo MIN	80
Tabla 7. Alfa diversidad del colon transversal del grupo MIN	80
Tabla 8. Alfa diversidad del colon descendente del grupo MIN	80
Tabla 9. Alfa diversidad del colon ascendente del grupo MIE.....	82
Tabla 10. Alfa diversidad del colon transversal del grupo MIE	82
Tabla 11. Alfa diversidad del colon descendente del grupo MIE.....	82
Tabla 12. Secuencias del gen ARNr 16s de <i>Enterobacter cloacae</i>	92

ANEXOS

Anexo 1. Participación en la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS, 2022.....	128
Anexo 2. Participación en el XV Coloquio Internacional de Investigación para estudiantes Universitarios. VII Coloquio Internacional de Investigación Universitaria.....	129
Anexo 3. Reconocimiento del primer lugar en presentación de cartel en el XV Coloquio Internacional de Investigación para estudiantes Universitarios. VII Coloquio Internacional de Investigación Universitaria.....	130
Anexo 4. Participación en el 4to Congreso Internacional Sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria.....	131
Anexo 5. Reconocimiento del segundo lugar en presentación de cartel en el 4to Congreso Internacional Sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria.....	132
Anexo 6. Participación en el Primer Congreso de Investigadoras Sinaloenses.....	133
Anexo 7. Estancia académica en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.....	134
Anexo 8. Estancia académica en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.....	135
Anexo 9. Publicación del artículo "Genomic and biological characterization of bacteriophages against <i>Enterobacter cloacae</i> , a high-priority pathogen" ...	136

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad, es una de las principales causas de enfermedades crónicas y trastornos metabólicos (OMS, 2021). Se estima que para el año 2030, a nivel mundial, el número de adultos con obesidad podría aumentar a 573 millones (Duan et al., 2021). La obesidad presenta una etiología multifactorial, destacando la dieta, la disbiosis intestinal y su relación con la inflamación sistémica, particularmente en el contexto del tejido adiposo (Hildebrandt et al., 2023). Recientemente se ha demostrado un vínculo directo entre la composición de la microbiota intestinal y la patogenia de la obesidad (Palmas et al., 2021a). Muchos factores afectan la biodiversidad de la microbiota intestinal, como la dieta, los medicamentos, el ejercicio y la etapa de la vida (Altveş et al., 2020).

La microbiota intestinal de las personas con obesidad difiere de las personas normopeso; es menos compleja, particularmente en los grupos bacterianos que allí habitan Yan et al. (2022). Además, presenta una disminución de los bacteriófagos nativos en la microbiota y se van disminuyendo conforme va aumentando el grado de obesidad Palmas et al. (2021a). Los estudios actuales han demostrado que las endotoxinas, también conocidos como lipopolisacáridos (LPS), producidos por las bacterias de la microbiota intestinal, participan en la fisiopatología de la obesidad, lo que está relacionado con el agravamiento de la inflamación inducida (Jin et al., 2022). Se ha informado que los LPS de enterobacterias exhiben una actividad de endotoxina significativamente mayor que los LPS de bacterias intestinales más abundantes como las del filo Bacteroidetes. Una de estas especies de enterobacterias que poseen LPS asociadas con la obesidad y el daño hepático es *Enterobacter cloacae* (Keskitalo et al., 2018). Esta bacteria es un bacilo corto, Gram negativo y perteneciente al filo Proteobacteria (Jin et al., 2022).

El impacto de la microbiota intestinal en la salud ha sido un gran foco de interés, ya que tienen efectos positivos en muchas condiciones de salud (Aoun et al., 2020). Se han desarrollado nuevas estrategias de manipulación de la microbiota intestinal, como una dieta adecuada, el uso de pre/probióticos, el trasplante de microbiota fecal y terapia con bacteriófagos (Paule et al., 2018). Los bacteriófagos son virus, conocidos como el agente biológico más abundante en la tierra, que infectan y se replican solo en células bacterianas (Simmonds y Aiewsakun, 2018b). El espectro de infección suele ser estrecho, limitado a unas pocas cepas de la misma especie; por lo tanto, no modifican la microbiota intestinal natural en comparación con los antibióticos de amplio espectro (Paule et al., 2018). El estudio de la microbiota intestinal debe incluir el análisis del equilibrio fago-bacteria y la respuesta inmune frente a la tolerancia o el desequilibrio con la inflamación (Paule et al., 2018). La simulación del colon facilita las investigaciones eludiendo las restricciones éticas y reduciendo los costos del estudio. Estos modelos brindan posibilidades ilimitadas de detección de nuevos productos, lo que facilita el monitoreo continuo (Wiese et al., 2018).

Aunque se utilizan varios métodos para tratar el aumento de peso excesivo, la obesidad sigue siendo un importante problema de salud pública, que requiere soluciones nutricionales y/o médicas novedosas (Aoun et al., 2020). El estudio del papel terapéutico de los bacteriófagos en el intestino puede guiar a nuevos enfoques, como perturbar bacterias específicas de manera deliberada, dilucidar la causalidad mediada por interacciones interbacterianas, así como entre bacterias y mamíferos, en última instancia, diseñar enfoques precisos y predecibles para remodelar la microbiota intestinal (Hsu et al., 2019). Por este motivo, el presente estudio se enfoca en un posible complemento al tratamiento de la obesidad mediante el uso de los bacteriófagos, al evaluar el efecto de un coctel de bacteriófagos en la composición de la microbiota intestinal en un ambiente simulado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definición de obesidad

Según la Organización mundial de la salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial a la salud (OMS, 2021). Estas condiciones son el resultado de un balance energético positivo crónico (Westerterp-Plantenga, 2020) regulado por una interacción compleja entre los tejidos endocrinos y el sistema nervioso central (Bosy-Westphal y Müller, 2021). Además, afectan negativamente a casi todas las funciones fisiológicas del cuerpo y constituyen una importante amenaza para la salud pública (Chooi et al., 2019), aumentando sustancialmente el riesgo de desarrollar múltiples enfermedades como diabetes mellitus, enfermedad del hígado graso, hipertensión arterial sistémica, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular, demencia, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y varios tipos de cáncer (Blüher, 2019; Chrysant, 2019). Además, presentan un mayor riesgo de muerte y complicaciones graves por COVID-19 en comparación con los individuos normopeso (Geng et al., 2022). En consecuencia, la obesidad es la principal causa de morbilidad, mortalidad y gasto sanitario (Tiwari y Balasundaram, 2023).

2.2 Epidemiología mundial

La obesidad se ha convertido en uno de los mayores desafíos de salud global que enfrenta actualmente nuestra sociedad, comprendiendo lo que actualmente se considera una “epidemia” de patología no transmisible (Green et al., 2020). Según la OMS, a nivel mundial en el 2016, más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso u obesidad. Es decir, el 39 % de la población presentaba sobrepeso y el 13 % obesidad (más de 650 millones) (OMS, 2021). Para el 2020, la prevalencia fue de 2, 600 millones de personas (WorldObesity, 2023). La prevalencia mundial de la obesidad aproximadamente se ha triplicado desde 1975 (Cunningham et al., 2021). Las

tasas de obesidad han aumentado en todas las edades y en ambos sexos, independientemente de la localización geográfica, el origen étnico o el nivel socioeconómico (Chooi et al., 2019), aunque la prevalencia de la obesidad es generalmente mayor en mujeres y en adultos mayores de 40 años (Luli et al., 2023).

2.3 Epidemiología nacional

Según la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) en el 2018 a nivel nacional, el porcentaje de adultos mayores de 20 años que presentaron sobrepeso u obesidad fue de 75.2 % (39.1 % sobrepeso y 36.1 % obesidad) (Shamah-Levy et al., 2020). Para el 2021 la ENSANUT COVID-2019 menciona que la mayor prevalencia de sobrepeso se encontró en las siguientes regiones: Estado de México (38.7 %), CDMX (37.8 %) y Pacífico-Sur (37.8 %); mientras que la mayor prevalencia de obesidad se observó en Frontera (43.7 %) y Pacífico-Norte (39.2 %), región a la que pertenece el estado de Sinaloa (Shamah-Levy et al., 2022).

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la obesidad se define utilizando límites del índice de masa corporal (IMC) (Mehta et al., 2022). Además, apoyarse de otras herramientas de evaluación como el porcentaje de grasa corporal o visceral y la circunferencia de la cintura/cadera (Ross et al., 2020; Xu et al., 2021b), podrá reflejar un panorama más amplio del riesgo para la salud (Dhurandhar, 2022; Khanna et al., 2022b).

2.4.1 Índice de masa corporal

El IMC es una medida de grasa corporal basada en la altura y el peso (Mestre et al., 2023) y se define como la masa corporal (en kilogramos) dividida por el cuadrado de la altura corporal (en metros) y expresada en unidades de kg/m^2 (NHLBI, 2022). Este índice es utilizado en adultos, para clasificarlos dentro de un rango numérico (Mestre et al., 2023), en términos generales, en

las categorías de bajo peso, peso normal, sobrepeso y tres grados de obesidad (Khanna et al., 2022b). El IMC de un individuo es importante para determinar posibles problemas de salud futuros y se ha utilizado ampliamente como factor en la determinación de diversas políticas de salud pública (Zierle-Ghosh y Jan, 2023).

2.5 Etiología y fisiopatología

La obesidad presenta una etiología multifactorial que incluye influencias genéticas, ambientales, socioeconómicas, conductuales o psicológicas y disbiosis intestinal (**Figura 1**) (Aoun et al., 2020; Jukaku y Williams, 2021; Perreault y Rosenbaum, 2020).

Dentro de la fisiopatología de la obesidad (**Figura 1**), la dieta juega un papel importante, debido a que una dieta alta en grasas produce una acumulación de lípidos en el tejido adiposo subcutáneo y visceral (Israel et al., 2022). Debido a estos estímulos en el tejido adiposo, los adipocitos aumentan de tamaño al hipertrofiarse (Kumar et al., 2021), cuando la célula se satura con triglicéridos, ocurre la hiperplasia (Golden, 2020). Más células significan más capacidad de almacenamiento de lípidos (Dufau et al., 2021). Cuanto más se presentan estos cambios en el adipocito, aumentan las respuestas inflamatorias locales y sistémicas (Golden, 2020). Se produce un exceso de citocinas proinflamatorias (Aghili et al., 2021), moléculas de adhesión endotelial, mediadores proaterogénicos y quimiotácticos como: factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6, interleucina 1 beta, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1, progranulina, quemerina, proteínas quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), entre otros (Lu et al., 2021; Pugliese et al., 2022). Las MCP-1 secretada por los adipocitos, reclutan monocitos de la sangre periférica al tejido adiposo, donde se diferencian en macrófagos (Li et al., 2020) e interactúan con los adipocitos de forma paracrina (Dufau et al., 2021). Esta interacción establece una espiral viciosa en el tejido adiposo obeso y recluta persistentemente más y más macrófagos de la circulación (Yao et al.,

2022). En personas normopeso los macrófagos constituyendo entre el 5 al 10 % del número de células del tejido adiposo. Mientras que en personas que presentan obesidad se encuentra entre el 40 al 50 %, dependiendo del grado de obesidad (Khanna et al., 2022a). Hay dos tipos de macrófagos fenotípicos descritos que se han relacionado con la obesidad (Cai et al., 2022):

- M1 (activado clásicamente) tiene acción proinflamatoria (Liang et al., 2022). Se encuentra principalmente en el tejido adiposo de personas con obesidad. Este cambio se debe a que hay una transformación del fenotipo M2 al M1 (Lu et al., 2021).
- M2 (activado alternativamente) actúa como antiinflamatorio. Se encuentra en el tejido adiposo de personas normopeso (Wang et al., 2021).

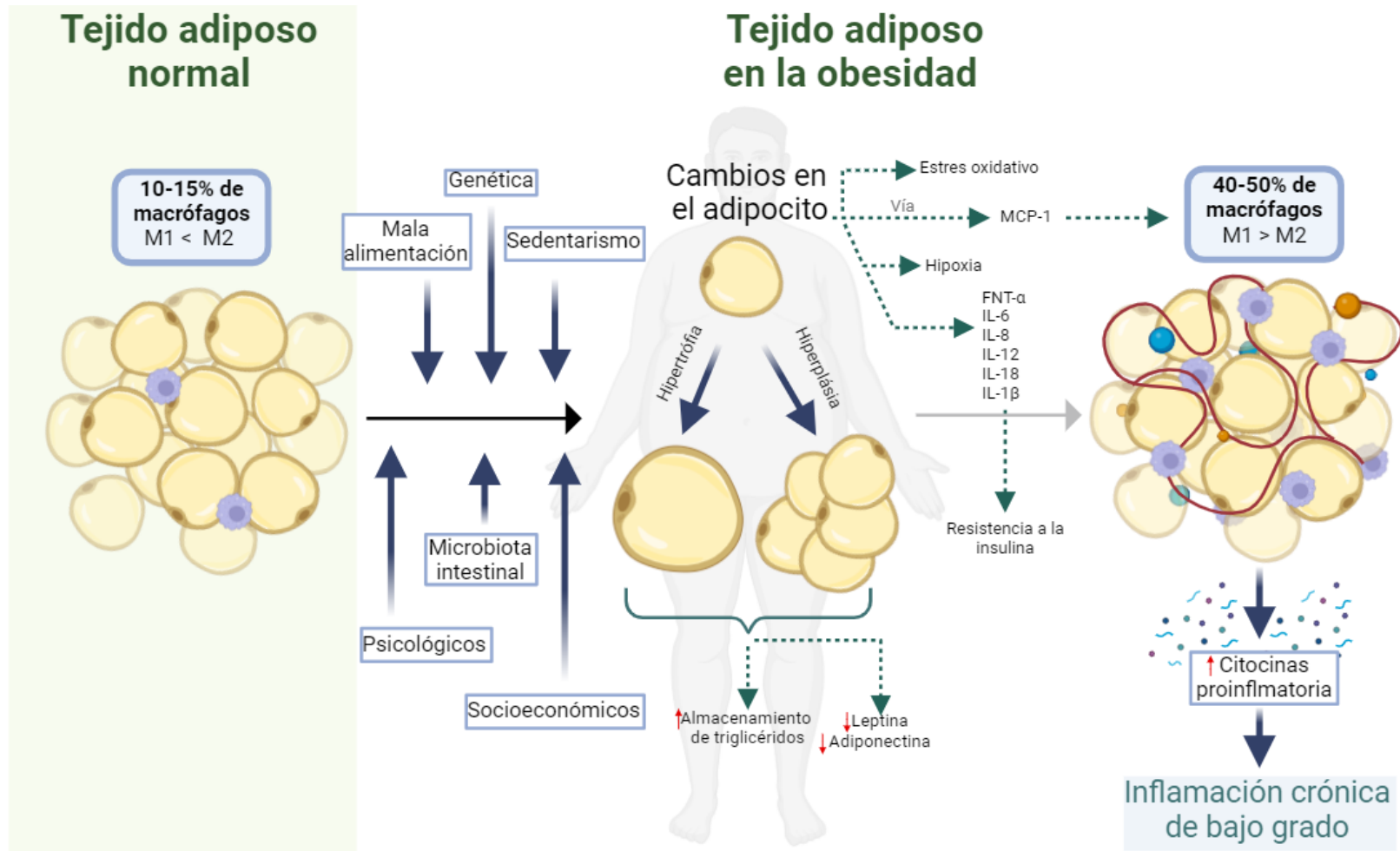


Figura 1. Etiología y fisiopatología de la obesidad. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; FNT- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleucina.

2.6 Microbiota intestinal

Algunos factores relacionados con la microbiota intestinal, pueden predisponer al desarrollo de la obesidad (Gruneck et al., 2020). La microbiota se define dentro de un marco ecológico como un conjunto colectivo de microorganismos comensales, simbióticos y potencialmente patógenos que existen en un espacio corporal específico u otro entorno ambiental (Berg et al., 2020; Díaz-Díaz et al., 2022). En el cuerpo humano, el tracto gastrointestinal es donde se presenta una mayor abundancia de microorganismos (Hou et al., 2022), específicamente en el intestino grueso o también conocido como colon (Gurung et al., 2020), debido a que en este órgano se presentan las condiciones idóneas para la proliferación, como el pH, temperatura, anaerobiosis, riqueza de nutrimentos y baja actividad enzimática (Anders et al., 2021; Dieterich et al., 2018).

La microbiota intestinal de cada persona es única (Senchukova, 2023), la diversidad de la microbiota aumenta en el tiempo entre la niñez y la edad adulta, disminuyendo en edades más avanzadas (más de 70 años) (Hou et al., 2022). Esta característica también se puede ver influenciada por la edad de gestación, el tipo de parto, las técnicas de lactancia, la duración del destete y el estilo de vida (Arslan et al., 2022). De manera general, la microbiota está compuesta por bacterias, arqueas, hongos, protozoarios y virus, denominados colectivamente como microbiota intestinal (AlAssal et al., 2018) (Cani y Van Hul, 2020). La microbiota intestinal alberga más de 100 millones de microorganismos y 150 veces más genes que el genoma humano (Asadi et al., 2022; Gomes et al., 2018).

Las bacterias representan el 90 % de la microbiota intestinal (Arslan et al., 2022), siendo la mayoría de metabolismo anaeróbico (Noor et al., 2023). Los filos más abundantes en la microbiota intestinal son: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinomycetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia y Proteobacteria

(Gill et al., 2022; Liu et al., 2021), entre los cuales dominan en un 90 % Firmicutes y Bacteroidetes (Morán-Ramos et al., 2022).

2.6.1 Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal puede responder dinámicamente a una gran variedad de señales fisiológicas internas y externas (Sarmiento-Andrade et al., 2022). Además, juega un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio del organismo (Valdes et al., 2018), contribuyendo activamente a la regulación de la digestión, la absorción de energía, la generación de metabolitos, la síntesis de vitaminas esenciales, la defensa contra microorganismos dañinos y la modulación del sistema inmunológico (AlAssal et al., 2018; Liu et al., 2021). Estos efectos se extienden más allá del tracto gastrointestinal, mediando una variedad de comunicaciones críticas entre el intestino, el sistema nervioso entérico y el cerebro (Green et al., 2020), influyendo así en el peso corporal al modular el metabolismo, el apetito, el metabolismo de los ácidos biliares, actividad hormonal e inflamación (Van Hul y Cani, 2023).

Una microbiota intestinal sana suele ser muy diversa (Manor et al., 2020) por el contrario, la relativa falta de diversidad en la microbiota intestinal conduce a enfermedades metabólicas como la obesidad (Liu et al., 2021).

2.6.2 Microbiota intestinal de personas con obesidad

Los microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal se han relacionado con diversas condiciones de salud y la aparición de enfermedades (Gruneck et al., 2020). Los casos elevados de sobrepeso y obesidad son cada vez más prevalentes en la población (Kanter Coronel, 2021) y específicamente en edades más jóvenes (Lister et al., 2023), incluidos casos de obesidad gestacional, que pueden estar influenciados por la microbiota intestinal (Sarmiento-Andrade et al., 2022).

Aunque aún no se comprende completamente la composición taxonómica exacta que caracteriza una microbiota intestinal "saludable"

(Green et al., 2020), la abundancia y diversidad de los microorganismos son fundamentales en su impacto sobre la obesidad (Cunningham et al., 2021; Kim et al., 2019). Las investigaciones sugieren que estos elementos están disminuidos en personas con obesidad en comparación con aquellas con normopeso (Liu et al., 2021). Además, los individuos con obesidad a menudo presentan una proporción elevada del filo Firmicutes y una proporción disminuida de Bacteroidetes (Crovesy et al., 2020). Es importante destacar que la composición de la microbiota intestinal varía según el grado de obesidad (Geng et al., 2022).

Ciertos microorganismos, como *Enterobacter cloacae*, tienen la capacidad de producir continuamente sustancias que estimulan una respuesta inmunológica (Noor et al., 2023), debido a que se presenta un aumento de la permeabilidad intestinal, permitiendo que estas sustancias entren en el torrente sanguíneo (Muscogiuri et al., 2019). Además, se produce una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta (You et al., 2022), lo que en conjunto influye a que se presente inflamación crónica de bajo grado y por lo tanto problemas metabólicos (Guo et al., 2022).

2.7 *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae es un bacilo, Gram negativo y anaerobio facultativo que pertenece a la familia de enterobacterias y al filo Proteobacterias (Hu et al., 2022). Esta ampliamente dispersa en el medio ambiente (agua y suelo) (Cao et al., 2020) y su reservorio endógeno más común es el tracto gastrointestinal humano (Davin-Regli et al., 2019).

Entre las más de veinte especies del género, *Enterobacter cloacae* destaca como el agente causal más frecuente de enfermedades humanas (Laupland et al., 2023) y es conocido como un patógeno oportunista (Merhi et al., 2023).

Esta bacteria posee potencial de resistencia a múltiples fármacos, atribuido a la β -lactamasa AmpC inducida cromosómicamente (Bennett et al., 2023) y a la adquisición de múltiples elementos genéticos móviles que contienen determinantes de resistencia (Hu et al., 2022). Se ha identificado que estos elementos móviles codifican a dos sistemas de secreción funcionales de tipo VI (T6SS), denominados T6SS-1 y T6SS-2 (Soria-Bustos et al., 2020). Estos sistemas son una nanomaquinaria de perforación molecular (Flaughnatti et al., 2021), permitiendo a las bacterias Gram negativas inhibir el crecimiento bacteriano, manipular las células huésped y absorber nutrientes (Unni et al., 2022). Depende de sistemas secretores funcionales, que translocan y secretan varias proteínas efectoras hacia el ambiente extracelular (Soria-Bustos et al., 2020).

El T6SS del filo Proteobacteria está compuesto por al menos 13 subunidades centrales, necesarias para su ensamblaje y función (Serapio-Palacios et al., 2022), que probablemente confiere distintas ventajas a las cepas de *Enterobacter cloacae* en interacciones competitivas con otras bacterias, facilitando su supervivencia en diversos nichos ecológicos (Mustafa et al., 2020). Además, presenta mecanismos patogénicos que están relacionados con diversos factores de virulencia, incluidas fimbrias, sideróforos, formación de biopelícula y liberación de LPS (Yu et al., 2023).

2.7.1 Lipopolisacáridos

Las bacterias Gram negativas presentan una estructura de doble membrana (Tang et al., 2021), donde tanto la lámina interna como la externa de la membrana interna están formadas por fosfolípidos (Breijyeh et al., 2020). El espacio periplásmico, situado entre la membrana interna y externa, alberga una capa delgada de peptidoglicano (Tang et al., 2021). La capa más externa está compuesta por LPS (**Figura 2**) (Clairfeuille et al., 2020).

Los LPS desempeñan un papel fundamental en la protección contra factores de estrés ambiental (Mazgaeen y Gurung, 2020), constituyen una eficaz barrera de permeabilidad a los compuestos antimicrobianos y una protección contra la lisis (Caroff y Novikov, 2020), además, participan en procesos de patogénesis y regulan la simbiosis con el hospedero (Di Lorenzo et al., 2022). Durante la división celular, estos compuestos se desprenden y se liberan al medio circundante (Gorman y Golovanov, 2022).

2.7.1.1 Estructura

Los LPS poseen una estructura arquitectónica que está conformada por tres partes (**Figura 2**):

1.- El lípido A actúa como un glicofosfolípido que ancla las moléculas de LPS a la membrana externa (Mazgaeen y Gurung, 2020). Este anclaje se debe a interacciones hidrofóbicas con las cadenas acilo de los fosfolípidos que constituyen la capa interna de la membrana (Caroff y Novikov, 2019).

2.- El núcleo se divide en componentes internos y externos. El primero está compuesto por ácido 3-desoxi-d-mano-octulosónico y el segundo por residuos de l-glicero-d-mano (Gorman y Golovanov, 2022).

3.- El antígeno de cadena O es un polisacárido, que consta de un número variable de unidades de oligosacáridos repetidas (1 a 10 residuos) (Jansson, 2020) . Se encuentra adherido al núcleo externo, por lo tanto, está expuesto a los factores ambientales. La clasificación de un LPS como liso o rugoso está determinada por la presencia o ausencia de esta estructura (Caroff y Novikov, 2019). El intercambio genético a través de la transferencia horizontal de genes puede reemplazar un serotipo de antígeno O por otro, involucrando parte o la totalidad del locus biosintético (Bertani y Ruiz, 2018).

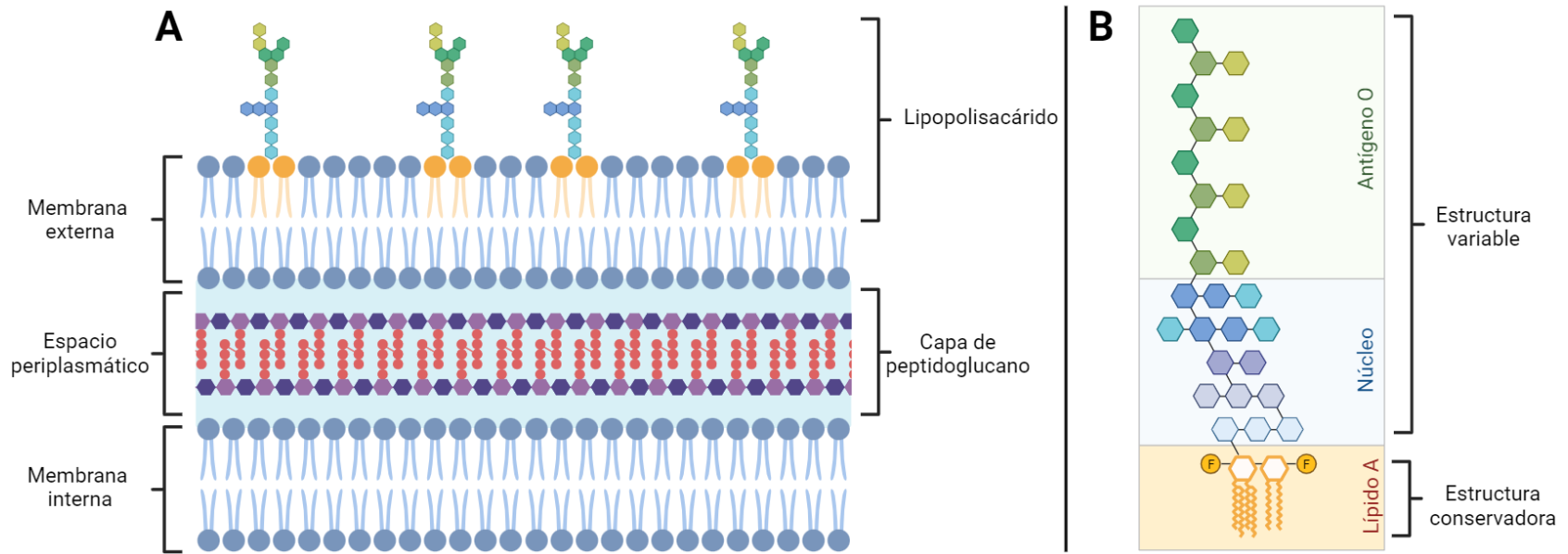


Figura 2. Arquitectura de la membrana plasmática de las bacterias Gram negativas. A) Representación de la envoltura de las células Gram negativas y sus componentes. B) Estructura general de los lipopolisacáridos.

2.7.1.2 Mecanismo de acción

Estudios en humanos han mostrado la presencia de niveles elevados de LPS en individuos con obesidad (Hegazy et al., 2020), por ello la endotoxemia metabólica se ha sugerido como un mecanismo potencial para dilucidar la correlación significativa entre la obesidad y la inflamación (Jobe et al., 2022).

Las personas con obesidad por lo general llevan una dieta rica en grasas (Spinelli y Monteleone, 2021), lo que influye en un aumento de la permeabilidad intestinal (Du et al., 2022). Además, los LPS alteran las proteínas de unión estrecha del epitelio intestinal (Song et al., 2023), lo que permite el transporte desde la luz del tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo (Loeser et al., 2022). Ahí, los LPS se unen a la proteína de unión al lipopolisacárido, que posteriormente cataliza la transferencia de los LPS al receptor CD14, presente en la membrana de células inmunitarias (Taghizad y Kazerani, 2021). El CD14 lo transfiere al MD2 (una proteína no anclada), que interactúa con el receptor tipo Toll-4 (Liu et al., 2021). De tal forma que, los LPS se unen al complejo receptor CD14/TLR4/MD2 (Farhana y Khan, 2023), presente en muchos tipos de células inmunitarias como: células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos B, las cuales reconocen una variedad de estímulos (Mansour et al., 2021; Mohammad y Thiemermann, 2021). Este mecanismo se presenta en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado (Li et al., 2019).

La respuesta posterior depende del tipo de célula a la que están unidos los LPS (Farhana y Khan, 2023). De manera general se producen numerosas citocinas proinflamatorias (Mohammad y Thiemermann, 2021) y por lo tanto inflamación crónica de bajo grado (Du et al., 2022). Estas citocinas pueden actuar sobre los adipocitos y estimularlos para que secreten más citocinas y quimiocinas de forma autocrina y paracrina (Cheng et al., 2022b). La endotoxemia metabólica también aumenta la hiperplasia de los adipocitos en

el tejido adiposo en una vía dependiente de CD14 (Gomes et al., 2018). Estas vías inflamatorias contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina mediante la alteración de la señalización del receptor de insulina (**Figura 3**) (Song et al., 2023).

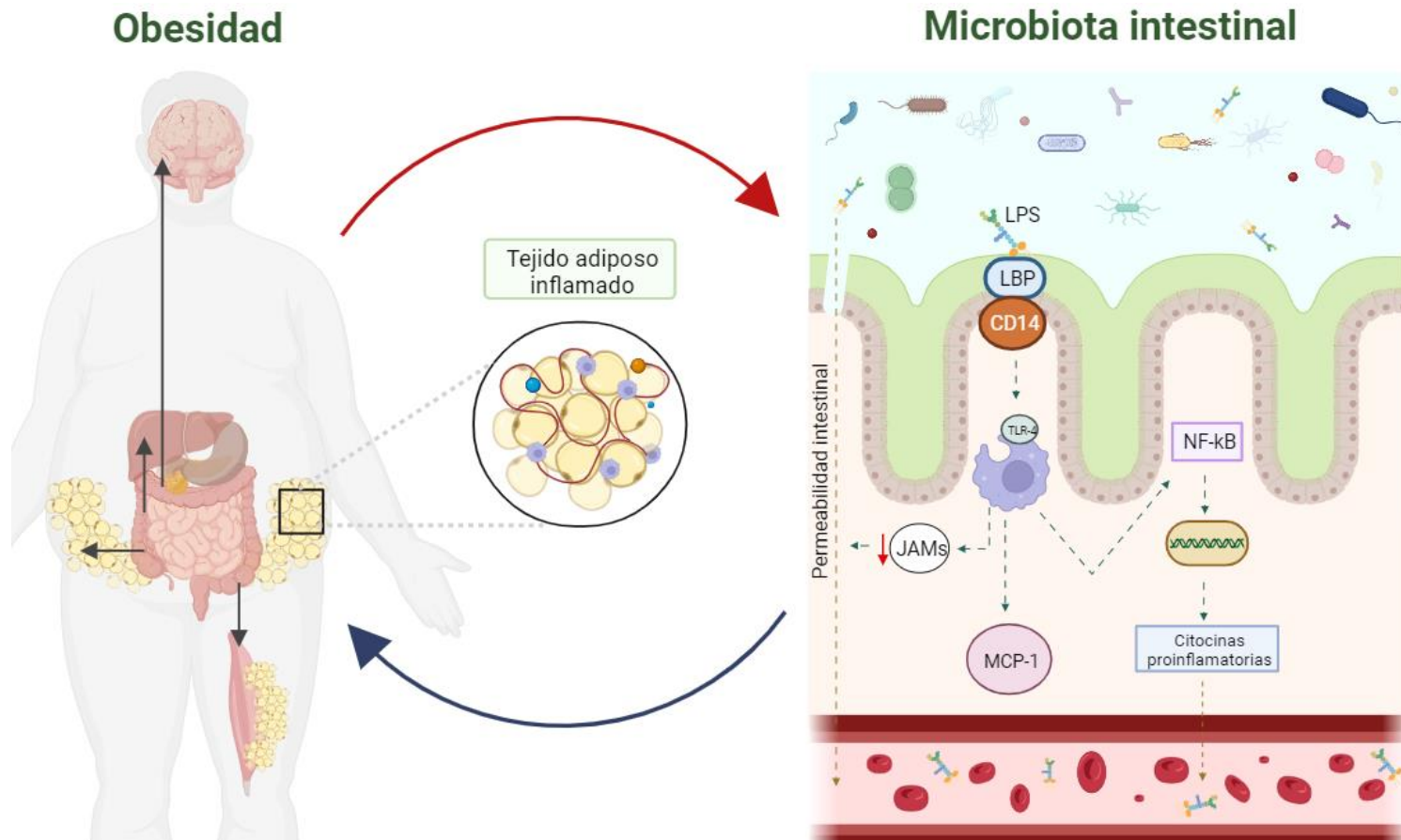


Figura 3. Relación entre la microbiota intestinal y la obesidad. LPS: lipopolisacárido. LBP: proteína de unión al lipopolisacárido. TLR4: receptor tipo Toll 4. NF-kB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1. JAMs: moléculas de adhesión intercelular.

2.8 Terapia de la obesidad

Cada vez más personas intentan perder peso y más del 40 % a nivel mundial se encuentra en búsqueda de estrategias (AbdelMassih et al., 2023), que van desde la moderación de la dieta y el ejercicio hasta procedimientos más invasivos (Gossmann et al., 2021). El control y la pérdida de peso son objetivos fundamentales en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad (Perdomo et al., 2023). Para lograrlo, son necesarios ajustes en los componentes de la dieta y una reducción en la ingesta calórica (Cornier, 2022). Sin embargo, también se requiere un tratamiento multidisciplinario que varía según la fase de la enfermedad (Bischoff y Schweinlin, 2020).

Enfocándonos en la microbiota intestinal, es crucial identificar moduladores de la disbiosis intestinal que se presenta en la obesidad (Dixit et al., 2021). Este conocimiento ofrece un nuevo enfoque para el tratamiento de las alteraciones metabólicas (Sarmiento-Andrade et al., 2022), debido a que estas bioterapias crean un ambiente intestinal saludable al equilibrar las poblaciones bacterianas y promueven una acción metabólica favorable.

2.8.1 Dieta

La dieta es el principal factor que influye en la composición de la microbiota intestinal (Geng et al., 2022), es decir, de acuerdo con la variación en los componentes de la dieta se definen los tipos de microorganismos que la componen (Gruneck et al., 2020).

2.8.2 Probióticos

Los probióticos implican la entrega directa de células bacterianas vivas al huésped, ya sea en forma de encapsulación artificial o productos alimenticios fermentados (Stavropoulou y Bezirtzoglou, 2020). Estos microorganismos producen bacteriocinas, los cuales son péptidos antimicrobianos que inhiben o eliminan a bacterias patógenas en el intestino y cambian la composición de la microbiota intestinal (Anjana y Tiwari, 2022).

2.8.3 Prebióticos

Los prebióticos dietéticos generalmente se han clasificado como fibra que pasa sin digerir a través del tracto gastrointestinal y estimula el crecimiento de microorganismos benéficos (Kim et al., 2019). Entre las ventajas de los prebióticos se encuentran la promoción de la absorción de iones y oligoelementos como el calcio, hierro y magnesio y la regulación del sistema inmunológico (Kim et al., 2019). Además, al modular el pH intestinal, crean un entorno bactericida para supuestos enteropatógenos (Green et al., 2020).

2.8.4 Trasplante de microbiota fecal

Estos procedimientos implican la transferencia de materia fecal de donantes sanos a pacientes obesos (Gruneck et al., 2020). Se emplean varios métodos de administración, como: vía oral con encapsulados y vía rectal mediante colonoscopia (Gill et al., 2022). Se ha demostrado que reduce transitoriamente la resistencia a la insulina periférica (Wang et al., 2020), entre otros parámetros metabólicos como: colesterol total, hemoglobina glucosilada y glucosa plasmática (Yu et al., 2020).

2.8.5 Bacteriófagos

No todos los virus son patógenos para las células humanas (Nikolich y Filippov, 2020b). Existe una categoría de virus, conocidos como bacteriófagos que infectan y parasitan únicamente a las bacterias (huéspedes naturales) (Brives y Pourraz, 2020), por lo que se les considera reguladores en las poblaciones bacterianas (Reina y Reina, 2018). Estos virus tienen como característica el ser muy específicos con respecto a sus huéspedes y por lo general, solo infectan una única especie bacteriana o incluso cepas específicas dentro de una especie (Simmonds y Aiewsakun, 2018a) y de esta forma preservan las bacterias comensales o mutualistas que componen la microbiota, cuyo papel en la salud humana apenas estamos empezando a comprender (Brives y Pourraz, 2020). Además, se les atribuye el prevenir la

formación de biopelículas, las cuales son comunidades de microorganismos infiltrados en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a un sustrato inerte o tejido vivo. Estas biopelículas están conformadas principalmente por bacterias (Chegini et al., 2021; Moreno et al., 2022).

Los bacteriófagos están propagados en el medio ambiente y son reconocidos como el agente biológico más abundante en la tierra. Son diversos en tamaño, morfología y organización genómica (Kasman LM, 2023), se pueden clasificar de acuerdo a su tipo de material genético, estructura (**Figura 4**), ciclo de vida (lítico o lisogénico) y hospedero bacteriano (Nir-Paz y Kuijper, 2023). Se han utilizado ampliamente en biotecnología y su estudio ha aportado conceptos fundamentales en biología molecular Mehmood Khan et al. (2023). Desde un punto de vista clínico, los bacteriófagos parecen ser inocuos para los humanos y se presenta una larga historia de su uso como agentes terapéuticos en la presencia de enfermedades (Sulakvelidze et al., 2001).

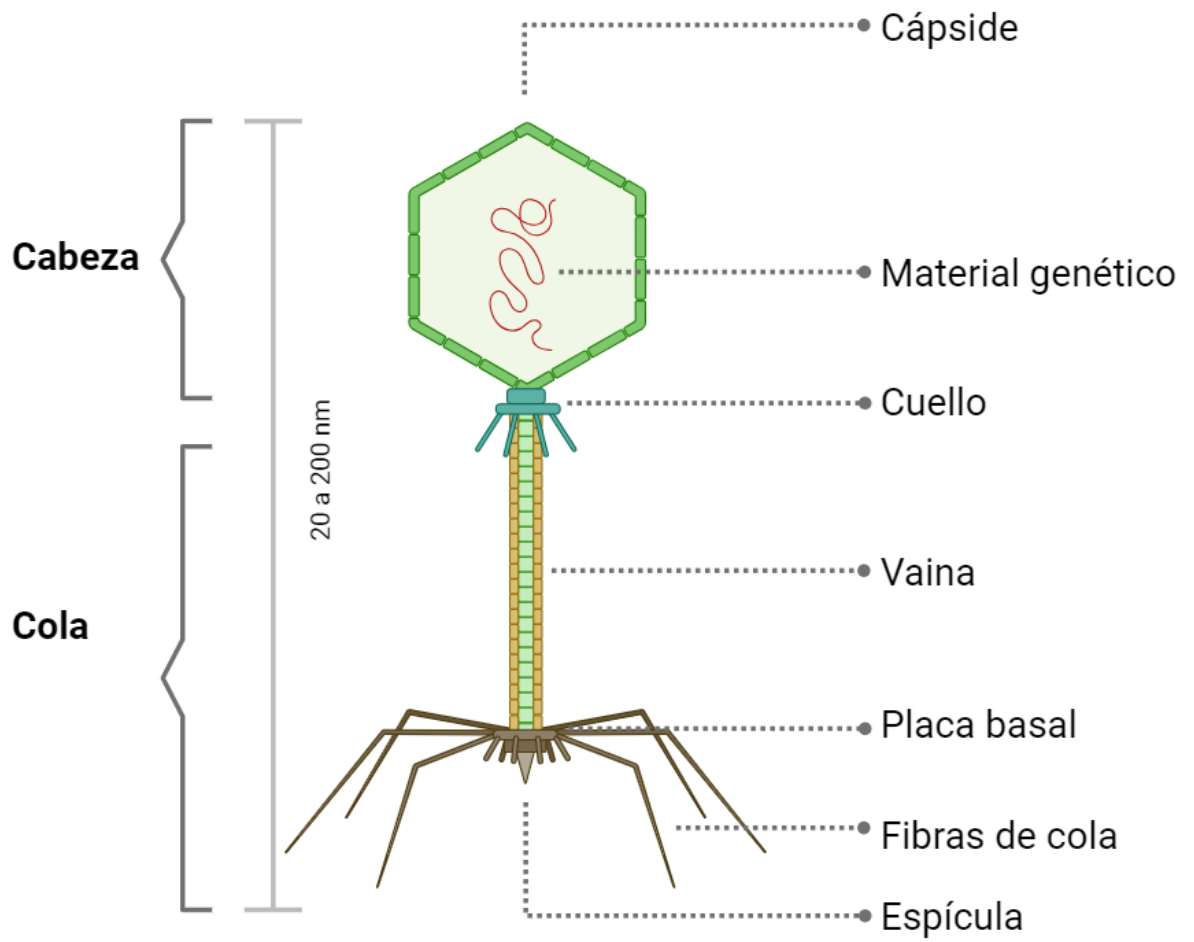


Figura 4. Estructura general de un bacteriófago.

2.9 Fagoterapia

Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1917, siendo una perspectiva prometedora en la salud humana (Reina y Reina, 2018). Es decir, la terapia con bacteriófagos o fagoterapia se propuso hace más de 100 años, antes del descubrimiento de los antibióticos por Fleming en 1928 (Forti et al., 2018), tras una expansión mundial y el éxito de los antibióticos, el uso de la fagoterapia decayó (Forti et al., 2018). Sin embargo, a medida que la resistencia a los antibióticos ha aumentado en los últimos años, el interés en los bacteriófagos ha vuelto, particularmente después de una serie de tratamientos que pudieron disminuir a cepas severamente resistentes a los antibióticos (Mertz, 2022).

Actualmente la fagoterapia es una estrategia prometedora respaldada por hallazgos de los tratamientos exitosos recientes en Europa y Estados Unidos (Forti et al., 2018). La selección, preparación y administración de bacteriófagos, suele ser compleja para el desarrollo de una terapia (van der Meer y Vandenbroucke-Grauls, 2018). Para sus aplicaciones, se prefieren que los bacteriófagos sean de la clase *Caudoviricetes*, estos son los virus más abundantes en la naturaleza (Mehmood Khan et al., 2023).

La fagoterapia se puede dividir en dos categorías: terapia monofágica y polifágica (Chegini et al., 2021). Se seleccionan bacteriófagos individuales o se combinan dos o más para la formulación de cocteles que suelen tener una respuesta más eficaz para interferir en infecciones bacterianas (Nikolich y Filippov, 2020a). El uso de estas mezclas va dirigida a varios receptores, disminuyendo la probabilidad de la aparición de mutantes bacterianos resistentes a fagos (Pinto et al., 2020). Las pautas por seguir en el desarrollo terapéutico se describen en la **Figura 5** (Nikolich y Filippov, 2020a).

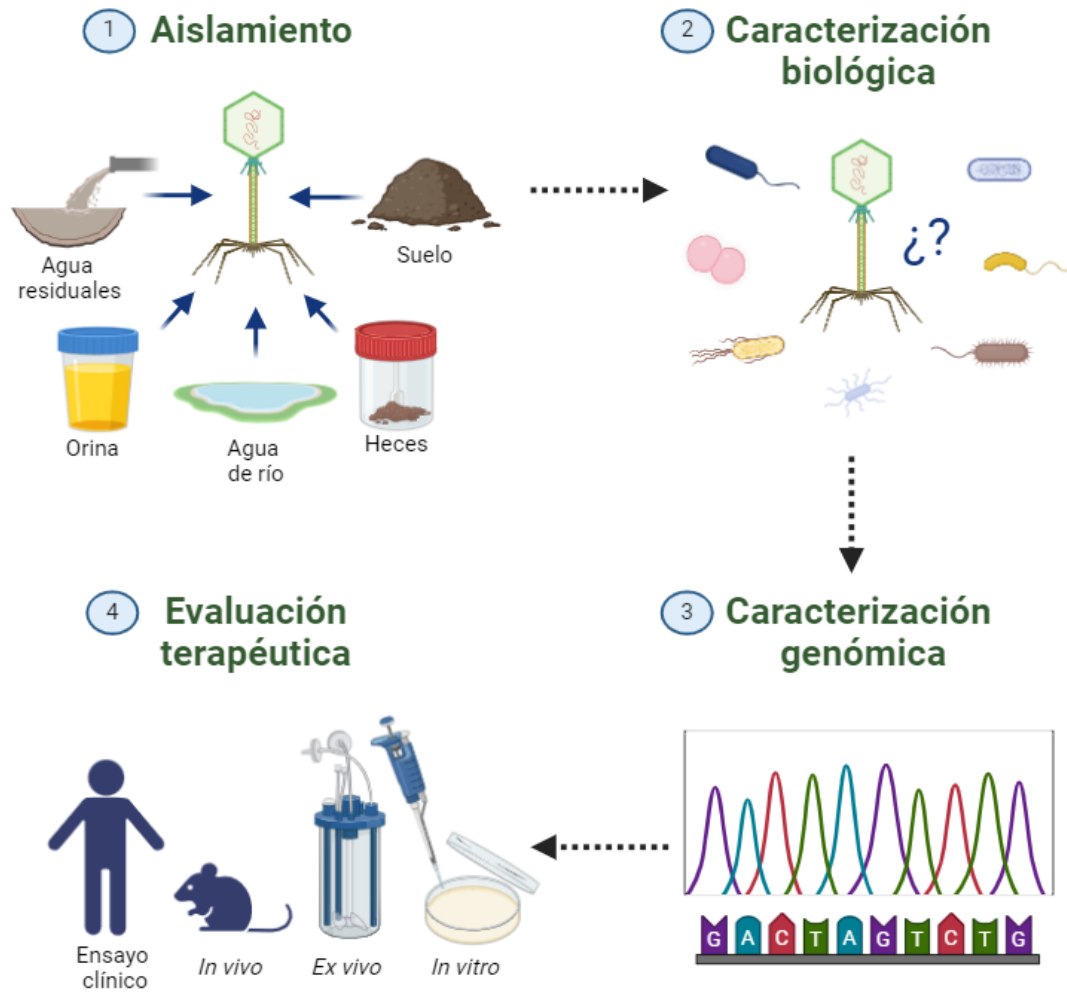


Figura 5. Pautas por seguir en el desarrollo terapéutico de la fagoterapia.

Factores adversos como la temperatura, la salinidad, el pH, la luz ultravioleta y las condiciones gastrointestinales afectan la viabilidad y el almacenamiento de los bacteriófagos almacenados (Ramirez et al., 2018).

La superación de las variaciones fenotípicas se puede resolver combinando diferentes bacteriófagos en un coctel (Yang et al., 2020). Este enfoque permite una gama más amplia de preparaciones específicas de cepas y disminuye la aparición de mutantes bacterianos resistentes. Además, conduce a una reducción más rápida del número de bacterias en comparación con la de las preparaciones de bacteriófagos individuales (Pinto et al., 2020)

2.9.1 Ciclo de vida

Los bacteriófagos abarcan dos estados principales: un estado lítico (virulento), caracterizado por la producción de viriones que lisan al huésped (Venturini et al., 2022) o un estado lisogénico (templado) en el que sólo se replica el ácido nucleico del bacteriófago pero no se forman nuevos viriones (Nir-Paz y Kuijper, 2023).

Como primer paso en el proceso de infección, los bacteriófagos como los demás virus se unirán a un receptor de la célula hospedero. Se conocen dos posibles ciclos biológicos de los fagos: A) lítico y B) lisogénico (**Figura 6**).

A) En un ciclo de replicación lítica, un bacteriófago entrega su material genético al citoplasma del huésped y aprovecha los ribosomas para producir sus propias proteínas. Los recursos de la célula huésped se reutilizan rápidamente para fabricar genomas virales y proteínas de la cápside, que luego se combinan para formar numerosos duplicados del bacteriófago inicial. A medida que la célula huésped sucumbe, sufre una síntesis activa o pasiva, liberando los bacteriófagos recién formados para iniciar la infección en otra célula huésped.

B) En el ciclo de replicación lisogénica, el bacteriófago entrega su material genético al citoplasma de la célula huésped. Sin embargo, en este

escenario, el genoma del bacteriófago sufre uno de dos destinos: o se integra en el cromosoma de la célula bacteriana o permanece como un elemento episomal. En ambos casos, el genoma del bacteriófago se duplica y se transmite a la descendencia de la célula bacteriana sin provocar su desaparición. Estos genomas de bacteriófagos integrados se denominan profagos y las bacterias que los albergan se denominan lisógenos (Kasman LM, 2023; Reina y Reina, 2018).

En el contexto del uso terapéutico sólo son relevantes los bacteriófagos virulentos, es decir, los que solo realicen ciclos líticos (Brives y Pourraz, 2020).

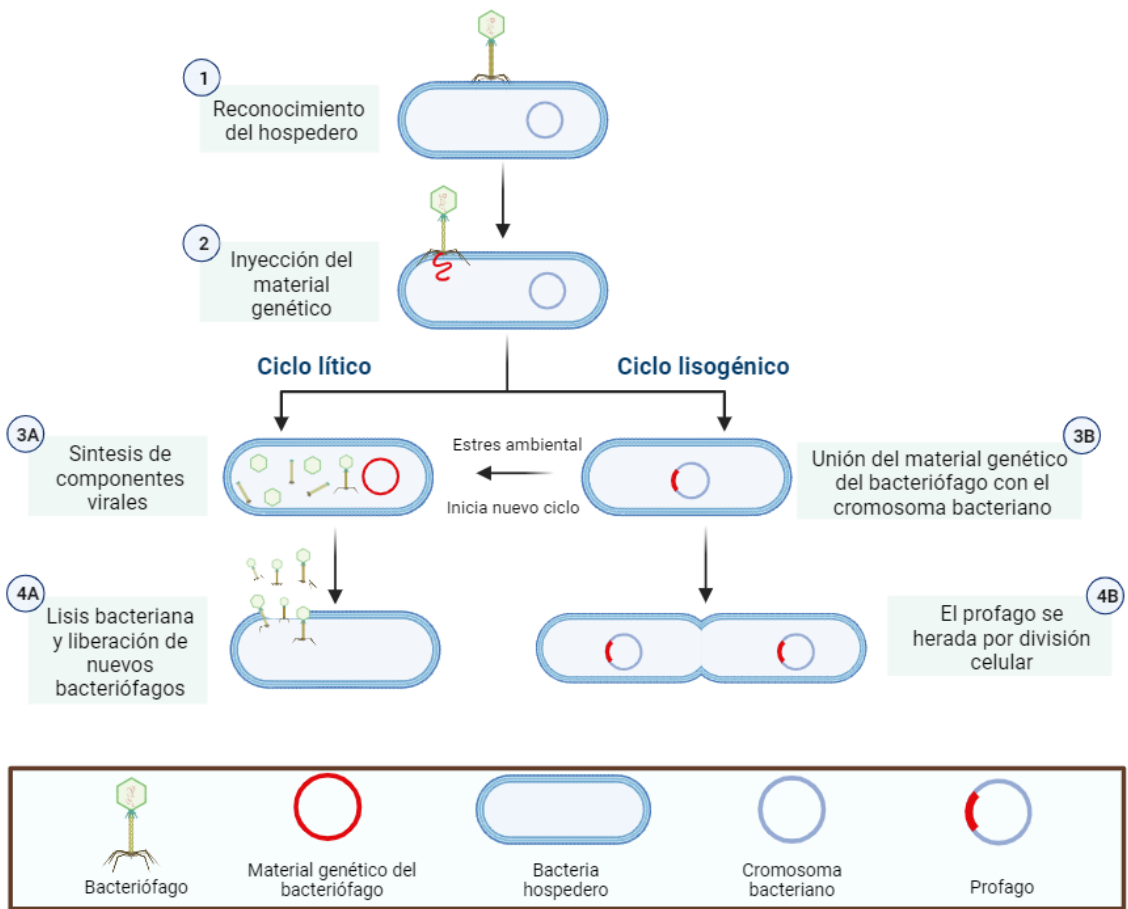


Figura 6. Ciclo de vida del bacteriófago. A) Ciclo lítico. B) Ciclo lisogénico.

2.9.2 Aislamiento

Los bacteriófagos terapéuticos candidatos deben ser del medio ambiente (no manipulados genéticamente) y pueden aislarse de diversos entornos, como agua de río, aguas residuales, suelo o rizosferas, así como de muestras clínicas, incluidas muestras de pacientes (pus, orina, heces y fluidos corporales) (Merabishvili et al., 2018). Como regla general para el aislamiento y selección de nuevos bacteriófagos, se deben utilizar al menos 10 a 15 cepas bacterianas, que se diferencian por diversas características (Merabishvili et al., 2018).

Una estrategia es aislar el agente causante de la infección bacteriana y posteriormente identificar *in vitro* uno o más bacteriófagos que lisan a esa(s) cepa(s) (Forti et al., 2018). Los bacteriófagos se aíslan principalmente mediante métodos basados en cultivos, que tienen algunas limitaciones y pueden favorecer con propiedades de infección específicas, como un período de latencia corto, una temperatura o pH óptimos particulares para la replicación (Unterer et al., 2023).

2.9.3 Actividad biológica

La terapia con bacteriófagos emerge como una atractiva estrategia antibacteriana que emplea a estos virus para inhibir o eliminar bacterias perjudiciales (Du et al., 2023). Estos bacteriófagos muestran una notable capacidad bacteriolítica al incrementar su autorreproducción, manteniendo cambios mínimos en la microbiota natural (Ling et al., 2022).

2.9.3.1 Rango de hospederos

La actividad biológica del bacteriófago se puede evaluar con el rango de hospederos, que por definición es un repertorio de especies y cepas bacterianas que pueden favorecer la multiplicación de un virus determinado (Letarov y Kulikov, 2018). Idealmente, los bacteriófagos terapéuticos candidatos deberían tener la gama de huéspedes más amplia posible contra

las especies o cepas de bacterias objetivo. Este umbral variable que depende de la estructura y especie bacteriana (Merabishvili et al., 2018), permitirá el reconocimiento de los bacteriófagos a los receptores de la superficie de las células bacterianas; como receptores primarios en Gram positivas encontramos exopolisacárido, peptidoglicano o ácidos teicoicos y en diana Gram negativa LPS principalmente (Nir-Paz y Kuijper, 2023).

Los cocteles de bacteriófagos en particular presentan una opción viable para ampliar la gama de hospederos, limitando la aparición de resistencia bacteriana y manteniendo al mismo tiempo la actividad lítica (Kering et al., 2019). En particular, la prueba spot brinda información sobre la biología de la interacción bacteriófago-huésped, permitiendo observar los efectos de las entidades biológicas de interés (Letarov y Kulikov, 2018).

2.9.3.2 Multiplicidad de infección

La multiplicidad de infección (MOI) representa la relación entre el número de partículas virales y el número de células hospederas en un medio de infección determinado. Un valor de MOI de 1 implica que, en promedio, hay una única célula hospedera para una sola partícula de bacteriófago (Sinha et al., 2018). En particular, se necesitan menos dosis de bacteriófagos porque la cantidad de bacteriófagos aumenta en el sitio de la infección debido a su proliferación en el hospedero bacteriano (Mehmood Khan et al., 2023). El emparejamiento altamente específico virus-hospedero es fundamental para la dinámica de la población microbiana y está profundamente conectado con las condiciones ambientales y los nichos ecológicos (Venturini et al., 2022).

La eficacia de la terapia con bacteriófagos depende en gran medida de la dosis utilizada, la relación entre las concentraciones de bacteriófagos y bacterias o la multiplicidad de la infección, en el sitio objetivo (Yan et al., 2021). En términos prácticos, en lugar de esforzarnos por lograr una MOI específica

en nuestra dosificación, el enfoque debería de estar en mantener las densidades de bacteriófagos (Dąbrowska y Abedon, 2019).

2.9.4 Genoma

Para impedir cualquier tipo de intercambio genético, los bacteriófagos terapéuticos deben ser estrictamente líticos no transductores. Sus genomas no deberían codificar ningún gen que confiera lisogenia como integrasas, transposasas o represores. La capacidad de transducción generalizada en bacteriófagos líticos depende de la organización del empaquetado del Ácido desoxirribonucleico (ADN) (Chegini et al., 2021). Debido a que los bacteriófagos en estado lisogénico pueden transmitir genes de resistencia a los antibióticos a su hospedero (Mehmood Khan et al., 2023).

2.9.5 Evaluación de la eficacia terapéutica

La comprensión del efecto utilizando modelos ayuda enormemente a desarrollar sistemas de administración con características óptimas (Berryhill et al., 2021). Se utilizan varias técnicas y modelos para detectar y predecir su efecto en diferentes etapas de desarrollo, incluidas metodologías *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Xu et al., 2021a).

2.10 Sistema Intestinal Automático y Robótico

Este modelo *ex vivo* del tracto gastrointestinal consta de cinco biorreactores, que actúan como sistemas modelo que permiten recrear y controlar el microambiente celular general (Ahmed et al., 2019). Además, contribuyen a establecer nuevos objetivos terapéuticos (Selden y Fuller, 2018) y probar nuevos tratamientos potenciales en un entorno más realista que el cultivo convencional *in vitro* (Brives y Pourraz, 2020).

Estos biorreactores simulan secuencialmente el estómago, intestino delgado y las 3 regiones del intestino grueso (**Figura 7**) (García-Gamboa et al., 2020), lugar donde se inocular la microbiota intestinal humana,

reproduciendo las condiciones fisiológicas de los sujetos objetivo. Se respetan los parámetros relevantes *in vivo* como la morfología del tracto gastrointestinal, tiempos de residencia, rangos de secreción y composición de los jugos digestivos y biliares, perfiles de pH y composición de microbiota, entre otros. Estos parámetros pueden variar entre individuos adultos y jóvenes, así como en personas con padecimientos metabólicos.

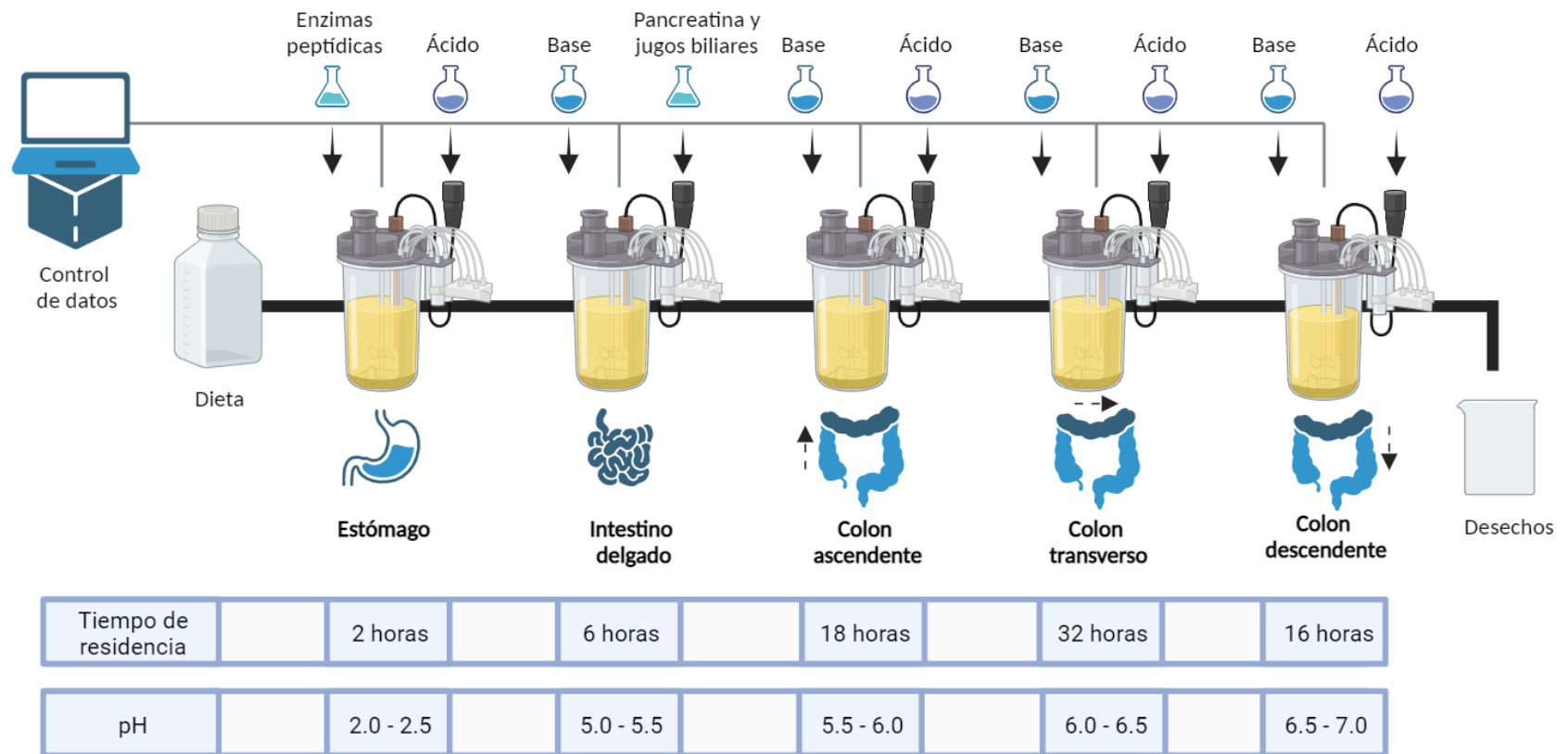


Figura 7. Representación esquemática del simulador del tracto gastrointestinal humano (ARIS). ARIS: Automatic Robotic Intestinal System; Reactor 1: estómago; Reactor 2: intestino delgado; Los reactores 3, 4 y 5 representan el colon ascendente (CA), colon transversal (CT) y colon descendente (CD), respectivamente.

Cada sección del tracto gastrointestinal contiene diferentes composiciones y cantidades de bacterias por gramo de contenido (Geng et al., 2022). La cantidad de bacterias aumenta desde la porción proximal a la distal. En particular, el intestino grueso contiene más del 70 % de todos los microorganismos del cuerpo (Gomes et al., 2018). Para conocer la modulación producida por el compuesto a evaluar en la microbiota intestinal de un modelo *ex vivo*, es necesario utilizar técnicas de secuenciación del ADN bacteriano (AlAssal et al., 2018).

2.11 Gen ARNr 16s

Los cambios informados a nivel de filo no capturan completamente los cambios de composición en la microbiota intestinal asociados con la obesidad (Gruneck et al., 2020). Por lo tanto, es necesario identificar las bacterias clave en niveles taxonómicos inferiores como: familia, género y especie (Wang et al., 2023). Actualmente, técnicas avanzadas de secuenciación del ADN bacteriano y herramientas bioinformáticas han contribuido a identificar comunidades bacterianas en diversos órdenes (AlAssal et al., 2018). La secuenciación ha demostrado que el mayor porcentaje de la diversidad microbiana en un ecosistema sigue siendo incultivable o aún no cultivable (Kamble et al., 2020). Esto ha llevado a un número increíble de afirmaciones de causalidad relacionadas con la microbiota en la aparición y el desarrollo de enfermedades Cani y Van Hul (2020).

El gen ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16s de 1500 pb (pares de bases) comprende nueve regiones variables, que van de la V1 a la V9, intercaladas a lo largo de la secuencia altamente conservada (Johnson et al., 2019). Para la identificación bacteriana, el gen ARNr 16s se amplifica primero mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se hibridan con regiones conservadas y luego se secuencia. Los datos de secuenciación se someten a análisis bioinformáticos en los que las regiones

variables se utilizan para discriminar entre taxones bacterianos (Matsuo et al., 2021).

Entender los diversos enfoques para describir la composición y la diversidad, así como documentar sus efectos en la salud y el equilibrio de los ecosistemas, es crucial en el ámbito de la ecología (Willis, 2019). La abundancia relativa en la secuenciación de bacterias ofrece una visión de la estructura y composición de la comunidad bacteriana en el área bajo estudio (Kalnina et al., 2023). En cuanto a la diversidad alfa, esta refleja la cantidad observada (número de taxones) y la uniformidad (abundancia relativa de dichos taxones) en una muestra promedio dentro de un tipo específico de hábitat (Walters y Martiny, 2020). Para interpretarla, se aplican índices de diversidad como Chao1, Shannon o Simpson. Por otro lado, la diversidad beta mide la variabilidad en la composición de la comunidad (identidad de los taxones observados) entre diferentes muestras dentro del mismo hábitat (Marathe et al., 2021). En el análisis de diversidad beta, se emplean diversos índices como Jaccard, Bray-Curtis, Morisita-Horn y Sorenson, lo que resulta en la generación de una matriz de distancias, a partir de la cual se realiza la interpretación de los datos (Chakraborty et al., 2022).

3. HIPOTESIS

El coctel de bacteriófagos disminuirá la abundancia relativa de *Enterobacter cloacae*, en la microbiota intestinal estandarizada de personas con obesidad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un coctel de bacteriófagos contra *Enterobacter cloacae* en la microbiota intestinal estandarizada de personas con obesidad utilizando un modelo *ex vivo*.

4.2 Objetivos específicos

1. Formular un coctel de bacteriófagos con actividad lítica contra *Enterobacter cloacae*.
2. Evaluar la composición bacteriana de la microbiota intestinal estandarizada de donantes con obesidad.
3. Evaluar el efecto de un coctel de bacteriófagos en la composición de la microbiota intestinal estandarizada, en un modelo *ex vivo*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Es un estudio experimental, prospectivo con enfoque longitudinal.

5.2 Diseño del estudio

En este estudio, se implementó un enfoque que involucra la utilización de un coctel de bacteriófagos como tratamiento. La formulación de este coctel se basó en un análisis exhaustivo de su genoma, con el objetivo primordial de confirmar su carácter estrictamente lítico y asegurarse de que no presentaran genes vinculados a virulencia o resistencia a antibióticos. Además, se procedió a la evaluación de su actividad biológica, comprendiendo su rango de hospederos y la cinética de lisis en relación con su bacteria hospedera, en este caso *Enterobacter cloacae*. La evaluación del potencial lítico de este coctel se llevó a cabo a través de pruebas específicas que confrontaron bacterias asociadas con la obesidad, en un escenario que simula la microbiota intestinal en un modelo *ex vivo* (**Figura 8**). Los bacteriófagos utilizados para la formulación del coctel fueron aislados y caracterizados en el Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad Culiacán, Sinaloa.

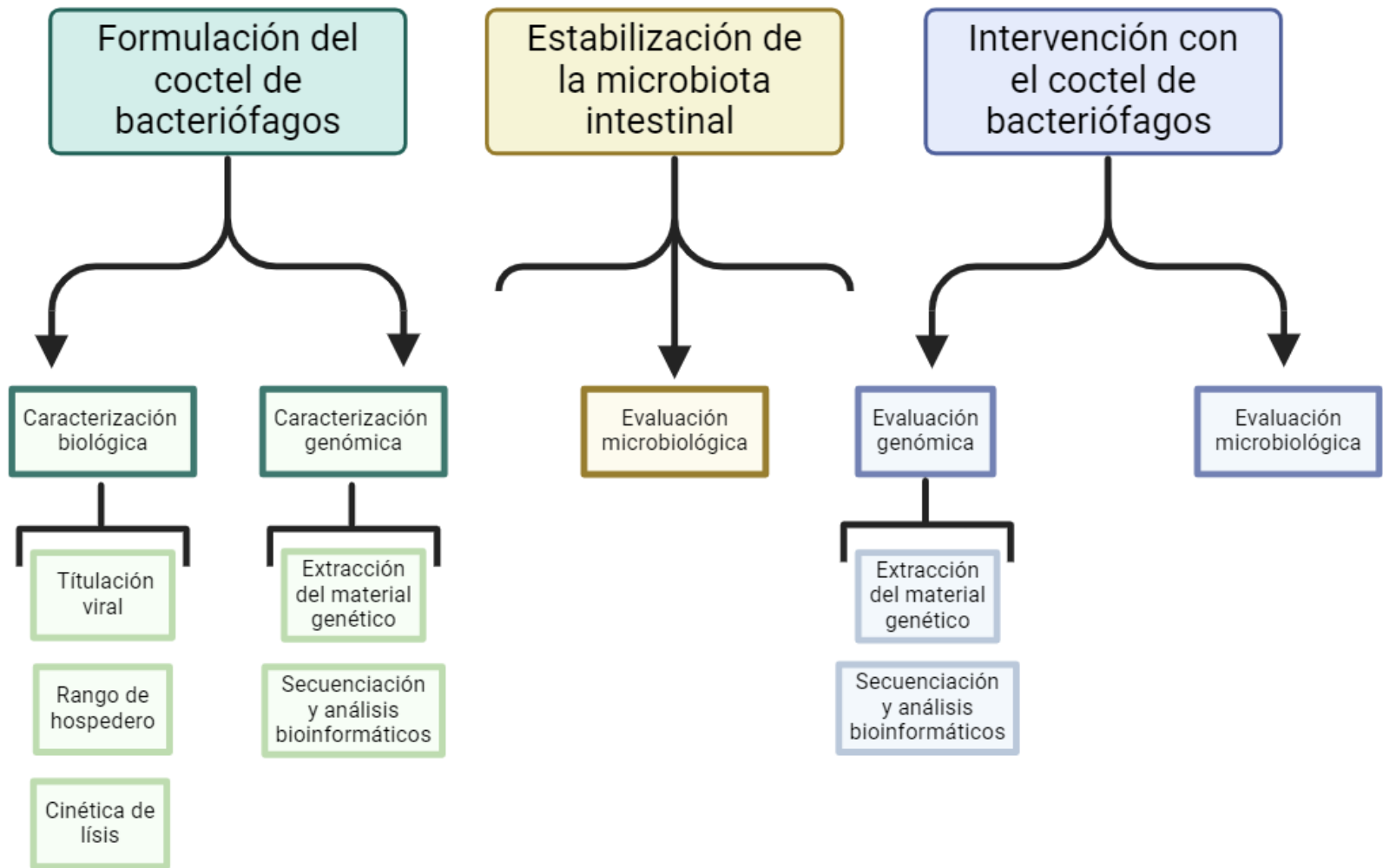


Figura 8. Flujo de trabajo.

Los experimentos *ex vivo* se realizaron utilizando un inóculo fecal, el cual fue proporcionado por la Dra. Marisela González Ávila, encargada del laboratorio *ex vivo*, del departamento de biotecnología médica y farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), unidad Guadalajara. Este inóculo fecal se originó a partir de muestras fecales obtenidas de 32 voluntarios, compuesto por 13 hombres y 19 mujeres con edades que oscilaron entre 22 y 64 años. Con el objetivo de preservar la integridad de la microbiota original, se garantizó que ninguno de los participantes tuviera historial de tratamiento antibiótico durante los 6 meses previos al estudio ni en el momento de la obtención de la muestra. Se instruyó a los participantes abstenerse de consumir alimentos fermentados durante la semana previa a la recolección de la muestra.

La clasificación de los participantes se llevó a cabo siguiendo los puntos de corte propuestos por la OMS, con base en el índice de masa corporal (IMC) de cada individuo (**Tabla 1**). Los resultados indicaron un IMC promedio de $32.6 \pm 2.9 \text{ kg/m}^2$ para la población estudiada, lo cual proporciona un contexto relevante para la evaluación de la microbiota intestinal y la interacción con el coctel de bacteriófagos.

Tabla 1. Clasificación del IMC según la OMS

Categoría	Punto de corte (kg/m²)
Bajo peso	< 18.5
Normopeso	18.5 – 24.9
Sobrepeso	25 – 29.9
Obesidad de clase I	30 – 34.9
Obesidad de clase II	35 – 39.9
Obesidad de clase III	≥ 40.0

Fuente: OMS (2021).

El estudio se estructuró en torno a la evaluación de 2 grupos, cada uno abordado a través de un conjunto de tres biorreactores. Estos biorreactores representaron el colon ascendente (CA), colon transversal (CT) y colon descendente (CD), respectivamente. La experimentación se enfocó en la interacción de la microbiota intestinal en cada una de las regiones del intestino grueso, bajo condiciones específicas de tratamiento. Los grupos de estudio definidos se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Grupos de estudio

Grupo	Descripción	Abreviatura
1	MI nativa de personas con obesidad más el coctel de bacteriófagos	MIN
2	MI de personas con obesidad enriquecida con EC ATCC 13047 más el coctel de bacteriófagos	MIE

MI: Microbiota intestinal; EC: *Enterobacter cloacae*; ATCC: American Type Culture Collection.

5.3 Formulación del coctel de bacteriófagos

Se formuló un coctel de bacteriófagos, compuesto por dos bacteriófagos específicos, mediante la evaluación de sus características biológicas *in vitro* de los bacteriófagos AS1, AS2, AS3A, AS3B, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8. Utilizamos de la American Type Culture Collection (ATCC), como cepa hospedero a *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Posteriormente a los dos bacteriófagos elegidos, se llevó a cabo el análisis de su genoma.

5.3.1 Cálculo del título viral

La titulación de los bacteriófagos AS1, AS2, AS3A, AS3B, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8 se llevó a cabo utilizando el método de doble capa de agar (Pallavali et al., 2017) y se realizaron diluciones seriadas del bacteriófago en buffer SM. Se procedió a preparar placas con agar soya tripticaseína (TSA, por sus siglas en inglés). Se llevaron a ebullición tubos con 3 mL de agar suave (TSAs; TSB + 0.4 % agarosa) a baño María en un vaso de precipitado hasta que se disolvieron todos los microcristales. Una vez que el tubo estaba a temperatura ambiente se agregó 1 mL de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 cultivada en caldo soya tripticaseína (TSB, por sus siglas en inglés) y 100 µL de dilución del bacteriófago, se homogenizó golpeando suavemente el tubo con los dedos y se vertió en una caja de TSA y se homogenizó agitando de manera circular la caja para que quede uniforme la distribución. Se dejó secar durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Para su posterior incubación durante 24 horas a 37 °C. Para obtener el título viral se multiplicó el promedio de placas de lisis generadas por el recíproco de la dilución entre el volumen inoculado de bacteriófagos. Los resultados fueron expresados en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). El experimento se realizó por triplicado.

5.3.2 Rango de hospederos

El análisis del rango de hospederos se llevó a cabo mediante la evaluación de los bacteriófagos AS1, AS2, AS3A, AS3B, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8 por la metodología descrita por Kutter (2009). Para este propósito, se procedió a preparar placas Petri con 12 mL de TSA. Se llevaron a ebullición tubos con 3 mL de TSAs a baño María en un vaso de precipitado hasta que se disolvieron todos los microcristales. Una vez que el tubo estaba a temperatura ambiente se agregó 1 mL de bacteria previamente cultivada en TSB, se homogenizó golpeando suavemente el tubo con los dedos, se vertió en una caja de TSA y se homogenizó agitando de manera circular la caja para que quede uniforme la distribución. Se dejó secar durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente y luego se colocaron 10 μ L de cada uno de los bacteriófagos purificados sobre la capa de agar suave mediante goteo en su respectivo cuadrante. Se dejaron secando las cajas a temperatura ambiente para su posterior incubación durante 24 horas a 37 °C. El experimento se realizó por triplicado para cada una de las bacterias utilizadas del cepario (24 bacterias) del Laboratorio Nacional de Investigación de Inocuidad Alimentaria (LANIIA) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Cepario utilizado para la evaluación del rango de hospederos

Especie	Identificador
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Citrobacter braaaki</i>	ATCC 51113
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ATCC 700327
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9721
<i>Enterobacter hormaechei</i>	ATCC 700323
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35150
<i>Klebsiella aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Continuación Tabla 3. Cepario utilizado para la evaluación del rango de hospederos

Espece	Identificador
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	ATCC 17666
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC29
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	BAA-750
<i>Enterobacter cloacae</i>	EcC1

ATCC: American Type Culture Collection.

5.3.3 Cinética de lisis de *Enterobacter cloacae*

Se evaluó la actividad bacteriolítica de los bacteriófagos mediante la metodología descrita previamente por (Nasr-Eldin et al., 2023a).

Para llevar a cabo este proceso, se incubó una colonia de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 en TSB durante 24 horas a 37 °C, se midió la densidad óptica de la bacteria en un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU) y se ajustó la concentración a 1×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) diluyéndolo en TSB. Los bacteriófagos se ajustaron a diferentes MOI que incluyeron valores de 10 (1×10^6 UFP/mL), 1 (1×10^5 UFP/mL), 0.1 (1×10^4 UFP/mL) y 0.01 (1×10^3 UFP/mL), diluyéndolo en TSB. Durante el experimento, se utilizó una placa de 96 pocillos, para cada uno de los bacteriófagos se utilizó 1 pozo y se inocularon 180 μ L de la MOI correspondiente + 20 μ L de bacteria, se estableció el grupo control negativo (200 μ L de TSB) y control positivo (180 μ L de TSB + 20 μ L de bacteria).

La incubación se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C con agitación orbital durante 5 segundos antes de cada lectura, se midió la densidad óptica (600 nm) del cultivo cada 15 minutos durante un período de 17 horas en un Lector de microplaca multidetectores Synergy™ HTX Biotek.

Luego de obtener los resultados de rango de hospederos, título viral y cinética de lisis de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 con cada bacteriófago, se procedió a la selección de aquellos que formarían parte de tres cocteles, cada uno compuesto por dos bacteriófagos. Esta selección se basó en criterios específicos derivados de los datos obtenidos. Se realizó una evaluación adicional de la cinética de lisis utilizando los cocteles previamente seleccionados. Esta vez, se llevó a cabo con cada uno de los cocteles y se incluyeron dos condiciones de MOI, una de 100 y otra de 0.001, para una comprensión más exhaustiva de su efectividad.

5.3.4 Extracción y secuenciación del ADN genómico de los bacteriófagos

El ADN de los bacteriófagos seleccionados se extrajo utilizando el método de fenol-cloroformo, siguiendo el procedimiento descrito por (Sambrook y Russell, 2006). Se inició transfiriendo 1 mL de la suspensión de bacteriófagos a un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente, se trató la muestra con 2 μ L de Dnasa I y Rnasa A, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Luego, se procedió con el tratamiento utilizando 40 μ L de EDTA (0.5 M), 2.5 μ L de proteinasa K y 50 μ L de SDS al 10 %. La mezcla resultante se invirtió para su homogeneización y se incubó a 56 °C durante 2 horas. Una vez concluida la incubación, se añadió una cantidad igual de fenol y se mezcló nuevamente. La muestra se centrifugó a 3, 500 x g durante 10 minutos a 25 °C, y la fase acuosa se separó en un tubo de 1.5 mL. A continuación, se realizó una serie de lavados utilizando fenol-cloroformo 1:1 (v/v) y centrifugaciones a 3, 500 x g durante 10 minutos a 25 °C en tres ocasiones. Después de la centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 200 μ L de acetato de sodio 3 M y alcohol etílico hasta llenar el tubo. La mezcla se incubó a -20 °C durante la noche. Al finalizar la incubación, se centrifugó a 15,000 x g durante 30 minutos. Luego, se decantó el sobrenadante y el sedimento de ADN se lavó con alcohol etílico al 70 %, seguido de una centrifugación a 15,000 x g durante 15 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se permitió que la pastilla de ADN se secase a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y la pureza del ADN se determinaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.). Además, se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis en un gel al 1 %.

Las bibliotecas de ADN se prepararon utilizando el kit de preparación de mesa de biblioteca Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación del genoma se

llevó a cabo en la plataforma Illumina MiniSeq, utilizando el protocolo de extremos emparejados de 2×150 pb con un total de 300 ciclos.

5.3.5 Análisis bioinformáticos

La identificación de marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) se realizó con PHANOTATE v1.5.0 (McNair et al., 2019) y se curó manualmente con Geneious v9.1.8. Las anotaciones funcionales de los ORF se realizaron utilizando Geneious v9.1.8 y la herramienta de búsqueda de alineación local básica de proteínas (blastp) disponible en el servidor National Center for Biotechnology Information. La detección de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) se llevó a cabo utilizando tRNAscan-SE (Lowe y Chan, 2016) y ARAGORN (Laslett y Canback, 2004). Las firmas de virulencia se examinaron mediante Victors (Sayers et al., 2019) y VFDB (Chen et al., 2005), mientras que las firmas de resistencia a los antibióticos se examinaron mediante CARD (McArthur et al., 2013). Para clasificar el estilo de vida de los bacteriófagos, la plataforma de software impulsada por IA PhageAI v1.0.2 desarrollada por (Tynecki et al., 2020). Las similitudes intergenómicas entre los genomas virales se calcularon utilizando la herramienta VIRIDIC (Moraru et al., 2020) con la configuración predeterminada de blastn, y la comparación entre los bacteriófagos y su genoma relacionado más cercano se visualizó usando clinker v0.0.28 (Gilchrist y Chooi, 2021).

5.4 Estabilización de la microbiota intestinal

Para recrear las condiciones espaciales, temporales y ambientales que los microorganismos encuentran en la luz intestinal, se implementó un protocolo que permite evaluar los efectos de diversas intervenciones de modulación en los perfiles de microbiota fecal y anticipar sus repercusiones en la salud. Se emplearon tres biorreactores que fueron preparados mediante un procedimiento basado en el trabajo de (García-Gamboa et al., 2020), con el propósito de estabilizar la microbiota intestinal.

Inicialmente, cada biorreactor se cargó con 50 mL de un medio estabilizador y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos a 14 psi. A continuación, se procedió a la inoculación de microbiota intestinal de donadores que presentaban obesidad, con un volumen equivalente al 10 % del biorreactor. La intención era simular una población microbiana que refleje características relevantes para el estudio de la obesidad.

Los biorreactores inoculados fueron mantenidos a una temperatura de 37 °C, con una agitación constante a 120 rpm. Además, se ajustó el pH en función de las condiciones específicas definidas para cada segmento del colon simulado. Para el CA, se estableció un rango de pH entre 5.5 y 6. En el caso del colon transversal CT, el pH se mantuvo entre 6 y 6.5. Finalmente, para el colon descendente CD, se ajustó el pH entre 6.5 y 7. Estos ajustes de pH se realizaron mediante una solución tampón de NaOH 3 M o HCl 1 M.

Para que se llevara a cabo la adaptación de la microbiota intestinal inoculada en los biorreactores, se inició la suplementación diaria, mediante la adición de 10 mL de medio multivitamínico (MMV) (0.5 g/L, viterra® plus de Pfizer). Los biorreactores se mantuvieron en las condiciones de pH y temperatura (ya mencionada) durante una semana completa. Este proceso permitió que la microbiota se estabilizara en las condiciones definidas, reproduciendo de manera más precisa los entornos microbianos que se encuentran en diferentes regiones del intestino.

5.5 Administración del coctel de bacteriófagos al simulador del tracto digestivo

Después de completar la fase inicial de estabilización en los biorreactores utilizando MMV, la investigación avanzó hacia la etapa de digestión del alimento para culminar la estabilización completa. En la evaluación del grupo 2, se llevó a cabo un enriquecimiento previo a la intervención con el coctel de bacteriófagos en los biorreactores CA, CT y CD

mediante la inoculación de la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Tras un período de adaptación de 72 horas, se implementó el tratamiento con el coctel de bacteriófagos (**Figura 9**). El diseño experimental adoptado se fundamentó en el enfoque metodológico propuesto por García-Gamboa et al. (2020), adaptándolo de manera específica a las necesidades y objetivos particulares de la presente investigación.

5.5.1 Simulación del estómago

Para iniciar, se emplearon 50 mL de una dieta característica de la obesidad, con una composición de 2500 kcal, que contiene un 50 % de carbohidratos, un 20 % de proteínas y un 30 % de lípidos. Se ajustó el pH a un valor entre 2 y 2.5, y se incorporaron 0.125 g de pepsina al sistema. Esta mezcla se mantuvo a una temperatura de 37 °C, con una agitación constante a 120 rpm, durante un período de 2 horas.

5.5.2 Simulación del intestino delgado

El producto de digestión obtenido en el estómago (50 mL) se mezcló con una solución de enzimas pancreáticas, la cual contiene 25,000 µg/L de lipasa, 100, 000 µg/L de amilasa y 60, 000 µg/L de proteasa. Se ajustó el pH en el rango de 5 a 5.5. Esta mezcla se mantuvo a 37 °C con agitación constante a 120 rpm durante 4 horas.

5.5.3 Simulación de colon ascendente

Para esta etapa, se introdujo en el biorreactor inoculado el producto de digestión resultante del intestino delgado (50 mL), junto con el coctel de bacteriófagos. Se procedió a ajustar el pH a 5.5, y se mantuvo la agitación a 120 rpm y la temperatura a 37 °C durante un periodo de 18 horas.

5.5.4 Simulación de colon transverso

En esta fase, se añadieron 50 mL del producto digestivo del CA al biorreactor CT. Se realizó un ajuste de pH para situarlo en el rango de 6.5, y

se mantuvo la agitación a 120 rpm y la temperatura a 37 °C durante un lapso de 32 horas.

5.5.5 Simulación del colon descendente

En la última etapa, se incorporaron 50 mL de la mezcla digestiva proveniente del CT al biorreactor CD. Se realizaron ajustes de pH necesarios y se mantuvo la agitación y la temperatura en los valores previamente establecidos (120 rpm y 37 °C) durante 16 horas.

Este proceso de simulación digestiva fue cíclico, siguiendo un esquema continuo de tres ciclos consecutivos. Cada ciclo tuvo una duración total de 72 horas totales. Las primeras muestras fueron recolectadas en el tiempo 0, que corresponde al período de control y posteriormente se procedió a inocular el coctel de bacteriófagos en el CA, para su continua digestión al CT y CD. Completando así 3 intervenciones con el coctel de bacteriófagos en las 3 regiones del intestino grueso.

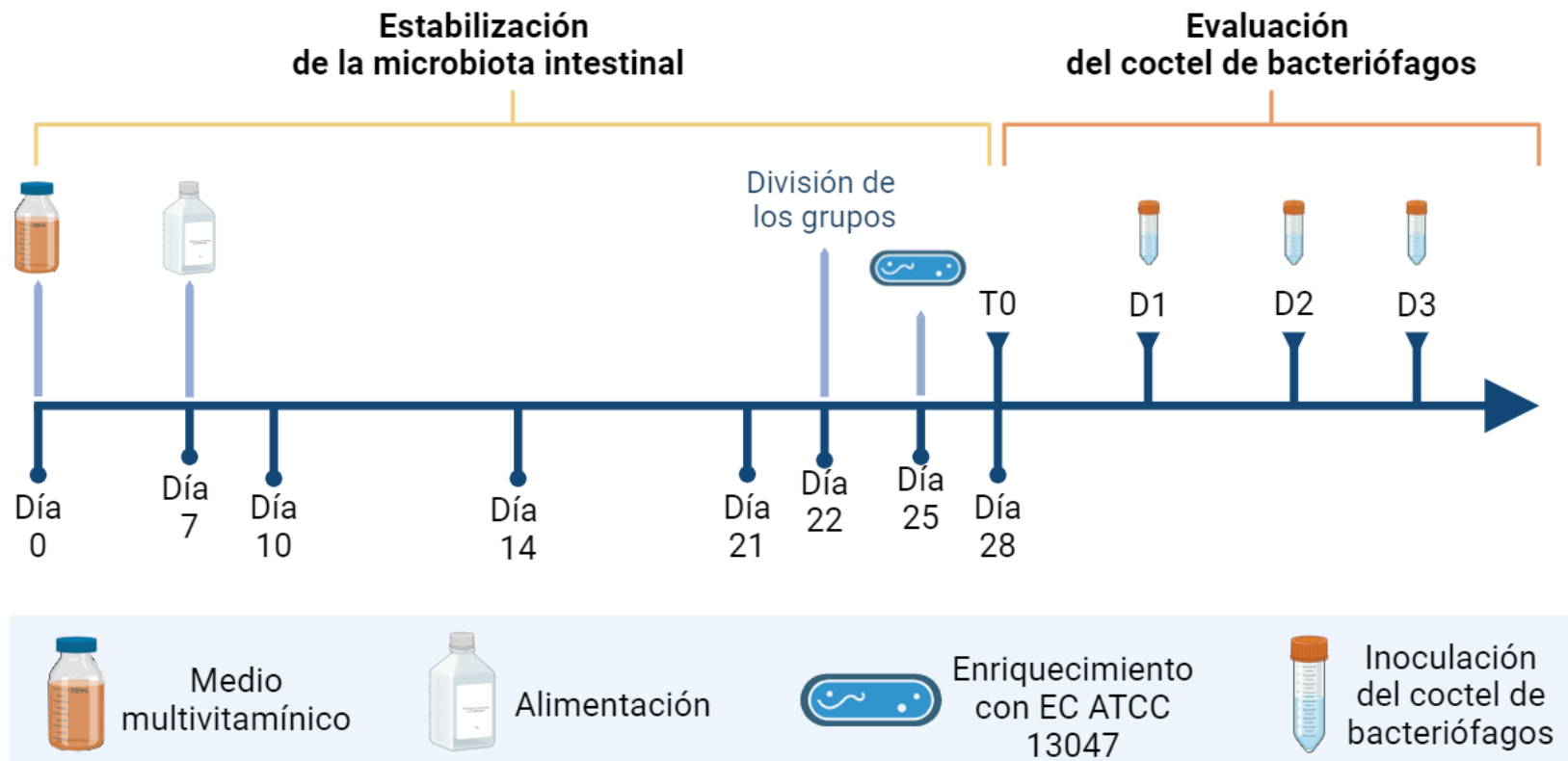


Figura 9. Bioensayo ex vivo de la microbiota intestinal de personas con obesidad. EC: *Enterobacter cloacae*; ATCC: American Type Culture Collection; T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3.

5.6 Análisis microbiológicos

5.6.1 Conteo de bacterias en muestras de los biorreactores

Las muestras recopiladas durante la etapa de estabilización e intervención fueron sometidas a un análisis microbiológico estandarizado siguiendo el método descrito por García-Gamboa et al., (2020). Se aplicó el mismo protocolo de tratamiento y evaluación para todas las muestras.

Se procedió a realizar diluciones decimales de las muestras en agua peptonada. Los grupos bacterianos presentes en las muestras fueron cultivados utilizando medios específicos. Para bacterias con metabolismo aerobio la siembra se hizo a partir de inoculación en las placas por goteo de 10 μ L de la dilución. Se dejó secando durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Para su posterior incubación durante 24 horas a 37 °C en aerobiosis. El experimento se realizó por triplicado.

- *Lactobacillus* spp: Se utilizó el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS, por sus siglas en inglés).
- *Salmonella* spp: Se utilizó el medio Lisine Iron Agar (LIA, por sus siglas en inglés)
- Enterobacterias: Se utilizó el medio agar MacConkey

Para bacterias con metabolismo anaerobio la siembra se hizo a partir de la inoculación en el centro de la placa por goteo de 10 μ L de la dilución previamente se llevó a ebullición el agar y una vez a temperatura ambiente, se llevó a cabo el vaciado del agar, se dejó secando durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Para su posterior incubación durante 48 horas a 37 °C en anaerobiosis. El experimento se realizó por triplicado.

- *Bifidobacterium* spp: Se utilizó el medio Bifidus Selective Medium-agar (BSM, por sus siglas en inglés).
- *Clostridium* spp: Se utilizó el medio Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC, por siglas en inglés).

Los resultados obtenidos se expresaron en UFC/mL.

5.6.2 Titulación de bacteriófagos en muestras de los biorreactores

Se inició tomando una muestra de 2 mL de cada biorreactor. Estas muestras fueron sometidas a una centrifugación a 10, 000 x *g* durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Una vez culminada la centrifugación, se recolectó el sobrenadante y se dispuso en tubos de 1.5 mL. Posteriormente, se repitió el proceso de centrifugación a las mismas condiciones y se recuperó el sobrenadante mediante una jeringa de 5 mL. Para garantizar una filtración adecuada, el sobrenadante se sometió a una filtración secuencial con membranas de tamaño de poro de 0.42 µm y 0.22 µm en tubos de 1.5 mL. Se procedió a realizar diluciones decimales utilizando solución salina como base. Posteriormente, se aplicó la prueba spot empleando el método de doble capa de agar descrito por Pallavali et al., (2017). Para obtener el título viral se multiplicó el promedio de placas de lisis generadas por el recíproco de la dilución entre el volumen inoculado de bacteriófagos. El experimento se realizó por triplicado.

5.7 Extracción y secuenciación del material genético

Para la extracción del ADN se realizó la extracción por el método de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) con modificaciones (Doyle y Doyle, 1987). Se añadió 1 mL de buffer CTAB en el tubo donde se encontraba la muestra y se llevó a vortexear intensamente. Posteriormente se transfirió 700 µL a un tubo nuevo y se añadió 700 µL de cloroformo isoamílico (24:1) y se llevó a vortexear, dejando reposar 5 minutos, pasado el tiempo se centrifugo a 12, 300 x *g* por 10 minutos. Se formaron 2 fases, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo estéril agregando 500 µL de 2-propanol y se agitó por inversión, dejándolo reposar por 2 minutos. Pasado el tiempo se centrifugó a 12, 300 x *g* por 5 minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla, posteriormente se lavó agregando 500 µL de etanol al 70 %, se llevó a vortexear hasta separar la pastilla, se centrifugó a 12, 300 x *g* por 5

minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla. Se dejó secando el tubo a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente en un termoblock a 40 °C por 30 minutos. Finalmente, se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración y la pureza del ADN se determinaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.). Además, se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis en un gel al 1 % de agarosa.

Después de la extracción de ADN, la región variable V3 del gen ARNr 16s se amplificó por PCR con un par de cebadores V3-338f y V3-533r (Huse et al., 2008). Los productos de PCR se secuenciaron por pares (300 ciclos, 2 x 150 pb) en un Illumina Miniseq, siguiendo el protocolo estándar de Illumina en CIAD, unidad Mazatlán, Sinaloa.

5.8 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de amplicones se analizaron mediante la distribución Ubuntu de Linux. Las lecturas crudas se filtraron para eliminar los adaptadores de secuenciación y las secuencias de baja calidad utilizando pair-end_cleaner v0.9 y Cutadapt (Martin, 2011). Las lecturas emparejadas (R1 y R2) de cada muestra se ensamblaron (software PEAR The Exelixis Lab, Heidelberg, Alemania). Luego, se eliminaron las quimeras de las secuencias ensambladas con Chimeradetector v0.1.1. La anotación taxonómica se realizó utilizando el programa VSEARCH v2.15.2 (Rognes et al., 2016) contra la base de datos SILVA132 (Quast et al., 2012). Los índices de alfa diversidad se evaluaron con los siguientes indicadores: OTUs observadas, Chao1, Shannon y Simpson y beta diversidad se analizó mediante un análisis multidimensional no métrico (NMDS); Se obtuvieron con phyloseq v1.40.0 en RStudio. La abundancia relativa y la rarefacción de las OTUs en las muestras se obtuvieron con ampvis2 en RStudio. Finalmente, para evaluar la abundancia de secuencias pertenecientes a *Enterobacter cloacae* en cada una de las muestras se realizó

un blasteo de las secuencias pareadas de cada una contra el gen ARNr 16s de la cepa ATCC 13047 en el software Geneious v2023.1.

5.9 Análisis estadístico

Se utilizó una planilla Microsoft Excel versión 21 para el vaciado preliminar de los datos, los análisis estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS versión 24, GraphPad Prims versión 8.0.1 y RStudio versión 4.2.1. Mediante la prueba Shapiro Wilk se evaluó la normalidad en la distribución de los datos. Cuando las variables cuantitativas se distribuyeron normalmente, se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de medidas repetidas, t-student para muestras relacionadas y t-student para muestras independientes; las variables que no se distribuyeron normalmente se analizaron con las pruebas no paramétricas U de Mann Whitney y Wilcoxon. Las variables cuantitativas se expresaron como medias \pm desviación estándar. Se trabajó con un intervalo de confianza del 95 % y para todos los casos se consideró una significancia estadística con un valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Formulación del coctel de bacteriófagos

Se llevó a cabo una evaluación de la actividad biológica de nueve bacteriófagos con el propósito de formular un coctel lítico dirigido a *Enterobacter cloacae*. Posteriormente, se procedió a la caracterización detallada del genoma de los bacteriófagos seleccionados.

6.1.1 Cálculo del título viral

Los bacteriófagos en cuestión fueron aislados de aguas residuales en el estado de Sinaloa. En la prueba de agar de doble capa, las placas de lisis observadas eran claras, con una forma circular y presentando un diámetro promedio de 2.5 mm, tal como se ilustra en la **Figura 10**.

En términos de su título viral, se obtuvo un promedio de 7.55×10^{10} UFP/mL. Se destacó que el bacteriófago AS3A mostró el título más alto, mientras que el AS3B presentó el más bajo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Titulo viral de los bacteriófagos

Bacteriófagos	UFP/mL
AS1	2.18×10^{10}
AS2	2.20×10^{10}
AS3A	3.78×10^{11}
AS3B	1.89×10^7
AS4	6.30×10^{10}
AS5	1.16×10^8
AS6	5.10×10^{10}
AS7	5.40×10^{10}
AS8	7.80×10^{10}

UFP/mL: unidades formadoras de placa por mililitro.

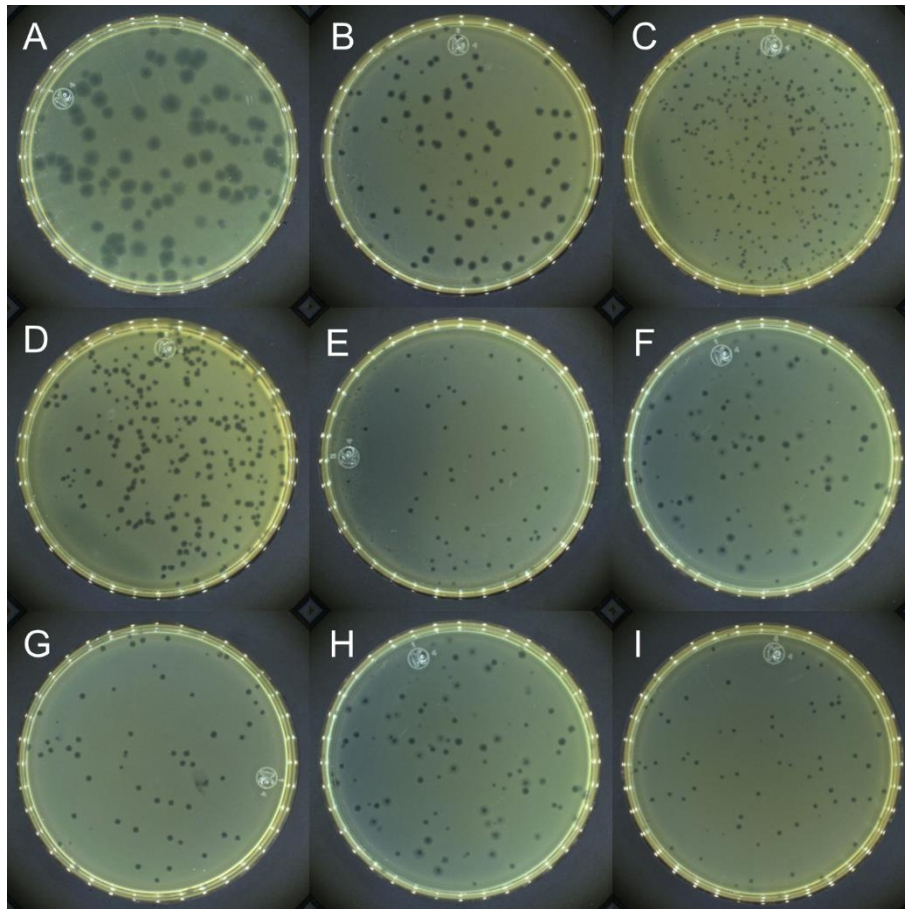


Figura 10. Morfología de las placas formadas en una caja de agar de doble capa de AS1 (A), AS2 (B), AS3A (C), AS3B (D), AS4 (E), AS5 (F), AS6 (G), AS7 (H) y AS8 (I).

6.1.2 Rango de hospederos

Los datos derivados de la prueba spot se organizaron clasificándolos en función de la claridad de la lisis observada en las placas. Esta clasificación se dividió en cuatro categorías: placas de lisis claras (++), placas de lisis opacas (+), placas de lisis muy opacas (\pm) y placas sin lisis (-) (**Tabla 5** y **Figura 11**).

Estos resultados revelaron la presencia de cuatro patrones distintos de lisis. El patrón 1 incluyó a AS1 y AS2, el patrón 2 abarcó a AS3A y AS6, el patrón 3 se relacionó con AS3B y AS5, mientras que el patrón 4 incluyó a AS6, AS7 y AS8. Esta diversidad en los patrones de lisis demostró la capacidad de todos los bacteriófagos para influir en el crecimiento de las cepas pertenecientes al grupo de las enterobacterias.

Destacando el potencial de estos bacteriófagos, se mostró que AS1, AS3B y AS5 fueron capaces de infectar tres cepas de *Enterobacter cloacae* con orígenes de aislamiento diversos, incluyendo cepas de la ATCC y aislamientos clínicos. Este hallazgo resalta la versatilidad y la capacidad de estos bacteriófagos para actuar en distintos entornos. Además, la actividad lítica demostrada por estos bacteriófagos se manifestó predominantemente en especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*, ambos integrantes del grupo de los coliformes. Esto sugiere un potencial de aplicación amplio y específico en el control o la modulación de la población bacteriana, especialmente en entornos donde estas especies prevalecen.

Tabla 5. Rango de hospederos

ID	Ec 13047	Cf 8090	Eh 700323	Ss 25931	Cb 51113	Ec EcC1	Ec MIC29
AS1	++	+	±	-	+	++	±
AS2	++	+	±	-	+	-	++
AS3A	++	+	±	±	+	-	++
AS3B	++	-	-	-	-	+	++
AS4	++	+	±	±	+	-	++
AS5	++	-	-	-	-	+	++
AS6	++	+	±	±	+	-	++
AS7	++	+	±	±	+	-	++
AS8	++	+	±	±	+	-	++

Ec: *Enterobacter cloacae*; Cf: *Citrobacter freundii*; Eh: *Enterobacter hormaechei*; Ss: *Shigella sonnei*; Cb: *Citrobacter braakii*. Placas de lisis claras (++) , placas de lisis opacas (+), placas de lisis muy opacas (±) y placas sin lisis (-)

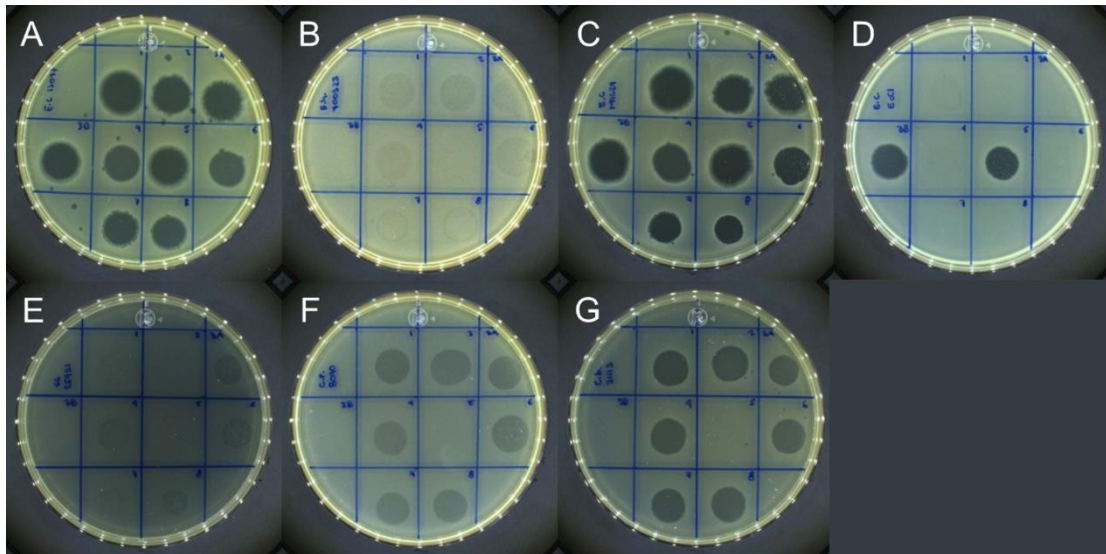


Figura 11. Actividad lítica exhibida en el rango de hospederos. Los bacteriófagos mostraron actividad contra *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (A), *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323 (B), *Enterobacter cloacae* MIC29 (C), *Enterobacter cloacae* EcC1(D), *Shigella sonnei* ATCC 25931 (E), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (F) y *Citrobacter braakii* ATCC 51113 (G).

6.1.3 Cinética de lisis de *Enterobacter cloacae*

Los resultados de las pruebas de cinética de lisis demostraron la eficaz capacidad de los bacteriófagos para inhibir el crecimiento de la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Entre los bacteriófagos evaluados, se observó que AS1, AS2, AS3B, AS4 y AS5 exhibieron un efecto bactericida en un rango de tiempo de 7 a 10 horas, mientras que AS3A, AS6, AS7 y AS8 demostraron una acción que superó las 10 horas, tal como se ilustra en la **Figura 12**.

Un hallazgo relevante fue la relación observada entre la tasa de MOI y el efecto de inhibición del crecimiento bacteriano: a mayor MOI, mayor fue la efectividad en la inhibición del crecimiento de la bacteria.

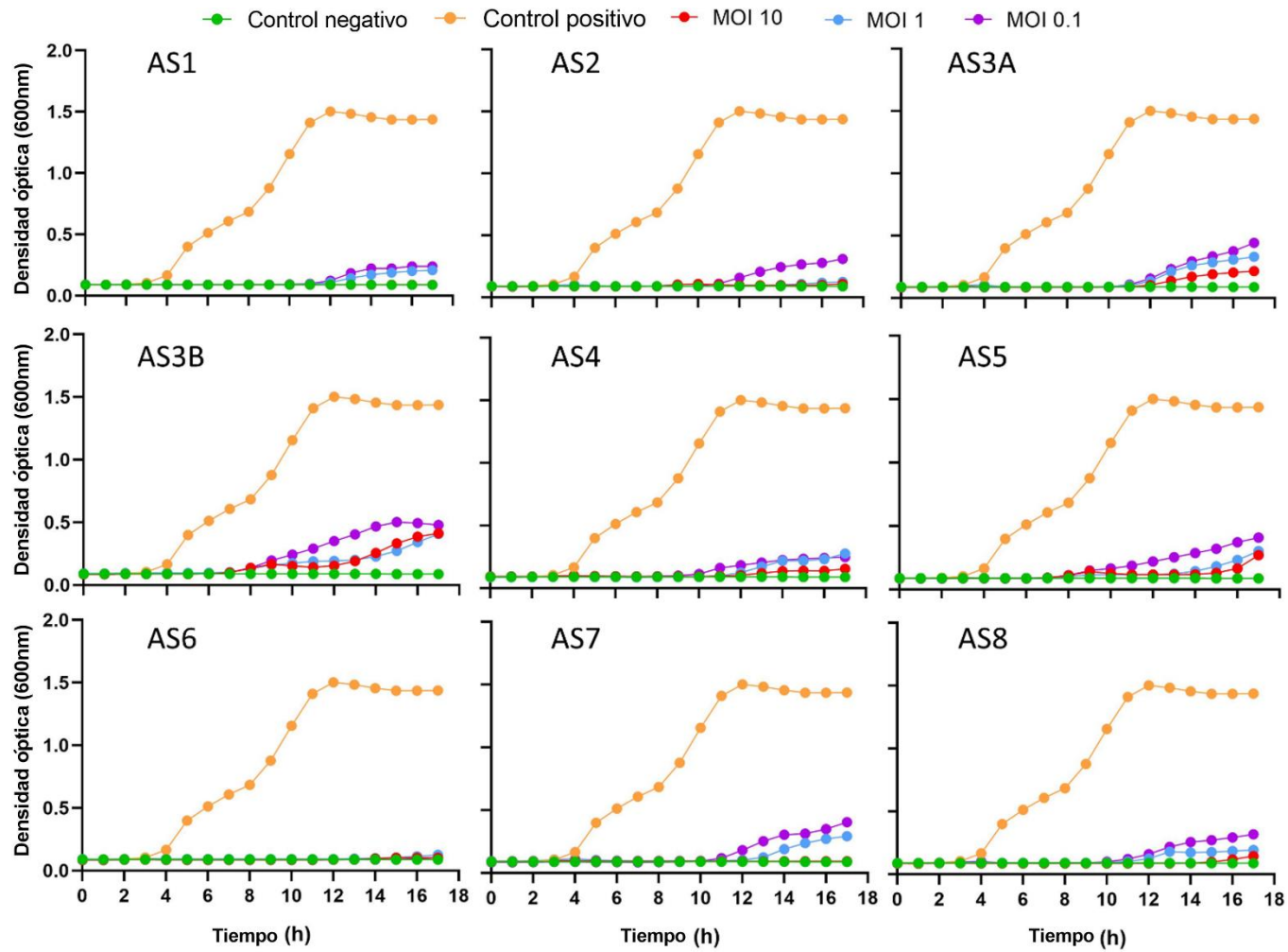


Figura 12. Actividad bacteriolítica de los bacteriófagos aislados contra *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, según diferente multiplicidad de infección (10, 1 y 0.1). Los valores representan la media de tres pruebas.

A partir del análisis del efecto bactericida y los patrones de lisis observados en el rango de hospederos, se diseñaron tres cocteles de dos bacteriófagos cada uno. Estos cocteles fueron sometidos a evaluación para determinar su capacidad bacteriolítica a diferentes multiplicidades de infección, como se muestra en la **Figura 13**.

Se destacó que el coctel de bacteriófagos compuesto por AS5 y AS6 demostró el mayor efecto de control sobre *Enterobacter cloacae*. Este coctel específico exhibió un efecto bactericida en un rango de tiempo que osciló entre 9 y 10 horas, lo que lo posicionó como el más efectivo entre los evaluados. En consecuencia, fue seleccionado para ser aplicado en el modelo *ex vivo*.

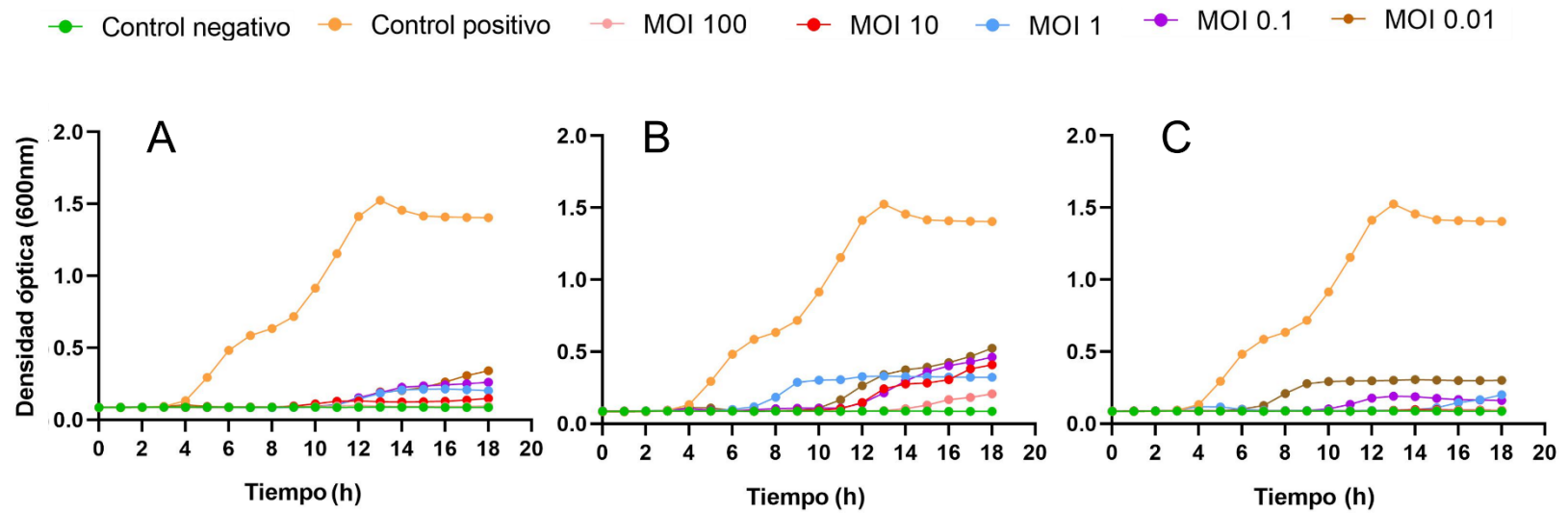


Figura 13. Ensayo de exposición bacteriana de los cocteles. Coctel 1: AS5 y AS6 (A), coctel 2: AS2 y AS8 (B) y coctel: 3 AS3A y AS7 (C), según diferente multiplicidad de infección (100, 10, 1, 0.1 y 0.01). Los valores representan la media de tres pruebas.

6.1.4 Secuenciación del ADN genómico de los bacteriófagos

Con base en los resultados obtenidos del rango de hospederos y la evaluación de la actividad bacteriolítica, se seleccionaron los bacteriófagos AS5 y AS6 para su posterior caracterización genómica. Se logró obtener los genomas de ambos bacteriófagos luego de procesar y ensamblar las lecturas de secuenciación.

6.1.4.1 Bacteriófago AS5

El bacteriófago AS5 posee un ADN bicatenario con una longitud de 49, 578 pb y una composición de guanina/citosina (GC) del 47.9 %. En su genoma, no se identificaron genes asociados a ARNt, al ciclo de vida lisogénico o a la resistencia a antibióticos (**Figura 14**). Los análisis revelaron que el bacteriófago Henu7 de *Escherichia* es el genoma de referencia con mayor homología al del bacteriófago AS5, perteneciendo al género *Henuseptimavirus* de la familia *Drexlerviridae*, con una similitud intergenómica del 85.9 % (**Figura 15**).

6.1.4.2 Bacteriófago AS6

El genoma del bacteriófago AS6 es un ADN bicatenario con una longitud de 171, 281 pb y un contenido de GC del 39.8 %. Se identificaron 19 secuencias de ARNt en su genoma, pero no se encontraron genes asociados a resistencia a antibióticos o a ciclos de vida lisogénicos (**Figura 14**). Se determinó que el genoma del bacteriófago PG7 de *Enterobacter* presenta una identidad intergenómica del 91.7 % con el genoma del bacteriófago AS6. Este bacteriófago se clasifica dentro del género *Karamvirus* de la familia *Straboviridae* (**Figura 16**).

Adicionalmente, utilizando la plataforma PhageAI, se confirmó que ambos bacteriófagos presentan un ciclo de vida virulento.

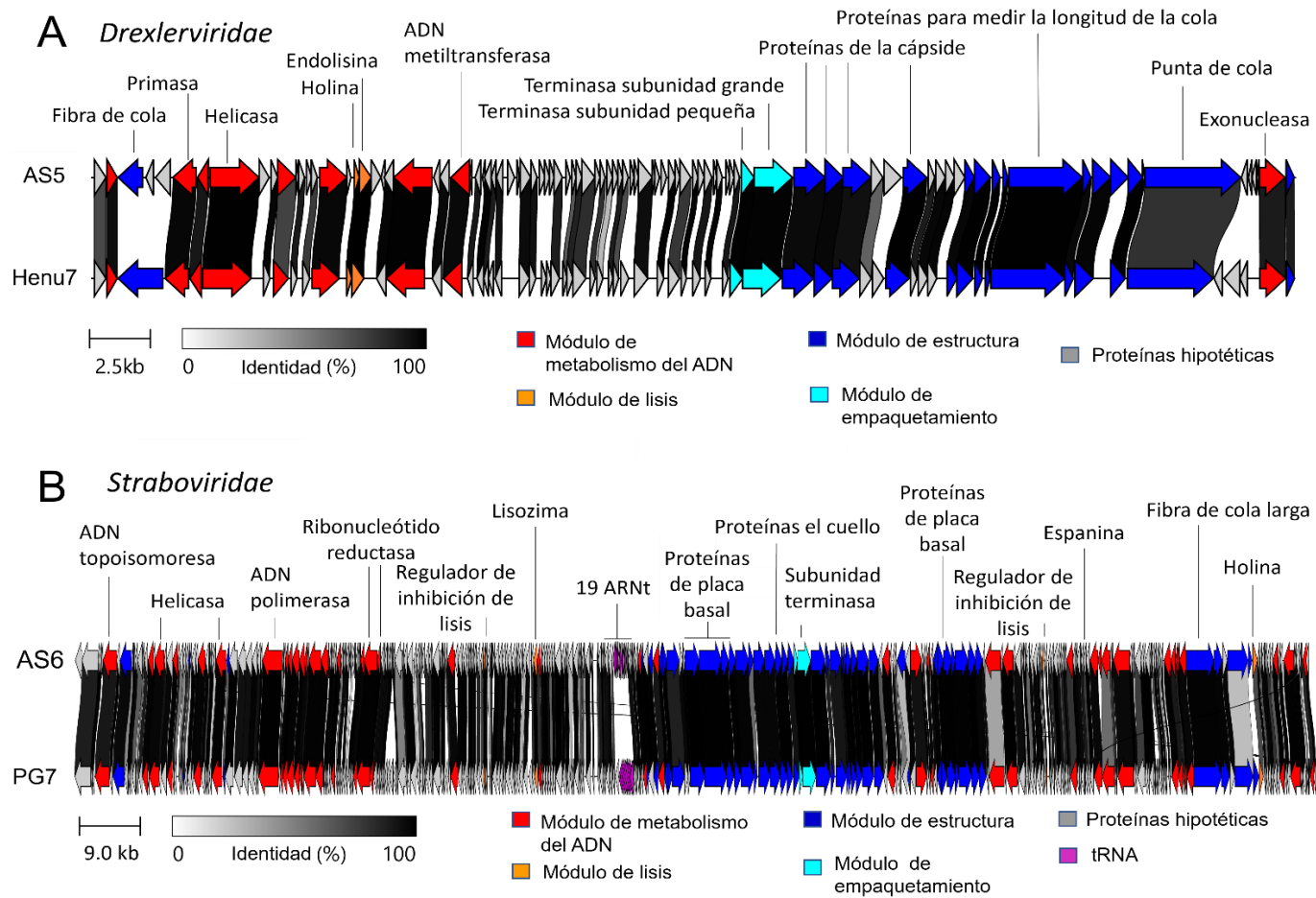


Figura 14. Genómica comparativa de los bacteriófagos AS5 y AS6. Comparación de los genomas AS5 y Henu7 (A). Comparación de los genomas AS6 y PG7 (B). Las escalas de colores representan la identidad de secuencia entre genes similares.

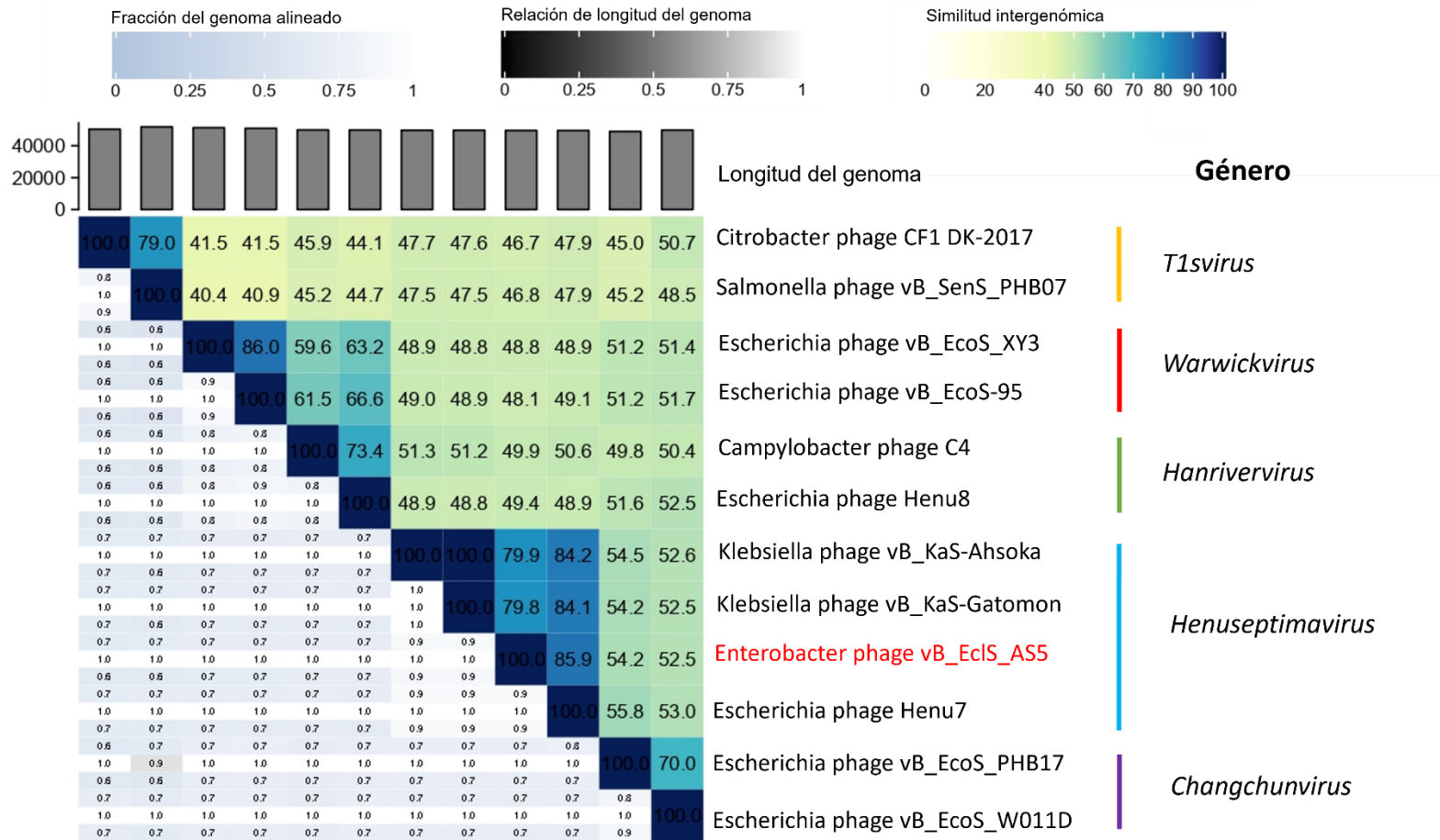


Figura 15. Análisis genómico del bacteriófago AS5. Mapa de calor de similitud intergenómica de bacteriófagos *Drexelviridae*.

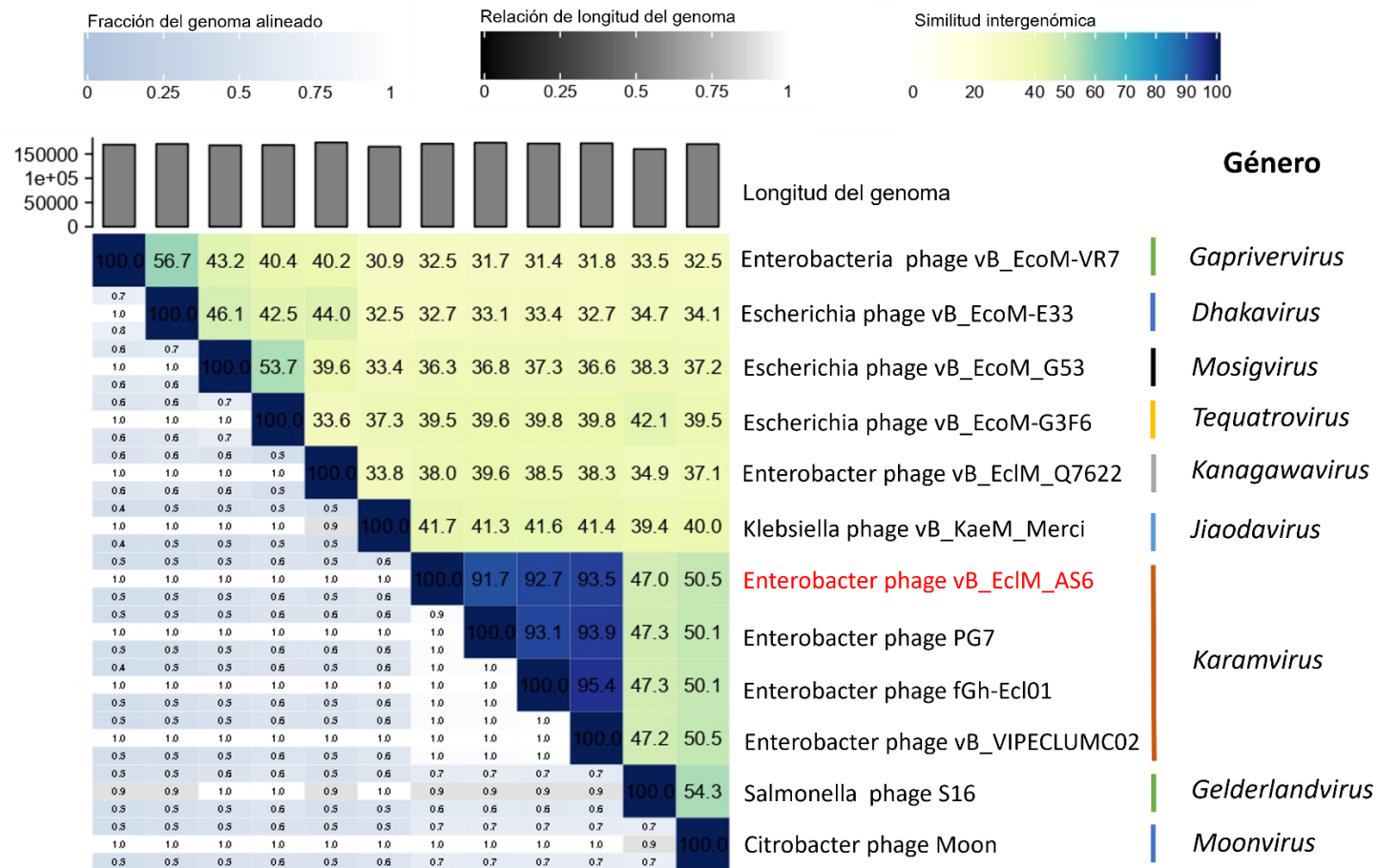


Figura 16. Análisis genómico del bacteriófago AS6. Mapa de calor de similitud intergenómica de bacteriófagos *Straboviridae*.

6.2 Estabilización de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal mostró un crecimiento paulatino y con una tendencia a la estabilización para el día 21 del seguimiento, indicando un equilibrio relativo en el crecimiento bacteriano en los biorreactores. Se observó diferente distribución de bacterias específicas en diferentes regiones del intestino grueso simulado, específicamente en el CA y CD. En el CA, se identificó una mayor abundancia de *Lactobacillus* spp y *Salmonella* spp. Contrariamente, en el CD se observó una mayor abundancia de *Bifidobacterium* spp y *Clostridium* spp. Estos resultados indican una preferencia diferencial de estas cepas por las condiciones específicas de la región (**Figura 17**).

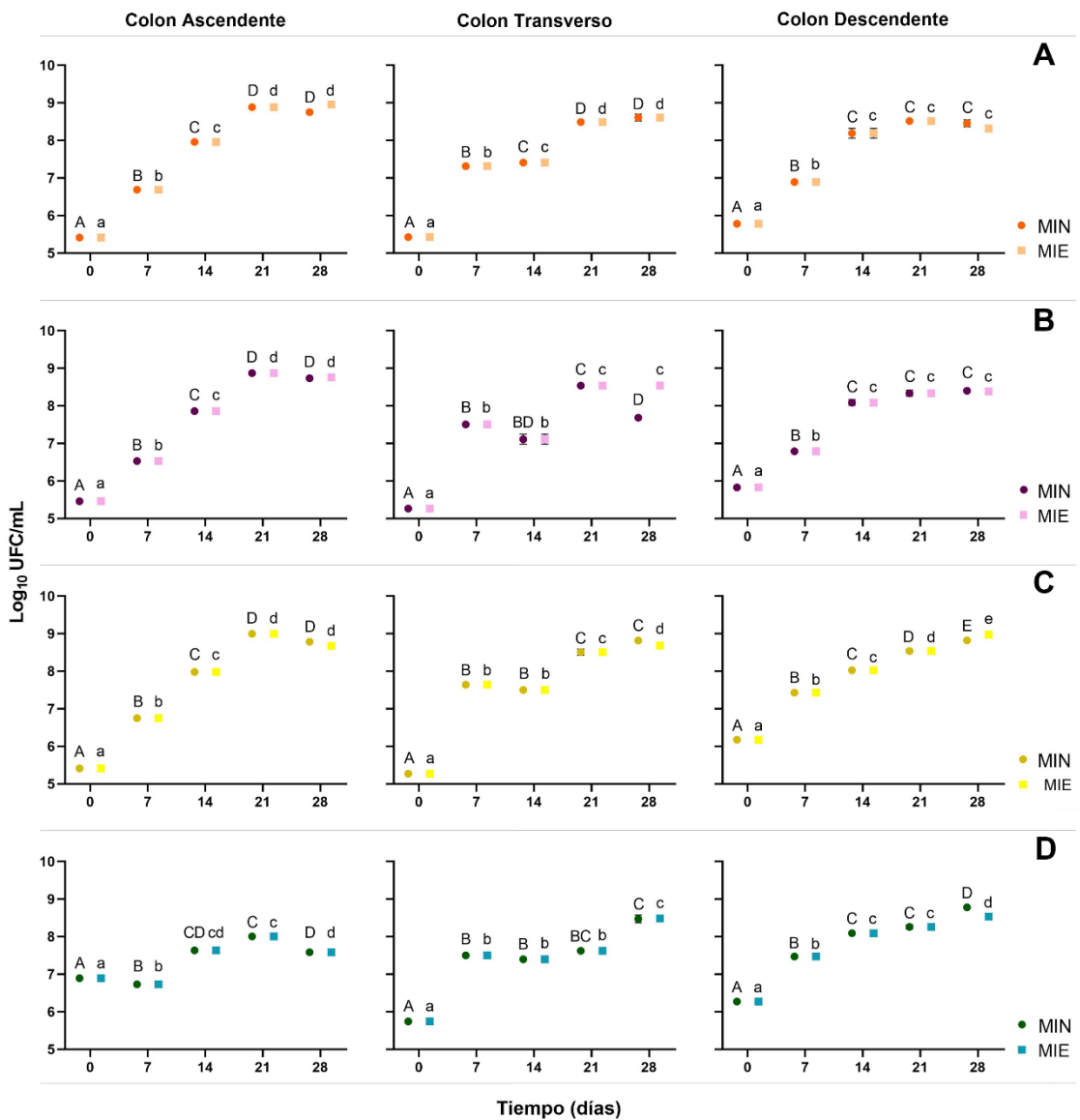


Figura 17. Resultados del recuento bacteriano de la estabilización de la microbiota intestinal de personas con obesidad. *Lactobacillus* spp (A), *Salmonella* spp (B), *Bifidobacterium* spp (C) y *Clostridium* spp (D). En el ensayo las letras mayúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo de intervención del grupo MIN y diferentes letras minúsculas indican una diferencia significativa entre el tiempo de intervención del grupo MIE. MIN: microbiota intestinal nativa; MIE: microbiota intestinal enriquecida con *Enterobacter cloacae*; UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.

6.3 Administración del coctel de bacteriófagos al simulador de tracto digestivo

6.3.1 Análisis microbiológicos

En la evaluación del coctel de bacteriófagos en los biorreactores que simulaban las tres regiones del colon, se observó la supervivencia de los bacteriófagos a lo largo de las digestiones. Los resultados destacan que en el grupo MIN no se presentaron diferencias en las digestiones de todas las regiones del intestino grueso. Mientras que en el grupo MIE se exhibió la mayor concentración de UFP/mL para todas las regiones. En el CA, se encontraron diferencias significativas en todas las digestiones, con notables discrepancias entre el grupo MIN y MIE en la digestión 3. En el CT se mostraron diferencias significativas entre la digestión 1 y las digestiones 2 y 3. En el CD, se presentaron diferencias significativas en todas las digestiones (**Figura 18**).

Al analizar el conteo de enterobacterias, se observaron patrones distintivos en los dos grupos estudiados, el grupo MIN mostró consistencia en la abundancia a lo largo de las digestiones, con diferencias notables en el CA entre la digestión 2 y 3, en el CT entre la digestión 1 y las digestiones 2 y 3, y en el CD entre el tiempo 0 y las digestiones 2 y 3. En contraste, el grupo MIE presentó una mayor abundancia de enterobacterias en el tiempo 0, especialmente en el CT. A medida que avanzaron las digestiones, se observó una disminución en todas las regiones del intestino grueso. En el CA, se encontraron diferencias significativas en el tiempo 0 con las digestiones 1, 2 y 3. En el CT, las diferencias se presentaron entre la digestión 1 y las digestiones 2 y 3. En el CD, se destacó una disminución significativa a lo largo de las digestiones, siendo más pronunciada en esta región del colon (**Figura 18**).

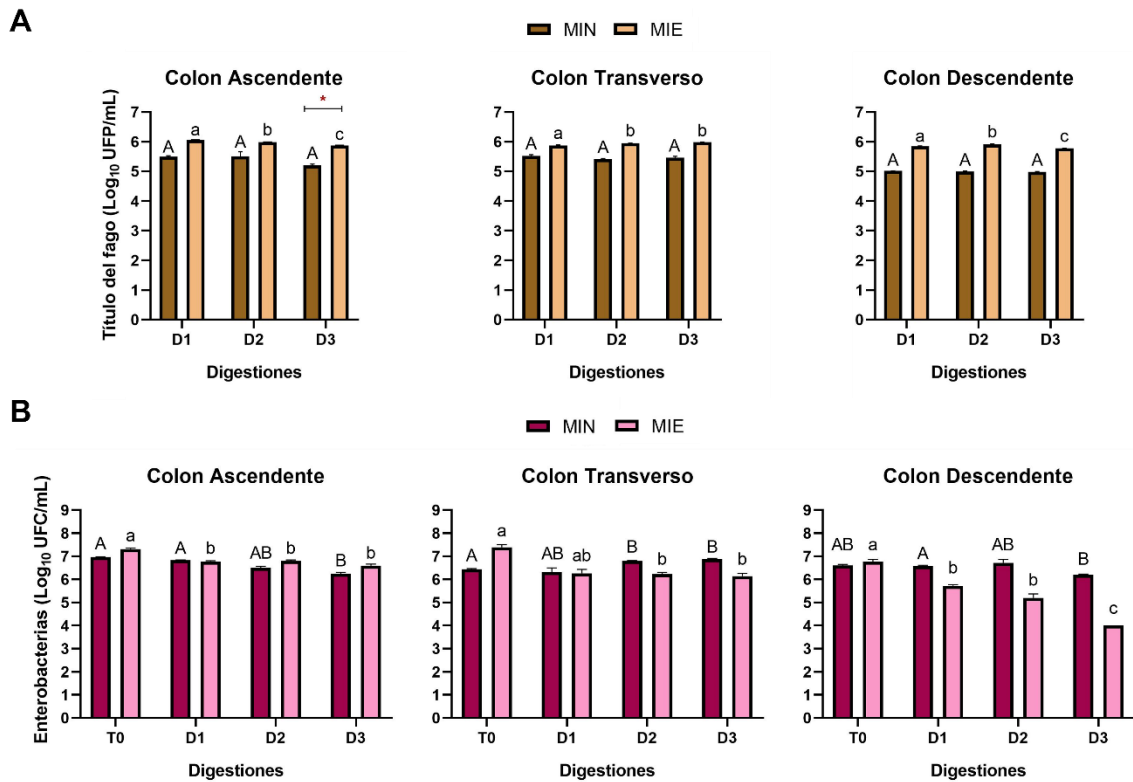


Figura 18. Análisis microbiológicos de los biorreactores que simulan las porciones del colon. Título de bacteriófagos (A) y concentración de enterobacterias (B). En el ensayo las letras mayúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo de intervención del grupo MIN y diferentes letras minúsculas indican una diferencia significativa entre el tiempo de intervención del grupo MIE. El signo asterisco (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre MIN y MIE. MIN: microbiota intestinal nativa; MIE: microbiota intestinal enriquecida con *Enterobacter cloacae*; UFP/mL: unidades formadoras de placa por mililitro; UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro. T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.

La evaluación minuciosa de la presencia de microorganismos, específicamente *Lactobacillus* spp, *Salmonella* spp, *Bifidobacterium* spp y *Clostridium* spp, en los grupos MIN y MIE, arrojó hallazgos significativos (**Figura 19**). En el grupo MIN, se observó un aumento notable de *Lactobacillus* spp en el CA, presentando diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo 0 y la digestión 3. En contraste, en el CD, se evidenció una disminución en este grupo. En el grupo MIE, se registró una disminución en la presencia de *Lactobacillus* spp exclusivamente en el CD. Tanto en el grupo MIN como en el grupo MIE, se identificó un aumento estadísticamente significativo de *Salmonella* spp en el CA y el CT. En el grupo MI, se observó un aumento significativo de *Bifidobacterium* spp en el CA, mientras que en el CT y CD se registró una disminución. En el grupo MIE, se evidenció un aumento en el CA y una disminución en el CD. La evaluación de *Clostridium* spp en el grupo MIN reveló una disminución significativa en el CA, CT y CD. En el grupo MIE, se presentó una disminución en el CA y CT, pero un aumento en el CD. Estos hallazgos indican patrones distintivos según la región y la intervención.

Además, en *Clostridium* spp en el CA, tanto el grupo MIN como el MIE mostraron diferencias significativas en la digestión 3. En el CT, estas diferencias fueron notables en el tiempo 0 y la digestión 3. En el CD, las diferencias se destacaron en la digestión 3.

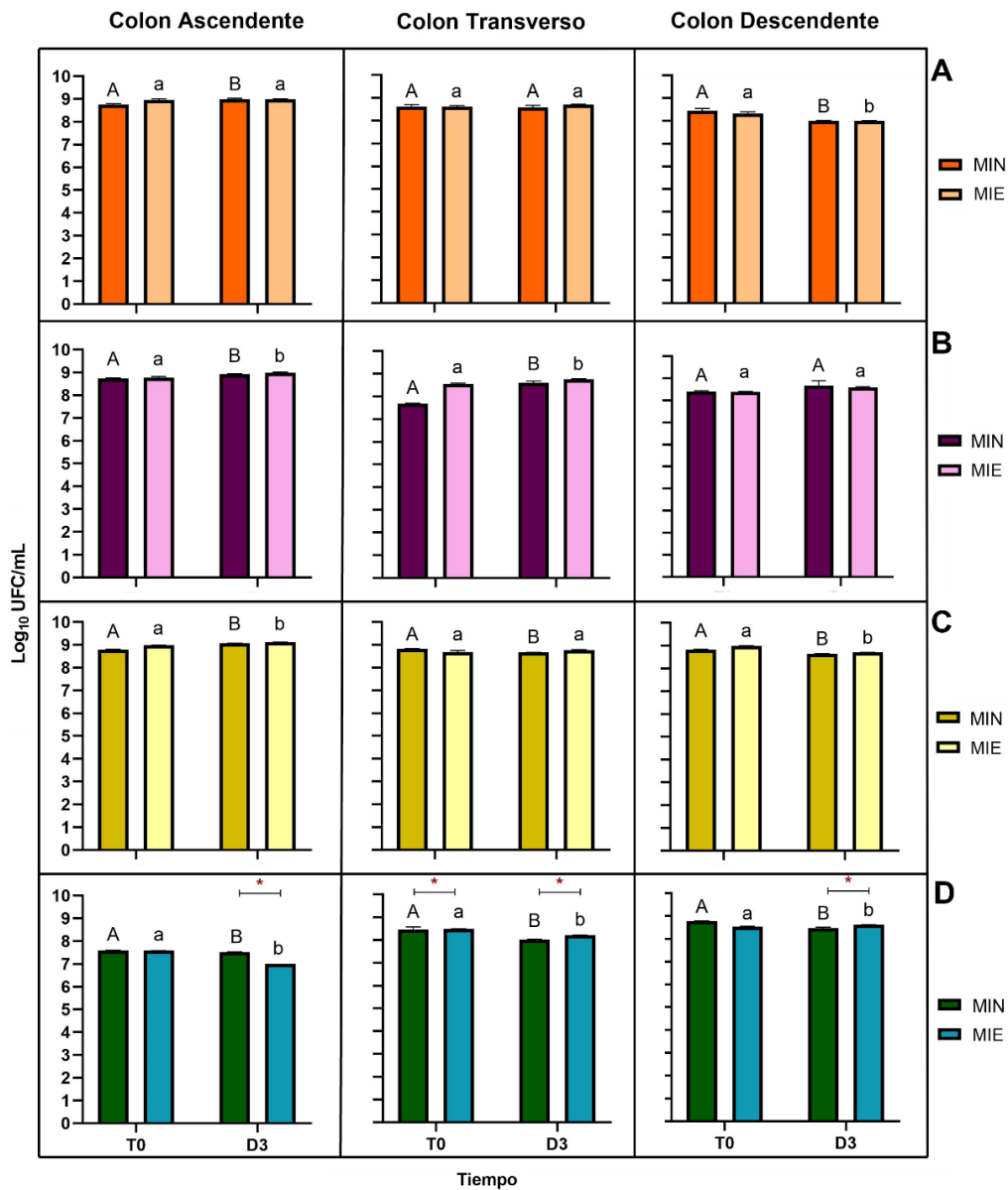


Figura 19. Resultados del recuento bacteriano de la intervención con el coctel de bacteriófagos en ARIS. *Lactobacillus* spp (A), *Salmonella* spp (B), *Bifidobacterium* spp (C) y *Clostridium* spp (D). En el ensayo las letras mayúsculas diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo de intervención del grupo MIN y diferentes letras minúsculas indican una diferencia significativa entre el tiempo de intervención del grupo MIE. El signo asterisco (*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre MIN y MIE. MIN: microbiota intestinal nativa; MIE: microbiota intestinal enriquecida con *Enterobacter cloacae*; UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro. T0: tiempo 0; D3: digestión 3. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.

6.3.2 Secuenciación del gen ARNr 16s

6.3.2.1 Curvas de rarefacción

Se analizó la biodiversidad de las poblaciones bacterianas en las muestras del intestino grueso utilizando curvas de rarefacción. A continuación, se presentan los resultados para dos grupos de estudio: MIN y MIE.

En el grupo MIN (**Figura 20**), se identificaron los siguientes patrones de riqueza de OTUs, en el CA se observó un aumento en el número de OTUs con el incremento de la profundidad de secuenciación, el rango estuvo entre 15 y 30, mostrando un patrón de incremento gradual con la mayor profundidad de secuenciación. En el CT el comportamiento fue similar al observado en el CA, sugiriendo una riqueza comparable entre ambas regiones. El rango de OTUs para el CT también estuvo entre 15 y 30. En el CD se mostró una mayor riqueza de OTUs, con valores que excedieron los 30 a la misma profundidad de secuenciación. Este resultado indica que el CD podría tener una mayor diversidad bacteriana en comparación con el CA y el CT.

En el grupo MIE (**Figura 20**), se observaron diferentes patrones de distribución de OTUs entre los segmentos del intestino grueso. En el CA se detectó una variabilidad en el número de OTUs en función del tiempo. El rango de OTUs en este segmento se situó entre 20 y más de 40, indicando una fluctuación significativa entre las diferentes muestras. Esta variabilidad podría reflejar la dinámica microbiana en esta parte del colon a lo largo del tiempo. En el CT las curvas de rarefacción mostraron un aumento en el número de OTUs a medida que se incrementaba la profundidad de secuenciación. El rango de OTUs osciló entre 20 y 40, sugiriendo una progresión constante en la diversidad de microorganismos con un mayor número de lecturas. En el CD la distribución de OTUs osciló entre 30 y más de 40, mostrando una mayor diversidad en comparación con el CA y el CT. Esto podría implicar diferencias ecológicas y funcionales en la microbiota del CD.

Para evaluar la suficiencia de la profundidad de secuenciación, se consideró el punto donde las curvas de rarefacción alcanzaron la asíntota. Se encontró que aproximadamente 2000 lecturas son suficientes para realizar análisis comparativos, ya que en este punto las curvas tienden a estabilizarse. Este resultado sugiere que la profundidad de secuenciación fue adecuada para captar la diversidad esencial de OTUs en las muestras estudiadas.

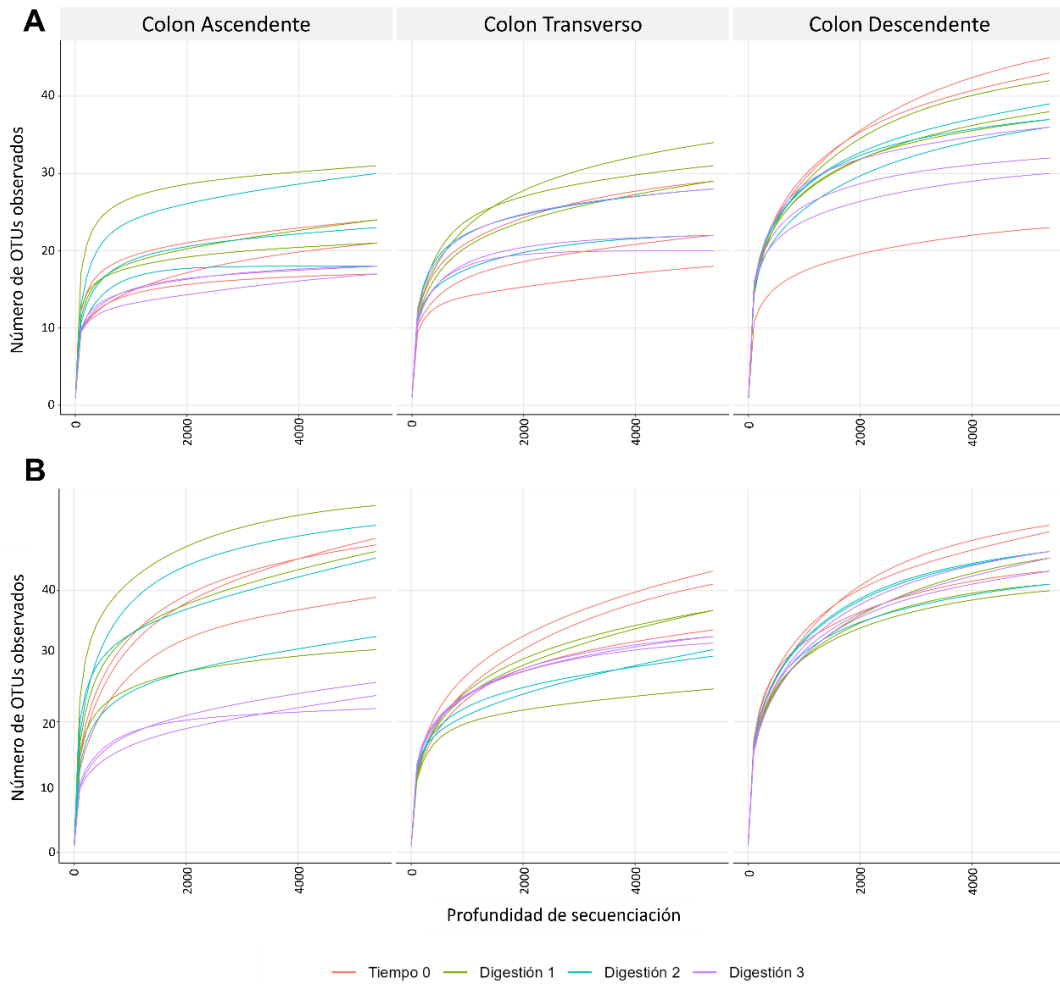


Figura 20. Curva de rarefacción por muestra de cada uno de los tiempos de intervención en las 3 regiones del intestino grueso. Grupo MIN (A) y grupo MIE (B). OTUs: unidad taxonómica operacional.

6.3.2.2 Alfa diversidad

En el grupo MIN, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de intervención en las tres regiones del intestino grueso (**Tabla 6, 7 y 8**). Sin embargo, se observó una tendencia general a aumentar la riqueza en todos los parámetros después de la digestión tras la inoculación con el coctel de bacteriófagos, excepto en el CD con el parámetro Shannon, donde el aumento se presentó hasta la segunda digestión. En la tercera digestión de todas las regiones podemos observar cómo vuelve a disminuir la riqueza, con parámetros similares a los del Tiempo 0.

Tabla 6. Alfa diversidad del colon ascendente del grupo MIN

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	20.67 ± 3.51	23.67 ± 6.50	1.67 ± 0.13	3.23 ± 0.41
D1	25.33 ± 5.13	28.33 ± 6.02	2.06 ± 0.32	5.37 ± 1.60
D2	23.67 ± 6.02	26.33 ± 8.50	1.69 ± 0.19	3.31 ± 0.67
D3	17.67 ± 0.57	18.33 ± 0.57	1.57 ± 0.07	2.89 ± 0.31

T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

Tabla 7. Alfa diversidad del colon transversal del grupo MIN

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	23 ± 5.56	24.50 ± 5.76	1.59 ± 0.14	2.86 ± 0.39
D1	31.33 ± 2.51	34.91 ± 2.50	1.72 ± 0.06	3.11 ± 0.22
D2	28 ± 6	29.91 ± 8.55	1.72 ± 0.07	3.10 ± 0.29
D3	23.33 ± 4.16	23.67 ± 4.72	1.66 ± 0.14	2.98 ± 0.41

T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

Tabla 8. Alfa diversidad del colon descendente del grupo MIN

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	37 ± 12.16	41.52 ± 15.51	2.12 ± 0.13	5.24 ± 0.10
D1	39 ± 2.64	42.36 ± 2.39	2.07 ± 0.03	4.46 ± 0.20
D2	37.33 ± 1.52	42.58 ± 6.02	2.17 ± 0.06	4.96 ± 0.41
D3	32.67 ± 3.05	33.91 ± 3.39	2.13 ± 0.06	4.59 ± 0.57

T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

El análisis de la alfa diversidad en el grupo MIE mostró una mayor riqueza y uniformidad en comparación con el grupo MIN, tanto en el CA, CT y CD. En el CA (**Tabla 9**), se observó una disminución significativa en los índices de alfa diversidad entre el tiempo 0 y la digestión 3. Las diferencias significativas se registraron en Chao1 ($p = 0.036$), Shannon ($p = 0.040$), y Simpson ($p = 0.006$). A pesar de esta disminución hacia la digestión 3, en la digestión 2 se presentó una mayor riqueza y uniformidad en comparación con el tiempo 0, lo que sugiere un pico temporal en la diversidad. En el CT (**Tabla 10**), se encontró un patrón diferente. Se observó una disminución en los índices de OTUs observados y Chao1 entre el tiempo 0 y la digestión 3, indicando una reducción en la riqueza. Sin embargo, los índices de Shannon y Simpson mostraron un aumento, sugiriendo una mayor uniformidad a medida que avanzaba el tiempo de intervención. El comportamiento del CD (**Tabla 11**) fue una disminución entre el tiempo 0 y la digestión 1, pero posteriormente, en la digestión 2, se registró un aumento en riqueza y uniformidad. En la digestión 3, los valores de diversidad regresaron a niveles similares a los del tiempo 0, sugiriendo una tendencia de recuperación y estabilización de la comunidad bacteriana. Cabe resaltar que en ambos grupos (MIN y MIE) los valores más altos en los índices fueron en el CD en el tiempo 0 y la digestión 3.

Tabla 9. Alfa diversidad del colon ascendente del grupo MIE

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	44.67 ± 4.93	53.23 ± 5.06*	2.05± 0.07*	4.41± 0.20*
D1	43.33 ± 11.24	47.61 ± 13.84	2.40 ± 0.33	6.72 ± 2.72
D2	42.67 ± 8.73	55.88 ± 14.95	2.30 ± 0.37	6.32 ± 2.90
D3	24 ± 2	29.50 ± 5.89*	1.60 ± 0.03*	2.98± 0.13*

El signo asterisco (*) en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$). T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

Tabla 10. Alfa diversidad del colon transversal del grupo MIE

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	39.33 ± 4.72	44.97 ± 7.20	1.62 ± 0.03	2.68± 0.05
D1	33.00 ± 6.928	40.08 ± 10.67	1.54± 0.04*	2.55 ± 0.09
D2	31 ± 1	46.50 ± 8.04	1.66± 0.04	2.83± 0.14
D3	32.67 ± 0.57	34.08 ± 1.18	1.82 ± 0.06*	3.31± 0.25

El signo asterisco (*) en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$). T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

Tabla 11. Alfa diversidad del colon descendente del grupo MIE

Tiempo	OTUs observados	Chao1	Shannon	Simpson
T0	47.33 ± 3.78	52.20 ± 8.25	2.27 ± 0.01	5.84 ± 0.10
D1	42 ± 2.64	43.60 ± 3.52	2.22± 0.02	5.51 ± 0.31
D2	44.33 ± 2.88	48.47 ± 5.28	2.31± 0.009	6.22 ± 0.30
D3	44.67 ± 1.52	53.40 ± 5.71	2.27 ± 0.02	5.87 ± 0.22

T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3; OTUs: unidad taxonómica operacional. Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

6.3.2.2 Beta diversidad

El NMDS observamos las relaciones entre las 3 regiones del intestino grueso en los dos grupos diferentes (MIN y MIE) (**Figura 21**). En el grupo MIN, el análisis NMDS muestra una clara separación entre las regiones CA y CD, lo que indica que estas áreas del intestino tienen diferencias significativas en términos de su composición o diversidad. Sin embargo, el CT parece compartir similitudes tanto con el CA como con el CD, situándose entre ellos en el espacio multidimensional. Este resultado puede indicar que el CT tiene características compartidas con ambos extremos del intestino grueso.

En el grupo MIE, el análisis NMDS muestra que en el CA se presenta una distribución más amplia en los tiempos de intervención, lo que sugiere una mayor variabilidad en la dinámica de la microbiota en comparación con las otras regiones del intestino grueso. Se observa que el CA se ubica cerca de la distribución del CT, indicando que estos dos segmentos tienen similitudes en su composición o comportamiento. Por otro lado, el CD tiende a agruparse en otro plano, sugiriendo una divergencia respecto al CA y el CT.

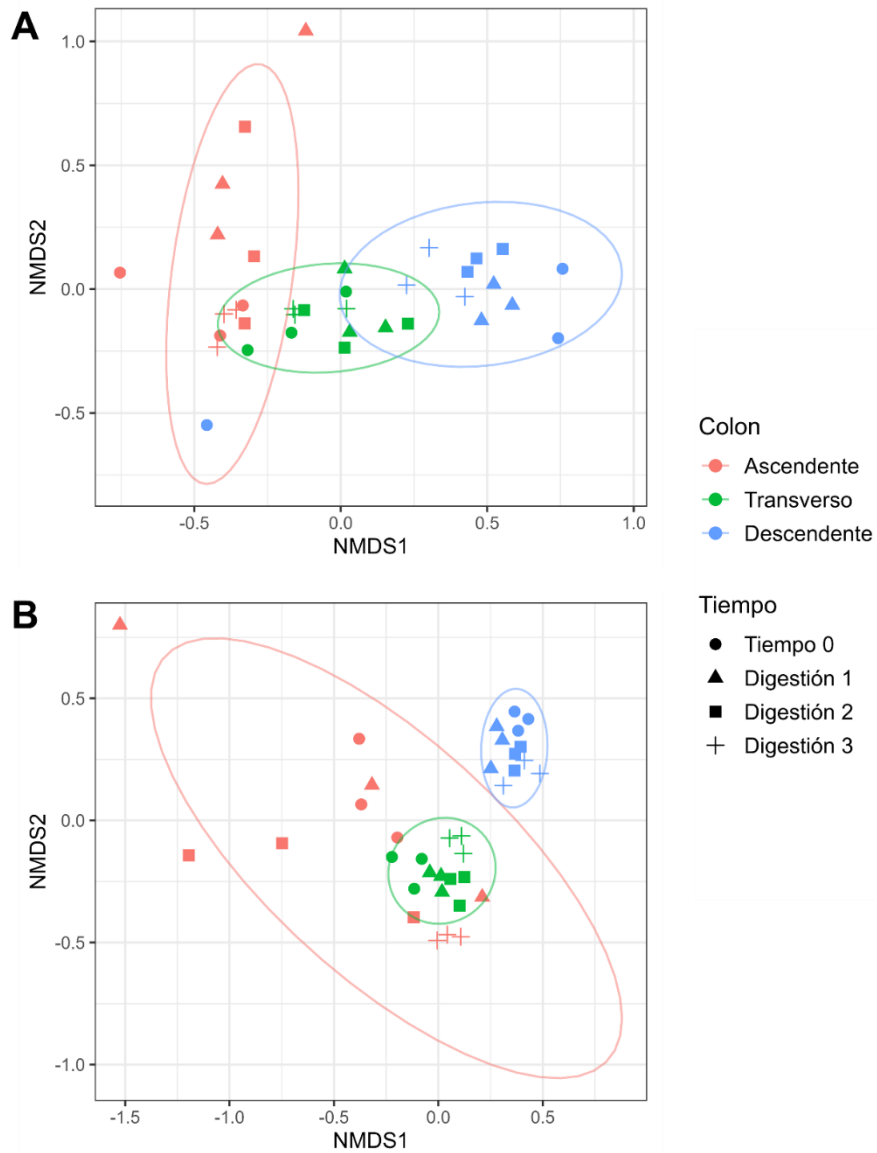


Figura 21. Estimación de la beta diversidad, representada por análisis de escala multidimensional no métrica. Grupo MIN (A) y grupo MIE (B).

6.3.2.3 Abundancia relativa

Para analizar la abundancia relativa de distintos filos y géneros bacterianos, se utilizó un mapa de calor donde se representa la prevalencia mediante una escala de colores: el anaranjado indica mayor abundancia, mientras que el azul refleja menor abundancia. El análisis se centró en las muestras del intestino grueso del grupo MIN y MIE, evaluadas en diferentes tiempos de intervención. A continuación, se describen las observaciones principales obtenidas.

En el grupo MIN el género *Lacticaseibacillus* de la familia *Lactobacillaceae*, perteneciente al filo Firmicutes, mostró una alta prevalencia en todas las regiones del intestino grueso y en todos los tiempos de intervención (**Figura 22**). El comportamiento de la abundancia relativa varió según la muestra. En el CA La abundancia relativa de inició en un 52.2 % al comienzo del estudio, disminuyendo a 35.5 % después de la primera digestión. Sin embargo, para la digestión 3, la abundancia aumentó a 56.4 %, superando incluso el valor inicial. La abundancia relativa del CT se mantuvo más estable que las otras regiones, con un valor de aproximadamente 54-57 % a lo largo del tiempo. En el CD, la abundancia comenzó en un 36.7 %, aumentando gradualmente hasta un 42.8% en la digestión 3. En cambio, no encontramos a *Enterobacter cloacae* entre los 15 géneros más abundantes representados en el mapa de calor, sin embargo, se observó un posible aumento de *Escherichia-Shigella*, bacterias de la misma familia que *Enterobacter cloacae*. En la digestión 1, este género presentó un incremento tanto en el CA como en el CD, pero para la digestión 2, disminuyó en todas las regiones del intestino grueso. Los filos más abundantes son Firmicutes y Proteobacteria (**Figura 23**).

	Colon ascendente				Colon transverso				Colon descendente			
<i>Firmicutes; Lacticaseibacillus</i> -	52.2	35.5	51.2	56.4	57	54.1	56.2	55.7	36.7	42.8	40.2	42.8
<i>Firmicutes; Lactobacillus</i> -	7.4	19.9	14.4	7.9	7	8.3	7.5	7.8	11.6	6.4	7.2	5.9
<i>Firmicutes; Lactiplantibacillus</i> -	11.3	5.8	8.5	10.2	9.5	8.2	7	7	7.1	8.7	9	10.4
<i>Firmicutes; Latilactobacillus</i> -	8.6	6.3	7.3	6.7	7.1	6.4	5.3	8.3	8	9.1	6.9	5.3
<i>Firmicutes; Limosilactobacillus</i> -	6.7	7.9	7.4	6.8	6.7	6.6	6.3	7.3	9.5	4.7	4.7	4.6
<i>Firmicutes; Enterococcus</i> -	0	0	0	0	3.4	6.4	7.3	4.2	8.6	12.6	12.7	10.3
<i>Firmicutes; Pediococcus</i> -	3.4	1.7	2.5	3.8	3.1	2.6	2.5	2.9	1.9	1.8	2.4	2.4
<i>Firmicutes; Weissella</i> -	4	1.8	2.6	3.6	2.6	2.4	2.6	2.6	2.2	2.1	2.1	2.4
<i>Firmicutes; Levilactobacillus</i> -	3	1.2	1	2.3	1.1	1.3	1.2	0.9	2	0.8	1.9	3.3
<i>Firmicutes; Bacillus</i> -	0	0.8	0.5	0	0.1	0.3	0.3	0.2	1.9	2.3	2.9	2.8
<i>Firmicutes; Streptococcus</i> -	0	0	0	0	0.1	0.3	0.4	0.3	1.6	2.3	2.6	2.1
<i>Proteobacteria; Escherichia-Shigella</i> -	0.1	3.2	0	0	0.3	0.3	0.2	0.1	1.3	1.4	0.7	0.2
<i>Firmicutes; Lentilactobacillus</i> -	0.4	0.4	0.3	0.6	0.5	0.8	0.9	0.7	0.6	0.9	0.9	0.6
<i>Firmicutes; Staphylococcus</i> -	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.7	2.4	2.3
<i>Firmicutes; Clostridium sensu stricto 1-</i>	0	5.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3

Figura 22. Mapa de calor de los filos y géneros más abundante durante el bioensayo del grupo MIN. Los valores representan las medias en porcentaje de las abundancias relativas de tres pruebas.

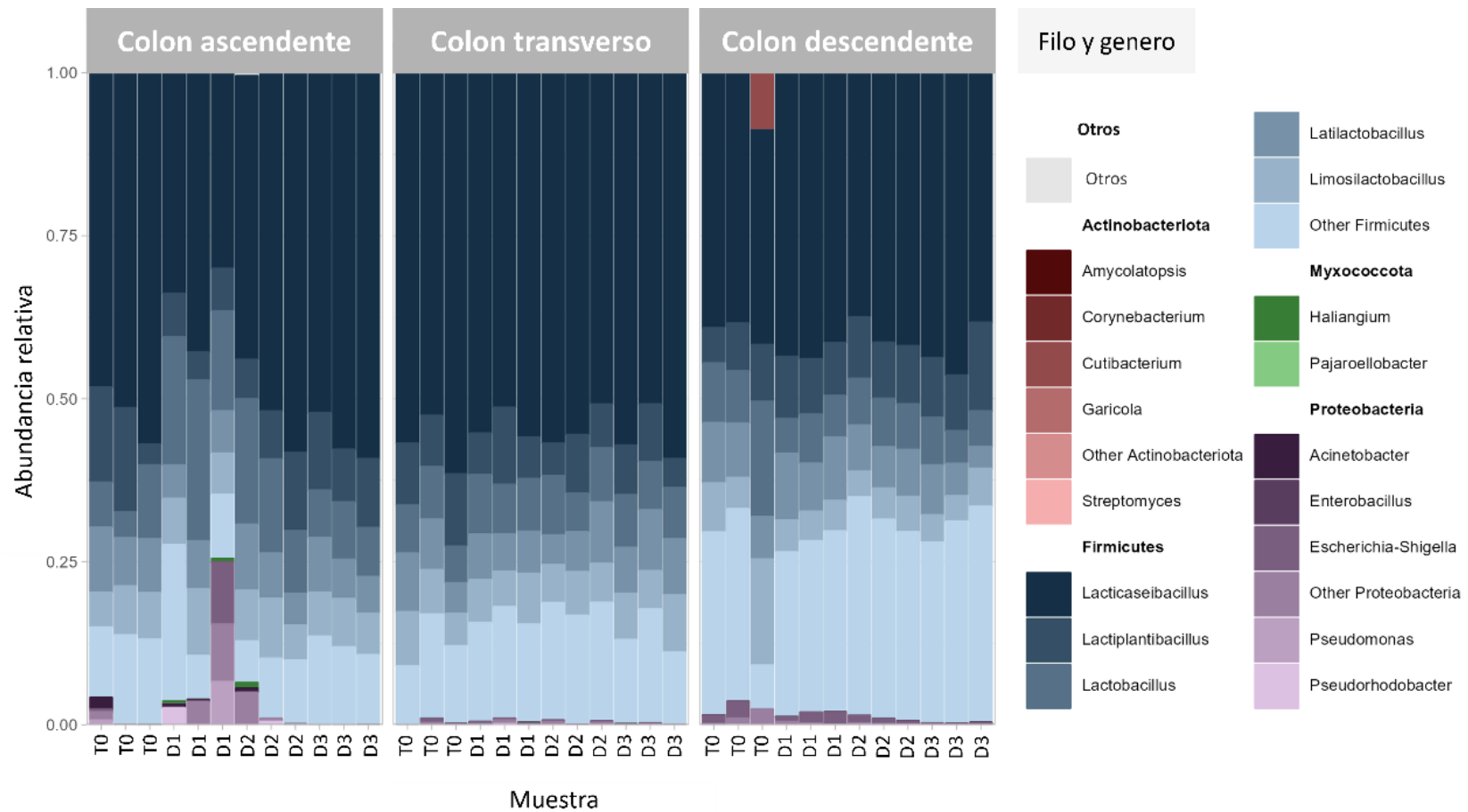


Figura 23. Abundancia relativa de los géneros más abundantes de los cinco filios más abundantes del grupo MIN de personas con obesidad. T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3.

El género *Lacticaseibacillus* fue el más prevalente en el grupo MIE (**Figura 24**) especialmente en el CT. No obstante, tras la inoculación con el coctel de bacteriófagos y en el proceso de la tercera digestión, la abundancia relativa de este género disminuyó en el CT, mientras que aumentó en CA y CD en comparación con el tiempo 0. El posible género *Escherichia-Shigella* apareció en el octavo lugar entre los más prevalentes en el grupo. Se observaron variaciones significativas en su abundancia relativa entre las diferentes regiones del intestino grueso y a lo largo del tiempo. En el CA en el tiempo 0, *Escherichia-Shigella* representaba el 11.5 % de la abundancia relativa, pero fue disminuyendo progresivamente, alcanzando solo el 0.5 % para la tercera digestión. En el CT, el género comenzó con un 2.2 % en el tiempo 0, experimentando una reducción hasta 0.8 % en la digestión 1. Luego, se observó un ligero aumento, llegando a 2.1 % en la digestión 3. El CD presento una abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* de 0.3 % en el tiempo 0, aumentó ligeramente a 0.4 % en la primera digestión, y luego se estabilizó en 0.2 % en las dos últimas digestiones. En cuanto a los filos, Firmicutes y Proteobacteria fueron los más abundantes (**Figura 25**).

Una diferencia notable entre los grupos MIN y MIE fue el género *Enterococcus*. Este género ocupó el sexto lugar en el grupo MIN, pero no estaba entre los 15 géneros más prevalentes en el CA. En el grupo MIE, *Enterococcus* fue el segundo género más abundante en todas las regiones del intestino grueso, con mayor prevalencia en el CD.

	Colon ascendente				Colon transverso				Colon descendente			
<i>Firmicutes; Lacticaseibacillus</i> -	43.1	31.3	33.9	54.8	59.1	60.7	56.8	52.4	30.2	34.7	32.2	34.4
<i>Firmicutes; Enterococcus</i> -	4.9	8.9	4.2	0.2	1.3	1.1	2.3	4.2	24	20.2	17	14.3
<i>Firmicutes; Lactiplantibacillus</i> -	11	9.1	12.7	11.9	8.9	8	6.8	9.8	3.8	5.1	4.5	5.4
<i>Firmicutes; Lactobacillus</i> -	5.9	6.9	11.3	9	7.1	6.9	9.5	7.4	5.5	5.4	5.2	4.8
<i>Firmicutes; Latilactobacillus</i> -	6.7	3.8	4.6	8.8	7.3	8.4	6.9	8.1	4.3	5.4	4.3	5.4
<i>Firmicutes; Limosilactobacillus</i> -	4.8	3.1	5.4	5.3	5.5	6	6.5	5.4	2.7	3.6	3.7	3.5
<i>Firmicutes; Bacillus</i> -	0.4	1	1.3	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	9.4	7.1	7.3	4.5
<i>Proteobacteria; Escherichia-Shigella</i> -	11.5	7.6	2	0.5	2.2	0.8	1.3	2.1	0.3	0.4	0.2	0.2
<i>Firmicutes; Staphylococcus</i> -	0.2	0.4	0.3	0	0	0	0	0.1	1.1	2.9	10.6	12.9
<i>Firmicutes; Streptococcus</i> -	0.6	1.6	0.2	0	0.2	0.3	0.4	0.9	6.9	5.8	5.2	4.7
<i>Firmicutes; Pediococcus</i> -	1.4	1.9	1.3	2.5	2.3	2.2	2.7	2.3	1.3	1.5	1.3	1.3
<i>Firmicutes; Levilactobacillus</i> -	3.8	3.2	3.7	2.8	0.8	0.6	1.2	1.6	0.7	0.3	0.6	0.9
<i>Firmicutes; Weissella</i> -	1.5	1.1	1.3	2	1.9	1.8	1.8	1.8	1.1	1.1	0.8	1.5
<i>Firmicutes; Granulicatella</i> -	0.2	0.6	2.9	0	0.1	0.1	0.3	0.4	1.7	1.3	1.3	1.5
<i>Firmicutes; Lentilactobacillus</i> -	0.5	0.4	0.4	0.6	0.6	0.7	0.9	0.7	0.9	0.9	0.8	0.7
	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3	Tiempo 0	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3

Figura 24. Mapa de calor de los filos y géneros más abundante durante el bioensayo del grupo MIE. Los valores representan las medias en porcentaje de las abundancias relativas de tres pruebas.

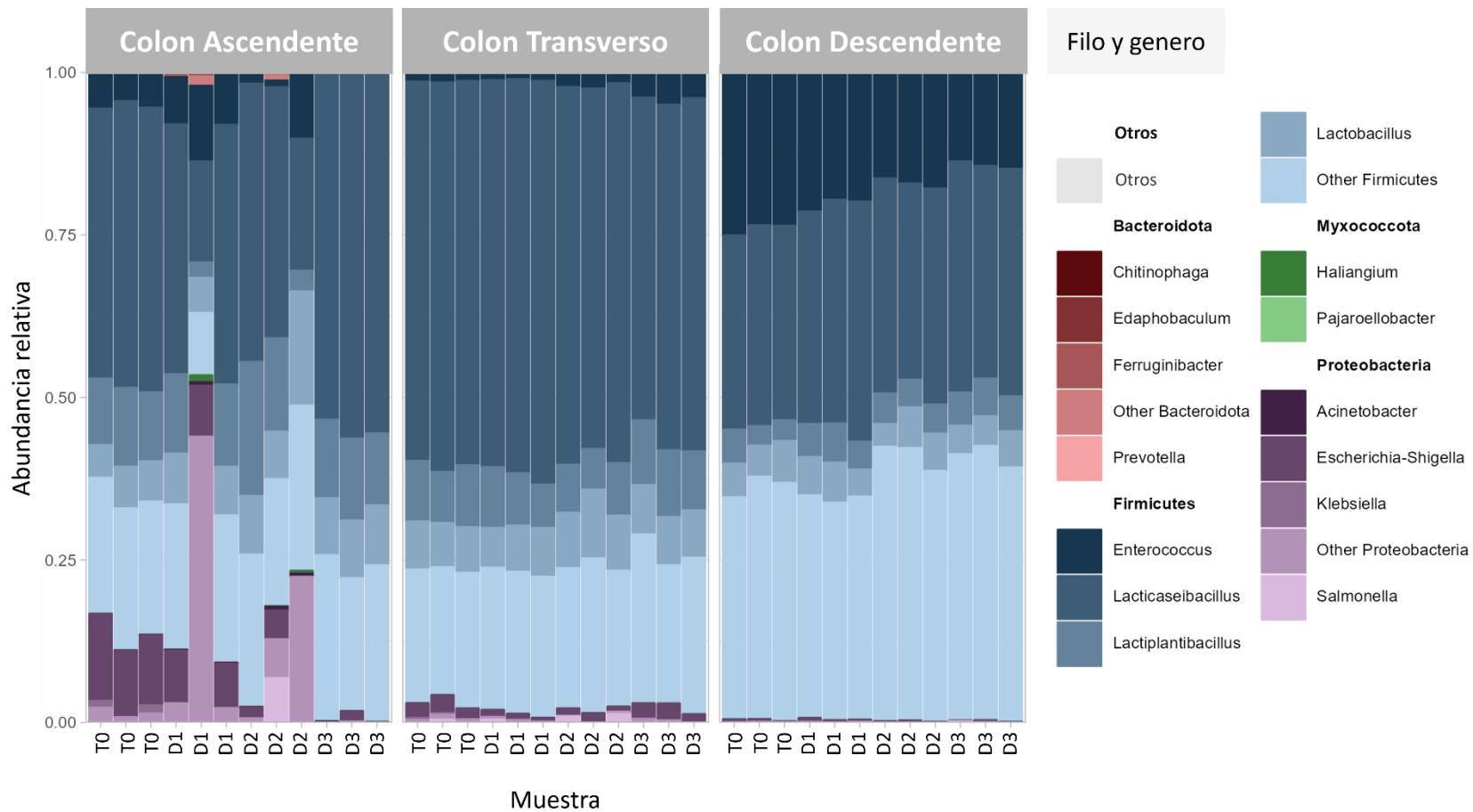


Figura 25. Abundancia relativa de los géneros más abundantes de los cinco filos más abundantes del grupo MIE de personas con obesidad. T0: tiempo 0; D1: digestión 1; D2: digestión 2; D3: digestión 3.

6.3.2.4 Conteo de secuencias del gen ARNr 16s de *Enterobacter cloacae*

En el grupo MIN, se observaron menos de 2 secuencias del gen ARNr 16s de *Enterobacter cloacae* en los diferentes tiempos de las tres regiones del intestino grueso. Sin embargo, en el grupo MIE (**Tabla 12**) se presentó una mayor abundancia de las secuencias, siendo en el T0 más representativo. Además, conforme aumentaron las digestiones, se presentó una disminución gradual de las secuencias. Siendo en el CT la región del intestino grueso en donde más proliferó *Enterobacter cloacae*.

Tabla 12. Secuencias del gen ARNr 16s de *Enterobacter cloacae* del grupo MIE.

Tiempo	Colon ascendente	Colon transverso	Colon descendente
Tiempo 0	7 ± 5	79.67 ± 10	18 ± 8.88
Digestión 1	3 ± 1	31 ± 10	16.33 ± 6
Digestión 2	1.67 ± 2	26.33 ± 18.33	8 ± 5
Digestión 3	0.33 ± 0.5	21.67 ± 7.63	2.33 ± 1.52

Los valores son las medias de tres pruebas ± desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

La presencia de bacterias en la microbiota intestinal asociada a la inflamación crónica de bajo grado en la obesidad plantea un escenario intrigante y relevante para la investigación terapéutica. La identificación de estos patrones únicos abre la puerta a posibles objetivos terapéuticos que podrían abordar directamente las bases microbianas de la inflamación. En este sentido, la modulación de la microbiota emerge como una estrategia prometedora para el tratamiento y sus complicaciones asociadas (Shan et al., 2022). Las aproximaciones terapéuticas tradicionales a menudo carecen de selectividad. En este contexto, la terapia con bacteriófagos se presenta como una alternativa innovadora y promisoria. Para ello, es crucial la caracterización genómica y biológica de los bacteriófagos para la formulación del coctel, así como evaluar su efecto en la microbiota intestinal (Divya Ganeshan y Hosseinidoust, 2019; Mutai et al., 2022).

El título viral se presenta como una herramienta fundamental para cuantificar la concentración de bacteriófagos en una muestra, según Kaletta et al. (2020). En promedio, los 9 bacteriófagos analizados exhibieron un título viral de 7.55×10^{10} PFU/mL. Este parámetro no solo permite identificar en una primera instancia si los bacteriófagos poseen un ciclo de vida lítico, sino que también contribuye significativamente a la determinación de la dosificación adecuada en terapias según la perspectiva de Glonti y Pirnay (2022). Este enfoque busca lograr el efecto terapéutico deseado sin provocar efectos secundarios no deseados.

El rango de hospederos de un bacteriófago se define por la cantidad de especies y cepas que puede infectar, mostrando una variabilidad aparente en cuanto a los huéspedes involucrados (Holtzman et al., 2020). Algunos bacteriófagos infectan únicamente un subconjunto reducido de huéspedes

bacterianos, mientras que otros presentan un amplio espectro de huéspedes, como señala Holtappels et al. (2023). En el presente estudio, se evaluó el rango de hospederos de los bacteriófagos AS1, AS2, AS3A, AS3B, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8 utilizando 24 cepas como hospedero. Los resultados revelaron que estos bacteriófagos exhibieron tres patrones similares, siendo capaces de infectar a cepas pertenecientes a enterobacterias, como *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* MIC29, *Enterobacter cloacae* EcC1, *Citrobacter freundii* 8090, *Enterobacter hormaechei* 700323, *Shigella sonnei* 25931 y *Citrobacter braakki* 51113. Este hallazgo respalda la afirmación de Paule et al. (2018), de que el espectro de infección tiende a ser más común entre bacterias del mismo género e inclusive de la misma familia. Adicionalmente, se observó que los bacteriófagos AS1, AS3B y AS5 demostraron la capacidad de infectar tres cepas distintas de *Enterobacter cloacae* con orígenes de aislamiento diversos. Este fenómeno resalta la versatilidad y adaptabilidad de estos bacteriófagos. En una investigación relacionada, el rango de hospederos del bacteriófago MJ2 se exploró en 34 cepas bacterianas, evidenciando su capacidad para infectar 3 aislados de EC. Este mismo bacteriófago exhibió actividad lítica contra *Achromobacter xylosoxidans* y *Klebsiella pneumoniae*, pertenecientes a géneros completamente diferentes, según lo reportado por Jamal et al. (2019). Es importante señalar que hasta el momento no existen estándares claros en cuanto al número mínimo de cepas que deben someterse a prueba en el análisis del rango de hospederos o al número de huéspedes que un bacteriófago debe infectar para considerarse que tiene un rango de huéspedes amplio (Fong et al., 2021). No obstante, se destaca la existencia de bacteriófagos monovalentes que se vinculan a un receptor específico, mientras que los bacteriófagos polivalentes pueden reconocer múltiples receptores en la superficie celular o incluso un componente conservado entre distintos huéspedes (Vasquez et al., 2023), esta característica amplía significativamente el rango general de hospederos.

Los resultados obtenidos de las pruebas de cinética de lisis reflejaron la eficaz capacidad de los bacteriófagos para inhibir el crecimiento de la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Al evaluar diversos bacteriófagos, se identificó que AS1, AS2, AS3B, AS4 y AS5 exhibieron un efecto bactericida en un intervalo de tiempo comprendido entre 7 y 10 horas. Contrariamente, AS3A, AS6, AS7 y AS8 demostraron una acción que superó las 10 horas, manteniendo un efecto lítico constante con una densidad óptica inferior a la del control positivo (bacteria). En el estudio realizado por Ali et al. (2024), emplearon al bacteriófago ECFLM1 contra *Enterobacter cloacae*, se observó que la absorbancia del cultivo infectado con bacteriófagos aumentó gradualmente de manera dependiente de la MOI durante las primeras 3 horas y disminuyó gradualmente entre las horas 3 y 10. Se puede anticipar que la actividad bacteriolítica en este tipo de estudio incrementa con el aumento de las MOI, tal como se ha observado en estudios previos (Ciešlik et al., 2022). Mientras que Khawaja et al. (2016) encontraron que los bacteriófagos evaluados en su estudio redujeron el crecimiento de *Enterobacter cloacae* durante las 8 a 18 horas posteriores a la infección. No obstante, después de 18 horas, se observó el desarrollo de bacterias resistentes, alcanzando una densidad óptica similar al control no infectado, 24 horas después de la infección. Se ha informado que en promedio, los procariotas codifican cinco mecanismos de defensa antivirales en su genoma (Tesson et al., 2022). El crecimiento observado en las curvas post-infección por los bacteriófagos podría asociarse con la posible resistencia bacteriana a través del mecanismo del sistema CRISPR-Cas, según lo sugerido por Finney et al. (2022).

Después de evaluar las características biológicas de los bacteriófagos de manera individual, se procedió a la formulación de tres cocteles, cada uno compuesto por dos bacteriófagos. Estos cocteles fueron sometidos a una evaluación exhaustiva de su capacidad bacteriolítica en diferentes MOI. Entre ellos, el coctel conformado por los bacteriófagos AS5 y AS6 destacó por exhibir

el mayor efecto lítico sobre la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Este coctel demostró un efecto bactericida en un intervalo de tiempo que oscila entre 9 y 10 horas, manteniendo una densidad óptica consistentemente inferior a 0.09 en todas las MOI estudiadas. En contraste, (Nasr-Eldin et al., 2023a) llevaron a cabo la evaluación de un coctel de bacteriófagos, observando una significativa reducción en el crecimiento de *Enterobacter cloacae*. Esta disminución se evidenció notablemente en la densidad óptica, alcanzando su punto más bajo a la hora 6 y manteniéndose durante aproximadamente 24 horas de incubación con una MOI de 0.1. El desarrollo de técnicas terapéuticas bacterianas alternativas, como la combinación de diferentes bacteriófagos (coctel) o el uso de otros agentes biocidas, es fundamental para el control bacteriano (Divya Ganeshan y Hosseinidoust, 2019).

En la evaluación de los bacteriófagos para su potencial aplicación en fagoterapia, un componente esencial radica en el exhaustivo análisis de su genoma, según destacan Babkin y Tikunova (2023). No obstante, en contraste con los fagos que afectan a otras bacterias, se ha caracterizado un número limitado de fagos dirigidos a *Enterobacter cloacae* y las secuencias de genoma disponibles son escasas (Cook et al., 2021), así como para la comprensión de los mecanismos de interacción fago-huésped. El análisis genómico de estos bacteriófagos se llevó a cabo mediante una búsqueda BLAST en la base de datos GenBank, se utiliza un conjunto de algoritmos de uso común para identificar coincidencias entre secuencias biológicas, abordando la clasificación taxonómica y la identificación de sus parientes más cercanos (Cheng et al., 2022a). Ambos bacteriófagos no presentaron genes asociados a virulencia, lisogenia y resistencia a antibióticos. La ausencia de estos genes es un punto clave para la seguridad del uso de estos bacteriófagos en la terapia (Tao et al., 2023).

Durante el análisis del genoma del bacteriófago AS5, se identificó que el genoma de referencia que presenta la mayor homología es el del

bacteriófago Henu7 de *Escherichia*, exhibiendo una similitud intergenómica del 85.9 %. Este bacteriófago se clasifica dentro del género *Henuseptimavirus* de la familia *Drexelviridae*. En la búsqueda de criterios para la creación de géneros cohesivos y distintos, se ha establecido un límite del 70 % de identidad de nucleótidos en la longitud total del genoma para la definición de géneros (Turner et al., 2021b).

Los bacteriófagos dentro de la familia *Drexelviridae* se consideran bacteriófagos tipo T1, con una afinidad principal hacia el género *Escherichia*. No obstante, se han documentado casos aislados de estos bacteriófagos infectando otros géneros como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Shigella* (Adriaenssens et al., 2020). Caracterizados por una cabeza icosaédrica de aproximadamente 60 nm y una cola delgada de alrededor de 150 nm, los bacteriófagos tipo T1 presentan una morfología de *Siphovirus* (Koonjan et al., 2020). Su naturaleza lítica y altas tasas de adsorción los posicionan como candidatos destacados en el desarrollo de la terapia con bacteriófagos (Hosseini-doust, 2019). El módulo de lisis de estos bacteriófagos incorpora el sistema canónico holina-endolisina, que desempeña un papel crucial en la liberación de viriones durante las etapas finales del ciclo de vida lítico, culminando en la lisis celular y, por ende, la muerte del huésped (Wu et al., 2021). Mientras las endolisinas se encargan de degradar el peptidoglicano en la pared celular, las holinas permeabilizan la membrana celular (Cahill y Young.,2019). De manera significativa, la principal distinción observada en la comparación genómica radica en una fibra de la cola, lo que sugiere una posible alteración en el rango de huéspedes de los bacteriófagos analizados. Adicionalmente, el análisis del índice de identidad de nucleótidos promedio reveló que el bacteriófago AS5 constituye una especie nueva dentro del género *Henuseptimavirus*, conforme a los criterios establecidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), según lo descrito por Turner et al. (2021a). En un estudio reciente, Bseikri et al. (2023) detallaron dos

bacteriófagos de *Klebsiella* ubicados en este mismo género, los cuales exhibieron actividad antibiopelícula destacada tanto en microplacas como en catéteres. La eficacia demostrada sugiere su potencial como estrategia de intervención para las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres. En este contexto, los bacteriófagos pertenecientes al género *Henuseptimavirus* muestran una actividad lítica eficiente contra un grupo bacteriano específico, en consonancia con nuestro propósito previsto para la terapia con bacteriófagos.

En una perspectiva diferente, se identificó que el genoma de referencia que presentaba la mayor homología con el bacteriófago AS6 corresponde al bacteriófago PG7 de *Enterobacter*, mostrando una identidad intergenómica del 91.7 %. Este bacteriófago se clasifica dentro del género *Karamvirus*, situado ahora en la familia *Straboviridae*. Cabe destacar que esta familia ahora incluye a los bacteriófagos previamente categorizados como "tipo T4", tras su clasificación previa en la ahora abolida familia *Myoviridae*, según lo informado por Turner et al. (2023). Los bacteriófagos T4 están compuestos por una cabeza que protege su genoma y una cola envainada para insertar dicho genoma en un huésped. La cola finaliza con una placa base multiproteica que modifica su conformación de una estructura en forma de cúpula a una estructura en forma de estrella durante el proceso de infección (Yap et al., 2016).

En cuanto al módulo de lisis de estos bacteriófagos, se destaca la presencia, además de holina y espanina, de una lisozima, un tipo de endolisina que escinde el enlace glicano en el lado reductor del ácido N-acetilmurámico dentro del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Ramesh et al., 2022). Esto adquiere relevancia dado que hasta el momento, no se ha documentado resistencia alguna a las endolisinas (María et al., 2022). Cabe resaltar que se identificaron 19 ARNt, considerados un paso clave en la biosíntesis de proteínas, mientras que los bacteriófagos sin ARNt dependen

del mecanismo de traducción del huésped (Tan et al., 2023). En un estudio de caracterización del bacteriófago ECLFM1 llevado a cabo por Ali et al. (2024), se encontró que su genoma estaba estrechamente relacionado con el bacteriófago PG7 de *Enterobacter*, con una cobertura del 95 % y una similitud del 97.4 %. Esta relación resultó ser más cercana que la observada entre el bacteriófago AS6 y el Henu7. Mientras que Andrezal et al. (2023) con el bacteriófago Pet-CM3–4, tuvieron una similitud intergenómica del 89 %. Finalmente, los resultados de la prueba ANI revelaron que el bacteriófago AS6 representa una nueva especie dentro del género *Karamvirus*, según los criterios del ICTV. Informes previos sugieren que los bacteriófagos dentro de este género exhiben un efecto terapéutico prometedor, destacando su potencial con una caracterización integral del receptor del huésped.

El proceso adecuado de aislamiento y caracterización de bacteriófagos de *Enterobacter cloacae* desempeña un papel esencial en el avance de nuestra comprensión de su función en el ecosistema, así como en la interacción y coevolución con su huésped (Suh et al., 2022). Tras la caracterización genómica y biológica de los bacteriófagos, se implementó un modelo *ex vivo* para simular las tres regiones del intestino grueso, inoculándolo con heces de individuos con obesidad. El análisis microbiológico reveló un crecimiento constante de la microbiota intestinal en los biorreactores, alcanzando la estabilización para el día 21 de la simulación. Los resultados obtenidos presentan similitudes con el estudio de Laforêt et al. (2023), quienes emplearon biorreactores para simular una microbiota de población abierta y observaron una estabilización comparable en el día 23. Este paralelismo fortalece la validez y reproducibilidad de nuestros hallazgos, respaldando la complejidad de la metodología utilizada y su aplicabilidad en diversos contextos experimentales.

En la fase siguiente del estudio, se procedió con la inoculación del coctel de bacteriófagos en los biorreactores, tomando muestras antes y después de

tres digestiones completas. Al examinar el título viral en el tiempo 0 en las tres regiones del intestino grueso, no se detectaron bacteriófagos. Este fenómeno podría atribuirse a la probable afectación de las poblaciones nativas de bacteriófagos, especialmente durante la presencia y progresión de la obesidad, como ha sido señalado por Palmas et al. (2021b). Sin embargo, tras la inoculación del coctel, se observó la supervivencia sostenida de los bacteriófagos a lo largo del tiempo, destacando su capacidad de adaptación al ecosistema bacteriano del tracto gastrointestinal humano (Zuppi et al., 2021). En contraste, se evidenció una disminución en el conteo de enterobacterias en las tres regiones del intestino grueso. Estas bacterias, que pertenecen a la familia que alberga a *Enterobacter cloacae*, tienden a localizarse cerca de la mucosa intestinal debido a su tolerancia relativamente mayor al oxígeno. A pesar de ser anaerobios facultativos, agotan el oxígeno para crear un ambiente reducido propicio para su colonización (Baldelli et al., 2021). Es relevante destacar que la modulación fue más pronunciada en el CD, sugiriendo que las condiciones de pH en cada región pueden desempeñar un papel significativo. Investigaciones anteriores han indicado que un aumento del pH en el intestino grueso puede prevenir el crecimiento de bacterias patógenas, especialmente de la familia *Enterobacteriaceae*, que suelen ser sensibles a ambientes ácidos (Yamamura et al., 2023). En este contexto, se asocia una mayor proliferación de estas bacterias en el CT y el CD. Este hallazgo subraya la influencia potencial de las condiciones de pH en la modulación de la microbiota intestinal, destacando la complejidad de las interacciones presentes.

En el análisis del conteo bacteriano con metabolismo similar a *Lactobacillus* spp, *Salmonella* spp, *Bifidobacterium* spp y *Clostridium* spp, se destacó una modulación más significativa en el grupo MIN en comparación con el grupo MIE. En el estudio de Bianchi et al. (2018), quienes llevaron a cabo fermentación en biorreactores simulando el intestino grueso utilizando pectina cítrica en combinación con *Bifidobacterium longum* BB-46 en microbiota de

personas con obesidad. Los resultados generales indicaron un aumento en los taxones pertenecientes al filo Firmicutes. Específicamente, se observó un marcado aumento en las familias *Ruminococcaceae* y en miembros de *Succinivibrionaceae* durante los tratamientos T2 (pectina con BB-46) y T3 (pectina), respectivamente.

Para obtener una visión completa de la comunidad bacteriana en los grupos de estudio, se realizaron análisis de secuenciación, centrados en el gen ARNr 16s. Este tipo de análisis permite examinar la diversidad del ecosistema intestinal, proporcionando información detallada sobre la composición y función de la microbiota (Liu et al., 2021; Schloss Patrick, 2024). Los datos obtenidos sobre la alfa diversidad se usaron para explorar la riqueza y uniformidad de la microbiota en las diferentes regiones del intestino grueso. Estudios previos sugieren que la microbiota de personas con obesidad suele ser menos diversa que la de personas con un peso normal, lo cual se atribuye en parte a dietas altas en calorías pero bajas en diversidad de alimentos (Rakhra et al., 2020). Además, se ha sugerido que la composición del microbioma podría estar más relacionada con la elección de alimentos específicos que con patrones nutricionales generales (Meslier et al., 2020). En esta línea, el estudio de Tong et al. encontró que la alfa diversidad de las personas con obesidad era significativamente menor que la de las personas sanas, aunque no se observaron diferencias significativas en la beta diversidad. Otro estudio en ratones inducidos a obesidad mostró una disminución en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal, junto con un aumento en la inflamación por macrófagos M1 y un deterioro en las uniones estrechas entre las células epiteliales del colon (Zhang et al., 2019).

En nuestro estudio, en el grupo MIN, se observó que después de un incremento inicial en los índices de alfa diversidad tras la primera digestión, hubo una tendencia a una reducción en la riqueza y uniformidad durante la tercera digestión. Los valores de los parámetros regresaron a niveles similares

a los del tiempo 0. Este patrón podría ser consecuencia de una disminución del efecto del coctel de bacteriófagos o de un ajuste ecológico en la comunidad bacteriana. Estudios adicionales sugieren que en intervenciones más prolongadas con prebióticos se observan cambios en biomarcadores relacionados con la obesidad (Joung et al., 2021; Neyrinck et al., 2021). En el grupo MIE, aunque se observaron picos en los valores de los indicadores durante las dos primeras digestiones, seguidos de una disminución en la tercera digestión, estos valores se mantuvieron más altos que en el grupo MIN.

En el análisis de beta diversidad, se observaron patrones de agrupación entre los tiempos y las diferentes regiones del intestino grueso. En ambos grupos, el CA y el CT tendieron a agruparse en el mismo plano, lo que sugiere que estas dos regiones tienen composiciones microbianas más similares entre sí, posiblemente debido a un pH parecido. Los microorganismos intestinales emplean diversas rutas de fermentación para obtener energía y proliferación, la elección de estas rutas puede depender de factores como el pH y los sustratos disponibles en el lumen intestinal, jugando un papel importante en la composición (Ilhan et al., 2017). El pH a lo largo del intestino grueso puede variar de aproximadamente 5 a 7, el CD tiende a ser más alcalino (Koziolek et al., 2015). Esto podría explicar la similitud observada entre el CA y el CT, dado que ambos están en un rango de pH más ácido comparado con el CD.

Un estudio realizado por Peters et al. (2018) evaluó la microbiota intestinal de 599 adultos mayores con normopeso u obesidad y encontró que varios subtaxones dentro del filo Firmicutes estaban asociados con la obesidad. Específicamente, la clase *Bacilli* y las familias *Streptococcaceae*, *Gemellaceae* y *Lactobacillaceae* se encontraron en niveles más elevados en los participantes con obesidad en comparación con los de peso saludable. En nuestra investigación, al analizar la abundancia relativa en las muestras, identificamos que el género *Lacticaseibacillus* fue el más prevalente en ambos grupos y en las tres regiones del intestino grueso. Sin embargo, tras la

aplicación del tratamiento con un coctel de bacteriófagos, observamos un aumento en la tercera digestión en el CA y el CD, lo que podría indicar una respuesta específica a la intervención. Una investigación reciente con animales estudió el efecto de una nueva cepa probiótica, *Lacticaseibacillus paracasei* K56, aislada del intestino de un niño sano. Los ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante 12 semanas recibieron varias dosis de esta cepa a través de sonda forzada. Los resultados mostraron una reducción significativa en la masa grasa y mejoras en el metabolismo de los lípidos (Min et al., 2021). En un estudio clínico que evaluó el efecto de un coctel de probióticos que incluía *Lacticaseibacillus* en mujeres con obesidad, no se observó una variación global en la composición filogenética de la microbiota intestinal. No obstante, se notaron cambios específicos en ciertos taxones, lo que sugiere la necesidad de estudios adicionales para determinar si estas modificaciones podrían explicar los efectos beneficiosos previamente descritos para estas cepas probióticas (Gomes et al., 2020). Aunque varias cepas de *Lactobacillus* spp. pueden tener un impacto positivo en la reducción de la obesidad, es importante tener en cuenta que diferentes cepas bacterianas del mismo género o especie pueden responder de manera diferente a la misma intervención. Por lo tanto, se vuelve crucial investigar el efecto modulador de los probióticos sobre la microbiota intestinal a nivel de cepa para comprender plenamente sus beneficios potenciales (Sun et al., 2023). Al analizar la presencia del género *Enterobacter*, identificamos OTUs que fueron asignadas a lecturas con similitudes genéticas cercanas a géneros como *Escherichia-Shigella*. Todos estos géneros, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y comparten una estrecha relación filogenética (Octavia y Lan, 2014). Durante el periodo de intervención, observamos una tendencia decreciente en la abundancia de estos géneros en ambos grupos de estudio. El análisis BLAST confirmó la ausencia de *Enterobacter cloacae* en el grupo MIN y su presencia en el grupo MIE. Esto se debe a que la microbiota intestinal en el grupo MIE estaba enriquecida con *Enterobacter cloacae* (bacteria

hospedera del cóctel de bacteriófagos). Por lo tanto, en el grupo MIE se observó una disminución gradual de las secuencias del gen ARNr 16s a lo largo del tiempo, lo que podría ser consecuencia de los tratamientos aplicados. En este mismo grupo, el género *Enterococcus* también fue detectado, mostrando una disminución en la digestión 3 tanto en el CA como en el CD. *Enterococcus faecalis* (EF) es una bacteria que se encuentra naturalmente en la microbiota intestinal de humanos. Sin embargo, cuando ocurre disbiosis intestinal (característica en la obesidad), EF puede comportarse como un patobionte y tiene la capacidad de atravesar la barrera intestinal, lo que puede tener implicaciones para la salud (Repoila et al., 2022).

Es importante destacar la alta prevalencia de bacterias del filo Firmicutes, que es congruente con los hallazgos de Duan et al. (2021), quienes señalaron que la microbiota de personas con obesidad tiende a tener una mayor proporción de este filo. Aun así, la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad es mucho más compleja que un simple desequilibrio de estos grupos bacterianos (Tseng y Wu, 2019). El seguimiento longitudinal de las distintas especies bacterianas revela que la depredación por parte de los bacteriófagos puede provocar cambios significativos en la composición de la microbiota, incluso desencadenando efectos en cascada en otras especies a través de interacciones interbacterianas (Hsu et al., 2019).

La modulación de la microbiota intestinal por el coctel de bacteriófagos en ambos grupos está presente en este estudio, pero para entender completamente el impacto de estas intervenciones, se requiere una evaluación a nivel sistémico, para conocer si los cambios observados en la comunidad microbiana influyen en parámetros antropométricos, bioquímicos, clínicos y dietéticos. Estas variables ofrecen un conjunto integral de biomarcadores para estudiar la evolución de la obesidad en los pacientes (Lustig et al., 2022; Reche-García et al., 2023). Al monitorear estos parámetros, se puede obtener una imagen más completa de cómo la modulación de la microbiota afecta la

salud general y específicamente cómo podría contribuir a la gestión y prevención de la obesidad. El análisis de la relación entre el microbioma y la obesidad es un campo que requiere investigaciones continuas para desentrañar los complejos mecanismos subyacentes.

8. CONCLUSIONES

Este estudio ha proporcionado una visión detallada de los bacteriófagos dirigidos a *Enterobacter cloacae*. La investigación ha abordado diversos aspectos clave, desde la caracterización genómica y biológica de los bacteriófagos hasta la formulación de cocteles terapéuticos y la evaluación de su efecto sobre la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Los bacteriófagos AS1, AS2, AS3A, AS3B, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8, presentan un rango de hospederos estrecho, con la capacidad para infectar diversas cepas pertenecientes a enterobacterias, lo que refleja su versatilidad y adaptabilidad. Las pruebas de cinética de lisis han revelado la eficacia de estos bacteriófagos para inhibir el crecimiento de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, destacando diferencias en el tiempo de acción entre los distintos bacteriófagos. La formulación de cocteles, especialmente el compuesto por los bacteriófagos AS5 y AS6, ha demostrado un impacto bactericida significativo en un intervalo de tiempo específico, lo que sugiere su potencial aplicación terapéutica. El análisis genómico ha proporcionado información valiosa sobre la relación filogenética de los bacteriófagos AS5 y AS6, identificando su clasificación dentro de los géneros *Henuseptimavirus* y *Karamvirus*, respectivamente. La ausencia de genes asociados a virulencia, lisogenia y resistencia a antibióticos, en ambos bacteriófagos, subraya su seguridad potencial para la terapia. Con respecto a la evaluación del coctel de bacteriófagos en el modelo *ex vivo*, la microbiota intestinal en los biorreactores proliferó de acuerdo con lo planteado y podemos observar que existen variaciones de la composición de la microbiota, de acuerdo con la región del intestino grueso. Una vez inoculado el coctel de bacteriófagos se observó la supervivencia de los bacteriófagos a lo largo de las digestiones, así como cambios en los resultados de conteo bacteriano, específicamente disminución de enterobacterias. Con los análisis genómicos, confirmamos la modulación de la microbiota intestinal en las 3 regiones del intestino grueso en ambos grupos al observar la riqueza y uniformidad de la composición en los diferentes tiempos de intervención.

Siendo más notoria en el grupo en donde se encontraba la bacteria hospedero del coctel de bacteriófagos (MIE).

Los hallazgos de este estudio respaldan la noción de que los bacteriófagos son candidatos prometedores para la terapia contra *Enterobacter cloacae*, ofreciendo una alternativa innovadora y selectiva en comparación con enfoques terapéuticos convencionales. Además, la diversidad y adaptabilidad de estos bacteriófagos sugieren un amplio potencial para abordar la variabilidad genética de *Enterobacter cloacae* y su capacidad de adaptación. Sin embargo, es crucial continuar investigando el efecto sistémico que puede ocasionar el uso de estos bacteriófagos en el contexto de la obesidad.

9. RECOMENDACIONES

Es importante investigar el impacto sistémico resultante de la administración de este coctel de bacteriófagos en un modelo *in vivo*, con un enfoque principal en la evaluación de la microbiota intestinal a través de técnicas de metagenómica. Simultáneamente se propone analizar la producción de LPS y la respuesta inmunológica mediante expresión génica de interleucinas y hormonas producidas en la obesidad. Además, se sugiere realizar ensayos de dosificación para obtener datos más detallados sobre la eficacia y seguridad del tratamiento.

Adicionalmente, se destaca la necesidad de trabajar en el diseño de un encapsulado específico, orientado a la liberación controlada del coctel de bacteriófagos en el intestino grueso. La evaluación de este encapsulado en condiciones gastrointestinales se revela como un paso crítico para comprender la estabilidad del coctel en el entorno estomacal e intestino delgado. Estas investigaciones proporcionarán información esencial para garantizar la viabilidad y eficacia del coctel de bacteriófagos en las condiciones fisiológicas relevantes. Estos análisis y evaluaciones previstos tienen el propósito de corroborar la eficacia y seguridad del coctel de bacteriófagos como un modulador terapéutico para la microbiota intestinal en individuos con obesidad para poder llegar a ensayos clínicos.

10. REFERENCIAS

- AbdelMassih, A., Eid, M., Gadalla, M., AbouShadi, N., Youssef, S., Ali, B., et al. (2023). Is microbiota a part of obesogenic memory? Insights about the role of oral and gut microbiota in re-obesity. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 124. doi:10.1186/s42269-023-01095-w
- Adriaenssens, E. M., Sullivan, M. B., Knezevic, P., van Zyl, L. J., Sarkar, B., Dutilh, B. E., et al. (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Archives of virology*, 165(5), 1253-1260.
- Aghili, S. M. M., Ebrahimpur, M., Arjmand, B., Shadman, Z., Pejman Sani, M., Qorbani, M., et al. (2021). Obesity in COVID-19 era, implications for mechanisms, comorbidities, and prognosis: a review and meta-analysis. *International Journal of Obesity*, 45(5), 998-1016. doi:10.1038/s41366-021-00776-8
- Ahmed, S., Chauhan, V. M., Ghaemmaghami, A. M., & Aylott, J. W. (2019). New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. *Biotechnol Lett*, 41(1), 1-25. doi:10.1007/s10529-018-2611-7
- AlAssal, K., Martinez, A. C., Torrinhas, R. S., Cardinelli, C., & Waitzberg, D. (2018). Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental*, 20, 60-64. doi:https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.03.001
- Ali, S. F., Teh, S. H., Yang, H. H., Tsai, Y. C., Chao, H. J., Peng, S. S., et al. (2024). Therapeutic Potential of a Novel Lytic Phage, vB_EcIM_ECLFM1, against Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*. *Int J Mol Sci*, 25(2). doi:10.3390/ijms25020854
- Altveş, S., Yildiz, H. K., & Vural, H. C. (2020). Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Biosci Microbiota Food Health*, 39(2), 23-32. doi:10.12938/bmfh.19-023
- Anders, J. L., Moustafa, M. A. M., Mohamed, W. M. A., Hayakawa, T., Nakao, R., & Koizumi, I. (2021). Comparing the gut microbiome along the gastrointestinal tract of three sympatric species of wild rodents. *Scientific Reports*, 11(1), 19929. doi:10.1038/s41598-021-99379-6
- Andrezal, M., Oravcova, L., Kadličekova, V., Ozaee, E., Elnwrani, S., Bugala, J., et al. (2023). Characterization and the host specificity of Pet-CM3-4, a new phage infecting *Cronobacter* and *Enterobacter* strains. *Virus Research*, 324, 199025. doi:https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199025
- Anjana, & Tiwari, S. K. (2022). Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. doi:10.3389/fcimb.2022.851140
- Aoun, A., Darwish, F., & Hamod, N. (2020). The Influence of the Gut Microbiome on Obesity in Adults and the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Weight Loss. *Prev Nutr Food Sci*, 25(2), 113-123. doi:10.3746/pnf.2020.25.2.113

- Arslan, A., Sakhawat, R., & Muhammad, T. (2022). Obesity and Gut Microbiota. In E.-S. Hoda (Ed.), *Effect of Microbiota on Health and Disease* (pp. Ch. 4). Rijeka: IntechOpen.
- Asadi, A., Shadab Mehr, N., Mohamadi, M. H., Shokri, F., Heidary, M., Sadeghifard, N., et al. (2022). Obesity and gut–microbiota–brain axis: A narrative review. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *36*(5), e24420.
- Babkin, I. V., & Tikunova, N. V. (2023). Special Issue "Bacteriophage Genomics": Editorial. *Microorganisms*, *11*(3). doi:10.3390/microorganisms11030693
- Baldelli, V., Scaldaferrì, F., Putignani, L., & Del Chierico, F. (2021). The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*, *9*(4). doi:10.3390/microorganisms9040697
- Bennett, W., Mende, K., Campbell, W. R., Beckius, M., Stewart, L., Shaikh, F., et al. (2023). *Enterobacter cloacae* infection characteristics and outcomes in battlefield trauma patients. *PLoS One*, *18*(8), e0290735. doi:10.1371/journal.pone.0290735
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 1-22.
- Berryhill, B. A., Huseby, D. L., McCall, I. C., Hughes, D., & Levin, B. R. (2021). Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(10), e2008007118.
- Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, *8*(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018
- Bianchi, F., Larsen, N., de Mello Tieghi, T., Adorno, M. A. T., Kot, W., Saad, S. M. I., et al. (2018). Modulation of gut microbiota from obese individuals by in vitro fermentation of citrus pectin in combination with *Bifidobacterium longum* BB-46. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*, 8827-8840.
- Bischoff, S. C., & Schweinlin, A. (2020). Obesity therapy. *Clin Nutr ESPEN*, *38*, 9-18. doi:10.1016/j.clnesp.2020.04.013
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(5), 288-298. doi:10.1038/s41574-019-0176-8
- Bosy-Westphal, A., & Müller, M. J. (2021). Diagnosis of obesity based on body composition-associated health risks-Time for a change in paradigm. *Obes Rev*, *22 Suppl 2*, e13190. doi:10.1111/obr.13190
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, *25*(6), 1340.

- Brives, C., & Pourraz, J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Communications*, 6(1), 100. doi:10.1057/s41599-020-0478-4
- Bseikri, H., Michniewski, S., Serrano, E. G., & Jameson, E. (2023). Phages prevent biofilm formation on catheters under flow. *bioRxiv*, 2023.2007.2026.550655.
- Cai, Z., Huang, Y., & He, B. (2022). New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. *Cells*, 11(9). doi:10.3390/cells11091424
- Cani, P. D., & Van Hul, M. (2020). Gut microbiota and obesity: causally linked? *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 14(6), 401-403.
- Cao, P., Li, C., Tan, K., Liu, C., Xu, X., Zhang, S., et al. (2020). Characterization, phylogenetic analyses, and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on rice seedlings in Heilongjiang Province, China. *Plant disease*, 104(6), 1601-1609.
- Caroff, M., & Novikov, A. (2019). LPS Structure, Function, and Heterogeneity. In K. L. Williams (Ed.), *Endotoxin Detection and Control in Pharma, Limulus, and Mammalian Systems* (pp. 53-93). Cham: Springer International Publishing.
- Caroff, M., & Novikov, A. (2020). Lipopolysaccharides: Structure, function and bacterial identifications. *OCL*, 27, 31.
- Chakraborty, J., Palit, K., & Das, S. (2022). Chapter 5 - Metagenomic approaches to study the culture-independent bacterial diversity of a polluted environment—a case study on north-eastern coast of Bay of Bengal, India. In S. Das & H. R. Dash (Eds.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation (Second Edition)* (pp. 81-107): Elsevier.
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Vesal, S., Moradabadi, A., Hashemi, A., & Shariati, A. (2021). Bacteriophage therapy for inhibition of multi drug-resistant uropathogenic bacteria: a narrative review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 1-13.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., et al. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 33(suppl_1), D325-D328.
- Cheng, T., Chin, P.-J., Cha, K., Petrick, N., & Mikailov, M. (2022a). Profiling the BLAST bioinformatics application for load balancing on high-performance computing clusters. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 544. doi:10.1186/s12859-022-05029-7
- Cheng, Z., Zhang, L., Yang, L., & Chu, H. (2022b). The critical role of gut microbiota in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 1025706. doi:10.3389/fendo.2022.1025706
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism*, 92, 6-10. doi:https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005

- Chrysant, S. G. (2019). Pathophysiology and treatment of obesity-related hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 21(5), 555-559.
- Cieślik, M., Harhala, M., Orwat, F., Dąbrowska, K., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2022). Two Newly Isolated Enterobacter-Specific Bacteriophages: Biological Properties and Stability Studies. *Viruses*, 14(7). doi:10.3390/v14071518
- Clairfeuille, T., Buchholz, K. R., Li, Q., Verschueren, E., Liu, P., Sangaraju, D., et al. (2020). Structure of the essential inner membrane lipopolysaccharide–PbgA complex. *Nature*, 584(7821), 479-483. doi:10.1038/s41586-020-2597-x
- Cook, R., Brown, N., Redgwell, T., Rihtman, B., Barnes, M., Clokie, M., et al. (2021). INfrastructure for a PHAge REference database: identification of large-scale biases in the current collection of cultured phage genomes. *Phage*, 2(4), 214-223.
- Cornier, M.-A. (2022). A Review of Current Guidelines for the Treatment of Obesity. *American Journal of Managed Care*, 28.
- Crovesy, L., Masterson, D., & Rosado, E. L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr*, 74(9), 1251-1262. doi:10.1038/s41430-020-0607-6
- Cunningham, A. L., Stephens, J. W., & Harris, D. A. (2021). A review on gut microbiota: a central factor in the pathophysiology of obesity. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 65. doi:10.1186/s12944-021-01491-z
- Dąbrowska, K., & Abedon, S. T. (2019). Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 83(4). doi:10.1128/mmb.00012-19
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 32(4). doi:10.1128/cmr.00002-19
- Dhurandhar, N. V. (2022). What is obesity? *International Journal of Obesity*, 46(6), 1081-1082. doi:10.1038/s41366-022-01088-1
- Di Lorenzo, F., Duda, K. A., Lanzetta, R., Silipo, A., De Castro, C., & Molinaro, A. (2022). A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. *Chemical Reviews*, 122(20), 15767-15821. doi:10.1021/acs.chemrev.0c01321
- Díaz-Díaz, L. M., Rodríguez-Villafañe, A., & García-Arrarás, J. E. (2022). The role of the microbiota in regeneration-associated processes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 768783.
- Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci (Basel)*, 6(4). doi:10.3390/medsci6040116
- Divya Ganeshan, S., & Hosseinidoust, Z. (2019). Phage therapy with a focus on the human microbiota. *Antibiotics*, 8(3), 131.
- Dixit, K., Chaudhari, D., Dhotre, D., Shouche, Y., & Saroj, S. (2021). Restoration of dysbiotic human gut microbiome for homeostasis. *Life Sciences*, 278, 119622. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119622

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Retrieved from
- Du, J., Meile, S., Baggenstos, J., Jäggi, T., Piffaretti, P., Hunold, L., et al. (2023). Enhancing bacteriophage therapeutics through *in situ* production and release of heterologous antimicrobial effectors. *Nature Communications*, *14*(1), 4337. doi:10.1038/s41467-023-39612-0
- Du, L., Lei, X., Wang, J., Wang, L., Zhong, Q., Fang, X., et al. (2022). Lipopolysaccharides derived from gram-negative bacterial pool of human gut microbiota promote inflammation and obesity development. *Int Rev Immunol*, *41*(1), 45-56. doi:10.1080/08830185.2021.1996573
- Duan, M., Wang, Y., Zhang, Q., Zou, R., Guo, M., & Zheng, H. (2021). Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *Plos one*, *16*(8), e0255446.
- Dufau, J., Shen, J. X., Couchet, M., Barbosa, T. D. C., Mejhert, N., Massier, L., et al. (2021). In vitro and ex vivo models of adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.
- Farhana, A., & Khan, Y. (2023). Biochemistry, lipopolysaccharide. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Finney, A. G., Perry, J. M., Evans, D. R., Westbrook, K. J., McElheny, C. L., Iovleva, A., et al. (2022). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Targeting Diverse *Enterobacter* spp. Clinical Isolates. *Phage (New Rochelle)*, *3*(1), 50-58. doi:10.1089/phage.2021.0011
- Flaunatti, N., Isaac, S., Lemos Rocha, L. F., Stutzmann, S., Rendueles, O., Stoudmann, C., et al. (2021). Human commensal gut Proteobacteria withstand type VI secretion attacks through immunity protein-independent mechanisms. *Nature Communications*, *12*(1), 5751. doi:10.1038/s41467-021-26041-0
- Fong, K., Wong, C. W., Wang, S., & Delaquis, P. (2021). How broad is enough: The host range of bacteriophages and its impact on the agri-food sector. *Therapy, Applications, and Research*, *2*(2), 83-91.
- Forti, F., Roach, D. R., Cafora, M., Pasini, M. E., Horner, D. S., Fiscarelli, E. V., et al. (2018). Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*(6), 10.1128/aac.02573-02517.
- García-Gamboa, R., Gradilla-Hernández, M., Ortiz-Basurto, R., García-Reyes, R., & González-Avila, M. (2020). Assessment of intermediate and long chains agave fructan fermentation on the growth of intestinal bacteria cultured in a gastrointestinal tract simulator. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *19*(2), 827-838.
- Geng, J., Ni, Q., Sun, W., Li, L., & Feng, X. (2022). The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *147*, 112678. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112678

- Gilchrist, C. L., & Chooi, Y.-H. (2021). Clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, *37*(16), 2473-2475.
- Gill, V. J. S., Soni, S., Shringarpure, M., Bhardwaj, S., Yadav, N. K., Patel, A., et al. (2022). Gut Microbiota Interventions for the Management of Obesity: A Literature Review. *Cureus*, *14*(9).
- Glonti, T., & Pirnay, J. P. (2022). In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*, *14*(7). doi:10.3390/v14071490
- Golden, A. (2020). Pathophysiology of Obesity. *Treating Obesity in Primary Care*, 45-59.
- Gomes, A. C., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, *9*(4), 308-325.
- Gomes, A. C., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2020). Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific genera. *European Journal of Nutrition*, *59*(4), 1751-1762. doi:10.1007/s00394-019-02034-0
- Gorman, A., & Golovanov, A. P. (2022). Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *180*, 289-307. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006
- Gossmann, M., Butsch, W. S., & Jastreboff, A. M. (2021). Treating the Chronic Disease of Obesity. *Medical Clinics of North America*, *105*(6), 983-1016. doi:https://doi.org/10.1016/j.mcna.2021.06.005
- Green, M., Arora, K., & Prakash, S. (2020). Microbial medicine: prebiotic and probiotic functional foods to target obesity and metabolic syndrome. *International journal of molecular sciences*, *21*(8), 2890.
- Gruneck, L., Kullawong, N., Kespechara, K., & Popluechai, S. (2020). Gut microbiota of obese and diabetic Thai subjects and interplay with dietary habits and blood profiles. *PeerJ* 8: e9622. In.
- Guo, J., Zhang, M., Wang, H., Li, N., Lu, Z., Li, L., et al. (2022). Gut microbiota and short chain fatty acids partially mediate the beneficial effects of inulin on metabolic disorders in obese ob/ob mice. *Journal of Food Biochemistry*, *46*(5), e14063.
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., et al. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, *51*.
- Hegazy, M. A., Mogawer, S. M., Alnaggar, A. R. L., Ghoniem, O. A., & Abdel Samie, R. M. (2020). Serum LPS and CD163 biomarkers confirming the role of gut dysbiosis in overweight patients with NASH. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 3861-3872.
- Hildebrandt, X., Ibrahim, M., & Peltzer, N. (2023). Cell death and inflammation during obesity: "Know my methods, WAT (son)". *Cell Death & Differentiation*, *30*(2), 279-292.

- Holtappels, D., Alfenas-Zerbini, P., & Koskella, B. (2023). Drivers and consequences of bacteriophage host range. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(4), fuad038. doi:10.1093/femsre/fuad038
- Holtzman, T., Globus, R., Molshanski-Mor, S., Ben-Shem, A., Yosef, I., & Qimron, U. (2020). A continuous evolution system for contracting the host range of bacteriophage T7. *Scientific Reports*, 10(1), 307. doi:10.1038/s41598-019-57221-0
- Hosseini Doust, Z. (2019). Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3).
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., et al. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. doi:10.1038/s41392-022-00974-4
- Hsu, B. B., Gibson, T. E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., et al. (2019). Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host Microbe*, 25(6), 803-814.e805. doi:10.1016/j.chom.2019.05.001
- Hu, J., Li, J., Liu, C., Zhang, Y., Xie, H., Li, C., et al. (2022). Molecular characteristics of global β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* by genomic analysis. *BMC Microbiology*, 22(1), 255. doi:10.1186/s12866-022-02667-y
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics*, 4(11), e1000255.
- Ilhan, Z. E., Marcus, A. K., Kang, D. W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). pH-Mediated Microbial and Metabolic Interactions in Fecal Enrichment Cultures. *mSphere*, 2(3). doi:10.1128/mSphere.00047-17
- Israel, E., Hassen, K., Markos, M., Wolde, K., & Hawulte, B. (2022). Central Obesity and Associated Factors Among Urban Adults in Dire Dawa Administrative City, Eastern Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 15, 601-614. doi:10.2147/dmso.S348098
- Jamal, M., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., et al. (2019). Isolation, characterization and efficacy of phage MJ2 against biofilm forming multi-drug resistant *Enterobacter cloacae*. *Folia Microbiologica*, 64(1), 101-111. doi:10.1007/s12223-018-0636-x
- Jansson, P.-E. (2020). The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides. In *Endotoxin in health and disease* (pp. 155-178): CRC Press.
- Jin, M., Zheng, L., Wei, Y., Cheng, J., Zhang, D., Yan, S., et al. (2022). *Enterobacter cloacae* aggravates metabolic disease by inducing inflammation and lipid accumulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 90, 103819. doi:https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103819
- Jobe, M., Agbla, S. C., Todorovic, M., Darboe, B., Danso, E., de Barros, J.-P. P., et al. (2022). Possible mediators of metabolic endotoxemia in

- women with obesity and women with obesity-diabetes in The Gambia. *International Journal of Obesity*, 46(10), 1892-1900.
doi:10.1038/s41366-022-01193-1
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., et al. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. doi:10.1038/s41467-019-13036-1
- Joung, H., Chu, J., Kim, B. K., Choi, I. S., Kim, W., & Park, T. S. (2021). Probiotics ameliorate chronic low-grade inflammation and fat accumulation with gut microbiota composition change in diet-induced obese mice models. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(3), 1203-1213. doi:10.1007/s00253-020-11060-6
- Jukaku, S. A., & Williams, S. R. P. (2021). The cause of obesity is multifactorial but GPs can do more. *Bmj*, 373, n956. doi:10.1136/bmj.n956
- Kaletta, J., Pickl, C., Griebler, C., Klingl, A., Kurmayer, R., & Deng, L. (2020). A rigorous assessment and comparison of enumeration methods for environmental viruses. *Scientific Reports*, 10(1), 18625. doi:10.1038/s41598-020-75490-y
- Kalnina, I., Gudra, D., Silamikelis, I., Viksne, K., Roga, A., Skinderskis, E., et al. (2023). Variations in the Relative Abundance of Gut Bacteria Correlate with Lipid Profiles in Healthy Adults. *Microorganisms*, 11(11), 2656. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/11/2656>
- Kamble, A., Sawant, S., & Singh, H. (2020). 16S ribosomal RNA gene-based metagenomics: A review. *Biomedical Research Journal*, 7(1), 5.
- Kanter Coronel, I. (2021). Magnitud del sobrepeso y la obesidad en México: un cambio de estrategia para su erradicación.
- Kasman LM, P. L. (2023). Bacteriophages. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>
- Kering, K. K., Kibii, B. J., & Wei, H. (2019). Biocontrol of phytobacteria with bacteriophage cocktails. *Pest management science*, 75(7), 1775-1781.
- Keskitalo, A., Munukka, E., Toivonen, R., Hollmén, M., Kainulainen, H., Huovinen, P., et al. (2018). *Enterobacter cloacae* administration induces hepatic damage and subcutaneous fat accumulation in high-fat diet fed mice. *PLoS One*, 13(5), e0198262.
- Khanna, Welch, & Rehman. (2022a). Fisiopatología de la obesidad. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572076/>
- Khanna, D., Peltzer, C., Kahar, P., & Parmar, M. S. (2022b). Body Mass Index (BMI): A Screening Tool Analysis. *Cureus*, 14(2), e22119. doi:10.7759/cureus.22119
- Khawaja, K. A., Abbas, Z., & Rehman, S. u. (2016). Isolation and characterization of lytic phages TSE1-3 against *Enterobacter cloacae*. *Open Life Sciences*, 11(1), 287-292. doi:doi:10.1515/biol-2016-0038

- Kim, B., Choi, H.-N., & Yim, J.-E. (2019). Effect of diet on the gut microbiota associated with obesity. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, 28(4), 216.
- 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
- Koziolek, M., Grimm, M., Becker, D., Iordanov, V., Zou, H., Shimizu, J., et al. (2015). Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap(®) System. *J Pharm Sci*, 104(9), 2855-2863. doi:10.1002/jps.24274
- Kumar, R. B., Srivastava, G., Reid, T. J., & Aronne, L. J. (2021). Understanding the pathophysiologic pathways that underlie obesity and options for treatment. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 16(6), 321-338. doi:10.1080/17446651.2021.1991310
- Kutter, E. (2009). Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophages: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions*, 141-149.
- Laforêt, F., Antoine, C., Lebrun, S., Gonza, I., Goya-Jorge, E., Douny, C., et al. (2023). Impact Assessment of vB_KpnP_K1-ULIP33 Bacteriophage on the Human Gut Microbiota Using a Dynamic In Vitro Model. *Viruses*, 15(3). doi:10.3390/v15030719
- Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, 32(1), 11-16.
- Laupland, K. B., Edwards, F., Harris, P. N. A., & Paterson, D. L. (2023). Significant clinical differences but not outcomes between *Klebsiella aerogenes* and *Enterobacter cloacae* bloodstream infections: a comparative cohort study. *Infection*, 51(5), 1445-1451. doi:10.1007/s15010-023-02010-1
- Letarov, A. V., & Kulikov, E. E. (2018). Determination of the bacteriophage host range: culture-based approach. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*, 75-84.
- Li, Y., Guan, W., Ma, S., Lin, S., Yang, N., Liu, R., et al. (2019). Lipopolysaccharide and inflammatory cytokines levels decreased after sleeve gastrectomy in Chinese adults with obesity. *Endocrine Journal*, 66(4), 337-347.
- Li, Y., Yun, K., & Mu, R. (2020). A review on the biology and properties of adipose tissue macrophages involved in adipose tissue physiological and pathophysiological processes. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 164. doi:10.1186/s12944-020-01342-3
- Liang, W., Qi, Y., Yi, H., Mao, C., Meng, Q., Wang, H., et al. (2022). The Roles of Adipose Tissue Macrophages in Human Disease. *Front Immunol*, 13, 908749. doi:10.3389/fimmu.2022.908749

- Ling, H., Lou, X., Luo, Q., He, Z., Sun, M., & Sun, J. (2022). Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(12), 4348-4364. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.007>
- Lister, N. B., Baur, L. A., Felix, J. F., Hill, A. J., Marcus, C., Reinehr, T., et al. (2023). Child and adolescent obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, *9*(1), 24. doi:10.1038/s41572-023-00435-4
- Liu, B. N., Liu, X. T., Liang, Z. H., & Wang, J. H. (2021). Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol*, *27*(25), 3837-3850. doi:10.3748/wjg.v27.i25.3837
- Loeser, R. F., Arbeeve, L., Kelley, K., Fodor, A. A., Sun, S., Ulici, V., et al. (2022). Association of Increased Serum Lipopolysaccharide, But Not Microbial Dysbiosis, With Obesity-Related Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*, *74*(2), 227-236. doi:10.1002/art.41955
- Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic acids research*, *44*(W1), W54-W57.
- Lu, B., Huang, L., Cao, J., Li, L., Wu, W., Chen, X., et al. (2021). Adipose tissue macrophages in aging-associated adipose tissue function. *The Journal of Physiological Sciences*, *71*(1), 38. doi:10.1186/s12576-021-00820-2
- Luli, M., Yeo, G., Farrell, E., Ogden, J., Parretti, H., Frew, E., et al. (2023). The implications of defining obesity as a disease: a report from the Association for the Study of Obesity 2021 annual conference. *EClinicalMedicine*, *58*.
- Lustig, R. H., Collier, D., Kassotis, C., Roepke, T. A., Kim, M. J., Blanc, E., et al. (2022). Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochem Pharmacol*, *199*, 115012. doi:10.1016/j.bcp.2022.115012
- Manor, O., Dai, C. L., Kornilov, S. A., Smith, B., Price, N. D., Lovejoy, J. C., et al. (2020). Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nature Communications*, *11*(1), 5206. doi:10.1038/s41467-020-18871-1
- Mansour, E. N., Elwakeel, M. E., Abd Elaziz, O. H., & Shipl, W. M. (2021). Lipopolysaccharide Binding Protein and Cardiovascular Changes in Obese Children. *Open Journal of Pediatrics*, *11*(2), 225-237.
- Marathe, A., Priyadarsanan, D. R., Krishnaswamy, J., & Shanker, K. (2021). Gamma diversity and under-sampling together generate patterns in beta-diversity. *Scientific Reports*, *11*(1), 21420. doi:10.1038/s41598-021-99830-8
- María, A.-J. L., Sofía, A. M. A., & María, M. P. D. (2022). Las endolisinas, una terapia emergente para combatir la resistencia antibiótica: Una revisión sistemática. *MENTE*, *52*.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, *17*(1), 10-12.

- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., et al. (2021). Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiology*, *21*(1), 35. doi:10.1186/s12866-021-02094-5
- Mazgaen, L., & Gurung, P. (2020). Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *International journal of molecular sciences*, *21*(2), 379.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(7), 3348-3357.
- 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.
- Mehmood Khan, F., Manohar, P., Singh Gondil, V., Mehra, N., Kayode Oyejobi, G., Odiwuor, N., et al. (2023). The applications of animal models in phage therapy: An update. *Hum Vaccin Immunother*, *19*(1), 2175519. doi:10.1080/21645515.2023.2175519
- Mehta, A., Shah, S. L., Saunders, K. H., & Sharaiha, R. Z. (2022). Obesity Diagnosis and Pathophysiology. In *Nutrition, Weight, and Digestive Health: The Clinician's Desk Reference* (pp. 195-205): Springer.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., & De Vos, D. (2018). Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail. *Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice*, 99-110.
- Merhi, G., Amayri, S., Bitar, I., Araj, G. F., & Tokajian, S. (2023). Whole Genome-Based Characterization of Multidrug Resistant *Enterobacter* and *Klebsiella aerogenes* Isolates from Lebanon. *Microbiology Spectrum*, *11*(1), e02917-02922.
- Mertz, L. (2022). Phage Therapy Takes on Broad Applications. *IEEE Pulse*, *13*(5), 9-15. doi:10.1109/mpuls.2022.3208823
- Meslier, V., Laiola, M., Roager, H. M., De Filippis, F., Roume, H., Quinquis, B., et al. (2020). Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut*, *69*(7), 1258-1268. doi:10.1136/gutjnl-2019-320438
- Mestre, L. M., Lartey, S. T., Ejima, K., Mehta, T., Keith, S., Maki, K. C., et al. (2023). Body Mass Index, Obesity, and Mortality– Part I: Associations and Limitations. *Nutrition Today*, *58*(3). Retrieved from https://journals.lww.com/nutritiontodayonline/fulltext/2023/05000/body_mass_index,_obesity,_and_mortality__part_i_4.aspx
- Min, Q.-Q., Sun, T., Xu, J.-Y., Chen, Y.-Z., Liu, W.-H., Zhao, W., et al. (2021). Differential Modulation of the Metabolic Effects of Diet-Induced Obesity by Probiotic *Lactobacillus Paracasei* K56 and Prebiotic α -Galactooligosaccharides. *Current Topics in Nutraceutical Research*, *19*(1).

- Mohammad, S., & Thiemermann, C. (2021). Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions. *Frontiers in immunology*, *11*, 594150.
- Morán-Ramos, S., Siliceo-Bernardi, M. T., Villalpando-Carrión, S., Canizales-Quinteros, S., Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2022). Gut microbiota composition after a dietary and physical activity intervention: a pilot study in Mexican children with obesity. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, *79*(5), 318-325.
- Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M. (2020). VIRIDIC—A novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses*, *12*(11), 1268.
- Moreno, X., Ventura, M., Panizo, M. M., & Garcés, M. F. (2022). Assessment of biofilms formation of bacterial and fungal isolates using qualitative Congo red agar and semiquantitative crystal violet microtiter methods. *Biomedica*, *43*(Sp. 1), 77-88. doi:10.7705/biomedica.6732
- Muscogiuri, G., Cantone, E., Cassarano, S., Tuccinardi, D., Barrea, L., Savastano, S., et al. (2019). Gut microbiota: a new path to treat obesity. *International Journal of Obesity Supplements*, *9*(1), 10-19. doi:10.1038/s41367-019-0011-7
- Mustafa, A., Ibrahim, M., Rasheed, M. A., Kanwal, S., Hussain, A., Sami, A., et al. (2020). Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights into Virulence and Niche Adaptation. *Scientific Reports*, *10*(1), 8150. doi:10.1038/s41598-020-65001-4
- Mutai, I. J., Juma, A. A., Inyimili, M. I., Nyachio, A., & Nyamache, A. K. (2022). Efficacy of diversely isolated lytic phages against multi-drug resistant *Enterobacter cloacae* isolates in Kenya. *Afr J Lab Med*, *11*(1), 1673. doi:10.4102/ajlm.v11i1.1673
- Nasr-Eldin, M. A., Gamal, E., Hazza, M., & Abo-Elmaaty, S. A. (2023a). Isolation, characterization, and application of lytic bacteriophages for controlling *Enterobacter cloacae* complex (ECC) in pasteurized milk and yogurt. *Folia Microbiologica*, 1-14.
- Nasr-Eldin, M. A., Gamal, E., Hazza, M., & Abo-Elmaaty, S. A. (2023b). Isolation, characterization, and application of lytic bacteriophages for controlling *Enterobacter cloacae* complex (ECC) in pasteurized milk and yogurt. *Folia Microbiol (Praha)*, *68*(6), 911-924. doi:10.1007/s12223-023-01059-7
- Neyrinck, A. M., Rodriguez, J., Zhang, Z., Seethaler, B., Sánchez, C. R., Roumain, M., et al. (2021). Prebiotic dietary fibre intervention improves fecal markers related to inflammation in obese patients: results from the Food4Gut randomized placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*, *60*(6), 3159-3170. doi:10.1007/s00394-021-02484-5
- NHLBI. (2022). ¿Qué son el sobrepeso y la obesidad? Retrieved from <https://www.nhlbi.nih.gov/health/overweight-and-obesity>
- Nikolich, M., & Filippov, A. (2020a). Bacteriophage therapy: developments and directions. *Antibiotics (Basel)* *9*: 135. In.

- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A. (2020b). Bacteriophage therapy: Developments and directions. *Antibiotics*, 9(3), 135.
- Nir-Paz, R., & Kuijper, E. J. (2023). Bacteriophage therapy in humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 29(6), 679-681.
- Noor, J., Chaudhry, A., Batool, S., Noor, R., & Fatima, G. (2023). Exploring the Impact of the Gut Microbiome on Obesity and Weight Loss: A Review Article. *Cureus*, 15(6).
- Octavia, S., & Lan, R. (2014). The Family *Enterobacteriaceae*. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (pp. 225-286). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- OMS. (2021). Obesidad y sobrepeso. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pallavali, R. R., Degati, V. L., Lomada, D., Reddy, M. C., & Durbaka, V. R. P. (2017). Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *PLoS One*, 12(7), e0179245. doi:10.1371/journal.pone.0179245
- Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., et al. (2021a). Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
- Palmas, V., Pisanu, S., Madau, V., Casula, E., Deledda, A., Cusano, R., et al. (2021b). Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Scientific Reports*, 11(1), 5532. doi:10.1038/s41598-021-84928-w
- Paule, A., Frezza, D., & Edeas, M. (2018). Microbiota and Phage Therapy: Future Challenges in Medicine. *Med Sci (Basel)*, 6(4). doi:10.3390/medsci6040086
- Perdomo, C. M., Cohen, R. V., Sumithran, P., Clément, K., & Frühbeck, G. (2023). Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults. *The Lancet*, 401(10382), 1116-1130.
- Perreault, L., & Rosenbaum, M. (2020). Obesity: Genetic contribution and pathophysiology. In: Uptodate: <https://www.uptodate.com/contents/obesitygenetic-contribution>
- Peters, B. A., Shapiro, J. A., Church, T. R., Miller, G., Trinh-Shevrin, C., Yuen, E., et al. (2018). A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Scientific Reports*, 8(1), 9749. doi:10.1038/s41598-018-28126-1
- Pinto, A. M., Cerqueira, M. A., Bañobre-López, M., Pastrana, L. M., & Sillankorva, S. (2020). Bacteriophages for Chronic Wound Treatment: from Traditional to Novel Delivery Systems. *Viruses*, 12(2). doi:10.3390/v12020235
- Pugliese, G., Liccardi, A., Graziadio, C., Barrea, L., Muscogiuri, G., & Colao, A. (2022). Obesity and infectious diseases: pathophysiology and

- epidemiology of a double pandemic condition. *International Journal of Obesity*, 46(3), 449-465. doi:10.1038/s41366-021-01035-6
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Rakhra, V., Galappaththy, S. L., Bulchandani, S., & Cabandugama, P. K. (2020). Obesity and the Western Diet: How We Got Here. *Mo Med*, 117(6), 536-538.
- Ramesh, N., Manohar, P., Eniyan, K., Archana, L., Athira, S., Loh, B., et al. (2022). A lysozyme murein hydrolase with broad-spectrum antibacterial activity from *Enterobacter* phage myPSH1140. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(9), e00506-00522.
- Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., Lopez-Moreno, H. S., & Castro-del Campo, N. (2018). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS One*, 13(5), e0195023.
- Reche-García, C., Hernández Morante, J. J., & Morillas-Ruiz, J. M. (2023). Dietary Assessment for Weight Management and Health Maintenance. *Nutrients*, 15(21). doi:10.3390/nu15214610
- Reina, J., & Reina, N. (2018). [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Rev Esp Quimioter*, 31(2), 101-104.
- Repoila, F., Le Bohec, F., Guérin, C., Lacoux, C., Tiwari, S., Jaiswal, A. K., et al. (2022). Adaptation of the gut pathobiont *Enterococcus faecalis* to deoxycholate and taurocholate bile acids. *Scientific Reports*, 12(1), 8485. doi:10.1038/s41598-022-12552-3
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Ross, R., Neeland, I. J., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., et al. (2020). Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(3), 177-189. doi:10.1038/s41574-019-0310-7
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb. prot4455.
- Sarmiento-Andrade, Y., Suárez, R., Quintero, B., Garrochamba, K., & Chapela, S. P. (2022). Gut microbiota and obesity: New insights. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1018212.
- Sayers, S., Li, L., Ong, E., Deng, S., Fu, G., Lin, Y., et al. (2019). Victors: a web-based knowledge base of virulence factors in human and animal pathogens. *Nucleic acids research*, 47(D1), D693-D700.
- Schloss Patrick, D. (2024). Rarefaction is currently the best approach to control for uneven sequencing effort in amplicon sequence analyses. *mSphere*, 9(2), e00354-00323. doi:10.1128/msphere.00354-23

- Selden, C., & Fuller, B. (2018). Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design. *Bioengineering (Basel)*, 5(2). doi:10.3390/bioengineering5020032
- Senchukova, M. A. (2023). Microbiota of the gastrointestinal tract: Friend or foe? *World J Gastroenterol*, 29(1), 19-42. doi:10.3748/wjg.v29.i1.19
- Serapio-Palacios, A., Woodward, S. E., Vogt, S. L., Deng, W., Creus-Cuadros, A., Huus, K. E., et al. (2022). Type VI secretion systems of pathogenic and commensal bacteria mediate niche occupancy in the gut. *Cell Reports*, 39(4), 110731. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110731
- Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barrientos-Gutiérrez, T., Cuevas-Nasu, L., Bautista-Arredondo, S., Colchero, M., et al. (2022). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., et al. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shan, L., Tyagi, A., Shabbir, U., Chen, X., Vijayalakshmi, S., Yan, P., et al. (2022). The Role of Gut Microbiota Modulation Strategies in Obesity: The Applications and Mechanisms. *Fermentation*, 8(8), 376.
- Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018a). Virus classification—where do you draw the line? *Archives of virology*, 163, 2037-2046.
- Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018b). Virus classification - where do you draw the line? *Arch Virol*, 163(8), 2037-2046. doi:10.1007/s00705-018-3938-z
- Sinha, S., Grewal, R. K., & Roy, S. (2018). Chapter Three - Modeling Bacteria–Phage Interactions and Its Implications for Phage Therapy. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 103, pp. 103-141): Academic Press.
- Song, B., Zhao, K., Zhou, S., Xue, Y., Lu, H., Jia, X., et al. (2023). Association of the gut microbiome with fecal short-chain fatty acids, lipopolysaccharides, and obesity in young Chinese college students. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1057759.
- Soria-Bustos, J., Ares, M. A., Gómez-Aldapa, C. A., González, Y. M. J. A., Girón, J. A., & De la Cruz, M. A. (2020). Two Type VI Secretion Systems of *Enterobacter cloacae* Are Required for Bacterial Competition, Cell Adherence, and Intestinal Colonization. *Front Microbiol*, 11, 560488. doi:10.3389/fmicb.2020.560488
- Spinelli, S., & Monteleone, E. (2021). Food preferences and obesity. *Endocrinology and Metabolism*, 36(2), 209-219.
- Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2020). Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.02192
- Suh, G. A., Lodise, T. P., Tamma, P. D., Knisely, J. M., Alexander, J., Aslam, S., et al. (2022). Considerations for the use of phage therapy in clinical

- practice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(3), e02071-02021.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G., Jr. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(3), 649-659. doi:10.1128/aac.45.3.649-659.2001
- Sun, Y., Chen, S., Ren, F., & Li, Y. (2023). *Lactobacillus paracasei* N1115 attenuates obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Food Sci Nutr*, 11(1), 418-427. doi:10.1002/fsn3.3073
- Taghizad, F., & Kazerani, H. R. (2021). The roles of bacterial products, lipopolysaccharides and bacteriocins, in obesity and its related complications. *Diabetes and Metabolic Disorders*, 8.
- Tan, S., Huang, S., Liu, Z., Chen, M., Chen, H., Ye, Q., et al. (2023). Genome Characterization of the Novel Lytic *Enterobacter cloacae* Phage vB_EcIM_Q7622. *Food and Environmental Virology*, 15(3), 236-245. doi:10.1007/s12560-023-09558-z
- Tang, X., Chang, S., Qiao, W., Luo, Q., Chen, Y., Jia, Z., et al. (2021). Structural insights into outer membrane asymmetry maintenance in Gram-negative bacteria by MlaFEDB. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(1), 81-91. doi:10.1038/s41594-020-00532-y
- Tao, Z., Geng, D., Tao, J., Wang, J., Liu, S., Wang, Q., et al. (2023). Synergistic Antibacterial Effect and Mechanism of Allicin and an *Enterobacter cloacae* Bacteriophage. *Microbiol Spectr*, 11(1), e0315522. doi:10.1128/spectrum.03155-22
- Tesson, F., Hervé, A., Mordret, E., Touchon, M., d'Humieres, C., Cury, J., et al. (2022). Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nat Commun* 13: 2561. In.
- Tiwari, A., & Balasundaram, P. (2023). Public Health Considerations Regarding Obesity. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tong, W. U., Hong-Chao, W., Wen-Wei, L. U., Jian-Xin, Z., Hao, Z., & Wei, C. Characteristics of gut microbiota of obese people and machine learning model. *Microbiology China*, 47(12), 4328-4337. Retrieved from wswxtben/article/abstract/tb20124328
- Tseng, C.-H., & Wu, C.-Y. (2019). The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118, S3-S9. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021a). A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506.
- Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021b). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3). doi:10.3390/v13030506
- Tynecki, P., Guziński, A., Kazmierczak, J., Jadczyk, M., Dastyk, J., & Onisko, A. (2020). PhageAI-bacteriophage life cycle recognition with

- machine learning and natural language processing. *BioRxiv*, 2020.2007. 2011.198606.
- Unni, R., Pintor, K. L., Diepold, A., & Unterweger, D. (2022). Presence and absence of type VI secretion systems in bacteria. *Microbiology*, *168*(4), 001151.
- Unterer, M., Khan Mirzaei, M., & Deng, L. (2023). Targeted Single-Phage Isolation Reveals Phage-Dependent Heterogeneous Infection Dynamics. *Microbiol Spectr*, *11*(3), e0514922. doi:10.1128/spectrum.05149-22
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Bmj*, *361*.
- van der Meer, J. W. M., & Vandenbroucke-Grauls, C. (2018). [Bacteriophages in the battle against multidrug resistant bacteria]. *Ned Tijdschr Geneesk*, *162*, D2433.
- Van Hul, M., & Cani, P. D. (2023). The gut microbiota in obesity and weight management: microbes as friends or foe? *Nature Reviews Endocrinology*, *19*(5), 258-271. doi:10.1038/s41574-022-00794-0
- Vasquez, I., Retamales, J., Parra, B., Machimbirike, V., Robeson, J., & Santander, J. (2023). Comparative Genomics of a Polyvalent *Escherichia-Salmonella* Phage fp01 and In Silico Analysis of Its Receptor Binding Protein and Conserved *Enterobacteriaceae* Phage Receptor. *Viruses*, *15*(2), 379.
- Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, *14*(7), e12435.
- Walters, K. E., & Martiny, J. B. H. (2020). Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One*, *15*(9), e0233872. doi:10.1371/journal.pone.0233872
- Wang, C., Yu, Q.-Y., Ji, N.-N., Zheng, Y., Taylor, J. W., Guo, L.-D., et al. (2023). Bacterial genome size and gene functional diversity negatively correlate with taxonomic diversity along a pH gradient. *Nature Communications*, *14*(1), 7437. doi:10.1038/s41467-023-43297
- Wang, H., Lu, Y., Yan, Y., Tian, S., Zheng, D., Leng, D., et al. (2020). Promising treatment for type 2 diabetes: fecal microbiota transplantation reverses insulin resistance and impaired islets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, 455.
- Wang, Y., Tang, B., Long, L., Luo, P., Xiang, W., Li, X., et al. (2021). Improvement of obesity-associated disorders by a small-molecule drug targeting mitochondria of adipose tissue macrophages. *Nature Communications*, *12*(1), 102. doi:10.1038/s41467-020-20315-9
- Westerterp-Plantenga, M. S. (2020). Challenging energy balance - during sensitivity to food reward and modulatory factors implying a risk for overweight - during body weight management including dietary restraint and medium-high protein diets. *Physiology & Behavior*, *221*, 112879. doi:https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112879

- Wiese, M., Khakimov, B., Nielsen, S., Sørensen, H., van den Berg, F., & Nielsen, D. S. (2018). CoMiniGut-a small volume *in vitro* colon model for the screening of gut microbial fermentation processes. *PeerJ*, *6*, e4268. doi:10.7717/peerj.4268
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, *10*. doi:10.3389/fmicb.2019.02407
- WorldObesity. (2023). World Obesity Atlas 2023. Retrieved from <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2023>
- Wu, Z., Zhang, Y., Xu, X., Ahmed, T., Yang, Y., Loh, B., et al. (2021). The Holin-Endolysin Lysis System of the OP2-Like Phage X2 Infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Viruses*, *13*(10). doi:10.3390/v13101949
- Xu, Y., Shrestha, N., Prémat, V., & Beloqui, A. (2021a). An overview of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *175*, 113795.
- Xu, Z., Liu, Y., Yan, C., Yang, R., Xu, L., Guo, Z., et al. (2021b). Measurement of visceral fat and abdominal obesity by single-frequency bioelectrical impedance and CT: a cross-sectional study. *BMJ open*, *11*(10), e048221.
- Yamamura, R., Inoue, K. Y., Nishino, K., & Yamasaki, S. (2023). Intestinal and fecal pH in human health. *Frontiers in Microbiomes*, *2*. doi:10.3389/frmbi.2023.1192316
- Yan, H., Qin, Q., Chen, J., Yan, S., Li, T., Gao, X., et al. (2022). Gut microbiome alterations in patients with visceral obesity based on quantitative computed tomography. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1451.
- Yan, W., Banerjee, P., Xu, M., Mukhopadhyay, S., Ip, M., Carrigy, N. B., et al. (2021). Formulation strategies for bacteriophages to target intracellular bacterial pathogens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *176*, 113864. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113864
- Yang, Y., Shen, W., Zhong, Q., Chen, Q., He, X., Baker, J. L., et al. (2020). Development of a bacteriophage cocktail to constrain the emergence of phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, *11*, 327.
- Yao, J., Wu, D., & Qiu, Y. (2022). Adipose tissue macrophage in obesity-associated metabolic diseases. *Frontiers in Immunology*, *13*, 977485.
- Yap, M. L., Klose, T., Arisaka, F., Speir, J. A., Veessler, D., Fokine, A., et al. (2016). Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(10), 2654-2659. doi:10.1073/pnas.1601654113
- You, H., Tan, Y., Yu, D., Qiu, S., Bai, Y., He, J., et al. (2022). The therapeutic effect of SCFA-mediated regulation of the intestinal environment on obesity. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 886902.

- Yu, E. W., Gao, L., Stastka, P., Cheney, M. C., Mahabamunuge, J., Torres Soto, M., et al. (2020). Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial. *PLoS medicine*, *17*(3), e1003051.
- Yu, Y., Dai, P., Niu, M., Han, R., Liu, S., & Du, Y. (2023). Antimicrobial resistance, molecular characteristics, virulence and pathogenicity of bla NDM-1-positive *Enterobacter cloacae*. *Journal of Medical Microbiology*, *72*(6), 001712.
- Zhang, P., Yu, Y., Qin, Y., Zhou, Y., Tang, R., Wang, Q., et al. (2019). Alterations to the microbiota–colon–brain axis in high-fat-diet-induced obese mice compared to diet-resistant mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *65*, 54-65.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.016>
- Zierle-Ghosh, A., & Jan, A. (2023). Physiology, Body Mass Index. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Zuppi, M., Hendrickson, H. L., O'Sullivan, J. M., & Vatanen, T. (2021). Phages in the Gut Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 822562.
doi:10.3389/fcimb.2021.822562

Anexo 1. Participación en la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS, 2022.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SINALOA**
A TRAVÉS DE LA
**DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO**
OTORGA LA PRESENTE

Constancia

LN. Sthefhany Nohemí Rodríguez Arellano
A: _____

Por su destacada participación como expositor del cartel de investigación titulado "Exposición de carteles: Proyectos de investigación en el desarrollo del posgrado de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2022, llevada a cabo del 27 de Octubre al 19 de Noviembre de 2022.

"Sursum Versus"



DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Anexo 2. Participación en el XV Coloquio Internacional de Investigación para estudiantes Universitarios. VII Coloquio Internacional de Investigación Universitaria.



Anexo 3. Reconocimiento del primer lugar en presentación de cartel en el XV Coloquio Internacional de Investigación para estudiantes Universitarios. VII Coloquio Internacional de Investigación Universitaria.



Anexo 4. Participación en el 4to Congreso Internacional Sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria.

ANICA
ASOCIACIÓN NACIONAL PARA LA INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA EN MÉXICO, S.C.

4 CONGRESO INTERNACIONAL
SOBRE
INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

"Alimentos Seguros,
Una Soñ Salud"

La Asociación Nacional para la Inocuidad y Calidad Alimentaria en México,
en el marco del 4^{to} Congreso Internacional sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria,
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Rodríguez Arellano Sthefhany Nohemí

Por su valiosa participación como ASISTENTE y PONENTE modalidad CARTEL con el trabajo titulado:

Un coctel de bacteriófagos contra *Enterobacter cloacae*, patógeno vinculado a la obesidad

Rodríguez-Arellano, S.N, Chaidez-Quiroz, C, Vergara-Jiménez, M.J, González-Gómez, J.P,
González-Avila, M


Cristóbal Chaidez Quiroz
Presidente de la ANICA


Francisca Piña Zazueta
Directora del Tecnológico Nacional de México, campus Culiacán


María Dolores Muy Rangel
Coordinadora del CIAD Culiacán

   **CONAHCYT**  Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo  **CONFIE** CIENCIA PARA EL PROGRESO  AYUNTAMIENTO DE CULIACÁN

Anexo 5. Reconocimiento del segundo lugar en presentación de cartel en el 4to Congreso Internacional Sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria.

ANICA
ASOCIACIÓN NACIONAL PARA LA INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA EN MÉXICO, A.C.

4 CONGRESO INTERNACIONAL
SOBRE
INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

"Alimentos Seguros,
Una Sola Salud"

La Asociación Nacional para la Inocuidad y Calidad Alimentaria en México,
en el marco del 4^{to} Congreso Internacional sobre Inocuidad y Calidad Alimentaria,
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Sthefhany Nohemí Rodríguez Arellano

Por haber obtenido el 2do lugar en el concurso de carteles con su trabajo: "Un coctel de bacteriófagos contra *Enterobacter cloacae*, patógeno vinculado a la obesidad". Coautores: Rodríguez-Arellano, S.N, Chaidez-Quiroz, C, Vergara-Jiménez, M.J, González-Gómez, J.P, González-Ávila, M.

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Presidente de la ANICA

Dr. Jean Pierre González Gómez
Miembro del Comité Editorial

MC. Rosabel Vélez de la Rocha
Miembro del Comité Editorial

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
CIAD

CONFIE
CIENCIA PARA EL PROGRESO

AYUNTAMIENTO DE CULIACÁN

Anexo 6. Participación en el Primer Congreso de Investigadoras Sinaloenses.



Anexo 7. Estancia académica en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo

Subsede Culiacán

CIAD/DUC/CD/022/24

Culiacán, Sinaloa, México; 16 de febrero de 2024

ASUNTO: Constancia de
Estancia de Investigación

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hacemos constar que la C. **Sthefhany Nohemí Rodríguez Arellano**, con número de matrícula 15683168, del cuarto semestre de la Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ha concluido satisfactoriamente su Estancia de Investigación en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Subsede Culiacán (CIAD Culiacán), a cargo del Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, realizando sus actividades en el Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA), durante el periodo comprendido del 1 de septiembre 2022 al 31 de enero del 2024 y participando en el proyecto titulado "Efecto lítico de un coctel de bacteriófagos sobre *Enterobacter cloacae* y su impacto en el perfil de metabolitos producidos en la microbiota intestinal asociada a la obesidad en un modelo *ex vivo*".

Sin otro particular, me despido de usted quedando a sus órdenes para cualquier aclaración.

Atentamente

Dra. Josefina León Félix

Responsable de Programas Académicos
CIAD, A. C. Coordinación Culiacán



c.c.p. Archivo

Carretera a Eldorado, km. 5.5, Col. Campo El Diez, C.P. 80110. Culiacán, Sinaloa, México.
Tel: 667 480 6950 www.ciad.mx



Anexo 8. Estancia académica en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.



Guadalajara, Jal. A 23 de Marzo de 2023
Ref. CP/532/2023

A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE.

Por medio de la presente, me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que la C. Stefhany Nohemí Rodríguez Arellano con Número de Código 15683168, de la Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, fue aceptada para realizar su estancia académica en la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica dentro del proyecto "Efecto lítico del bacteriófago vB_EcLS_AS1 sobre *Enterobacter cloacae* presente en la microbiota intestinal asociada a la obesidad en un modelo *ex vivo*, como parte del proyecto pan 10" bajo la supervisión de la Dra. Marisela Gonzalez Avila, en un periodo de 01 de Marzo al 31 de Mayo del 2023.

Se extiende la presente para los fines que la interesada considere convenientes

ATENTAMENTE

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Directora Adjunta de Investigación y Posgrado



Av. Normalistas No. 800, Colinas de La Normal, CP. 44270, Guadalajara, Jal., México.
Tel: (33) 3345 5200 informes@ciatej.mx www.ciatej.mx



Anexo 9. Publicación del artículo "Genomic and biological characterization of bacteriophages against *Enterobacter cloacae*, a high-priority pathogen".

Virology 595 (2024) 110100



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/virology



Genomic and biological characterization of bacteriophages against *Enterobacter cloacae*, a high-priority pathogen

Jean Pierre González-Gómez^a, Sthefhany Nohemí Rodríguez-Arellano^b, Bruno Gomez-Gil^c,
Marcela de Jesús Vergara-Jiménez^{b,*,*}, Cristobal Chaidez^{a,*}

^a Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Carretera a El Dorado km 5.5, Campo El Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, Mexico

^b Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, 80019, Culiacán, Sinaloa, Mexico

^c Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, AP 711, Mazatlán, Sinaloa, Mexico

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Jasmine Tomar

Keywords:
Enterobacter cloacae
Phage therapy
Bacteriolytic activity

ABSTRACT

Enterobacter cloacae is a clinically significant pathogen due to its multi-resistance to antibiotics, presenting a challenge in the treatment of infections. As concerns over antibiotic resistance escalate, novel therapeutic approaches have been explored. Bacteriophages, characterized by their remarkable specificity and ability to self-replicate within target bacteria, are emerging as a promising alternative therapy. In this study, we isolated and partially characterized nine lytic bacteriophages targeting *E. cloacae*, with two selected for comprehensive genomic analysis based on their host range and bacteriolytic activity. All identified phages exhibited a narrow host range, demonstrated stability within a temperature range of 30–60 °C, displayed pH tolerance from 3 to 10, and showed an excellent bacteriolytic capacity for up to 18 h. Notably, the fully characterized phage genomes revealed an absence of lysogenic, virulence, or antibiotic-resistance genes, positioning them as promising candidates for therapeutic intervention against *E. cloacae*-related diseases. Nonetheless, translating this knowledge into practical therapeutic applications mandates a deeper understanding of bacteriophage interactions within complex biological environments.

1. Introduction

Enterobacter, a genus of Gram-negative rod-shaped bacteria within the *Enterobacteriaceae* family, is ubiquitous in both terrestrial and aquatic environments. However, its presence in healthcare settings poses a significant threat, contributing to various infections such as bacteremia, endocarditis, septic arthritis, osteomyelitis, skin/soft tissue infections, and infections affecting the lower respiratory, urinary, and intra-abdominal tracts (Davin-Regli and Pages, 2015; Smith et al., 2022). Additionally, as an opportunistic pathogen in the intestine, *E. cloacae* has been implicated in triggering inflammation, potentially leading to metabolic diseases (Jin et al., 2022; Yan et al., 2016). These pathogens are categorized among the ESKAPE pathogens, a group that also includes *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. ESKAPE pathogens are a major concern for health authorities like the CDC and WHO due to their elevated resistance levels, virulence, and

limited treatment options, posing a significant risk to immunocompromised individuals in both healthcare and residential settings (Rice, 2008; Tacconelli et al., 2018). Among *Enterobacter* species, *E. cloacae* stands out as a particularly troublesome pathogen frequently implicated in nosocomial pneumonias and infections, rendering it one of the most concerning microorganisms in the current antibiotic era (Mezzatesta et al., 2012).

Enterobacter cloacae presents intrinsic resistance to various antibiotics, including ampicillin, amoxicillin, first-generation cephalosporins, and cefoxitin, primarily attributed to the constitutive production of AmpC β -lactamase. Furthermore, resistance to last-resort carbapenems such as meropenem, imipenem, and ertapenem has classified certain isolates as multidrug-resistant (MDR) (Annavaiah et al., 2019). Colistin emerges as one of the few effective antibiotics for managing MDR *Enterobacter* infections. However, the escalation and prevalence of colistin resistance have exacerbated clinical challenges by limiting available treatment options, thereby complicating clinical management

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: mjvergara@uas.edu.mx (M.J. Vergara-Jiménez), chaqui@ciad.mx (C. Chaidez).

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110100>

Received 8 November 2023; Received in revised form 20 April 2024; Accepted 2 May 2024

Available online 3 May 2024

0042-6822/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.