Fagos, la piedra Rosetta que descifra jeroglíficos biológicos

Raúl R. Raya y María C. Aristimuño Ficoseco

Centro de Referencia para Lactobacilos, CERELA, CCT-Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina

Contacto: Raul Raya - rraya@cerela.org.ar

La naturaleza es grande en las cosas grandes,
mas es grandísima en las cosas diminutas.
Jacques H. Bernardin de Saint-Pierre
(1737-1814)

Resumen

Se designa con el nombre de virus a agentes infecciosos microscópicos. Los virus que atacan bacterias reciben el nombre de fagos. Descubiertos durante la segunda década del siglo XX se transformaron en una herramienta fundamental para los grandes descubrimientos que condujeron a la biología molecular moderna. Los fagos son posiblemente las entidades biológicas más antiguas que se encuentran en la biosfera y las más abundantes, ya que su número se estima en 10^{31}. Son activos agentes de transferencia de genes y por lo tanto responsables en gran parte de la diversidad bacteriana. El conocimiento generado a partir de su estudio dio lugar a diversas aplicaciones biotecnológicas entre ellas el uso como agentes terapéuticos, en biocontrol y en seguridad alimentaria y agricultura.

Palabras clave: fagos, biología molecular, aplicaciones biotecnológicas

Phages, the Rosetta stone that deciphers biological hieroglyphs

Summary

Virus are microscopic infectious agents. Virus that attack bacteria are called phages. Discovered during the second decade of the 20th century they were a fundamental tool for the great discoveries that led to modern molecular biology. Phages are possibly the oldest biological entities found in the biosphere and the most abundant since their number is estimated at 1031. They are gene transfer agents and therefore are highly responsible for bacterial diversity. The knowledge generated from their study gave rise to various biotechnological applications including their use as therapeutic agents and in food security.

Keywords: phages, molecular biology, biotechnological applications

Introducción

La palabra virus (en latín =veneno) se utilizó originalmente para describir de manera específica y colectiva a agentes infecciosos ultramicroscópicos y filtrables. Los virus específicos de bacterias fueron descubiertos por Frederick Twort y FelixD'Herelle, respectivamente, en 1915 y 1917.D'Herelle propuso el nombre de

bacteriófago (o fago, del griego *phagein*: comer) al agente responsable de “la lisis transmisible de bacterias” y diseñó el método de agar de doble capa, aún en uso, para cuantificarlos; fue además el primer científico en observar el patrón básico “paso a paso” (*one-step growth curve*) de reproducción de los fagos (técnica perfeccionada durante los años ´40 del siglo XX por Emory Ellis y Max Delbrück para determinar el período de latencia y el número promedio de nuevas partículas de virus liberados por unidad de célula infectada (*burst-size*), parámetros cinéticos necesarios para caracterizar la reproducción intracelular de un fago [1-2]

Los fagos usados inicialmente en investigación fueron fagos activos contra la especie *Escherichia coli* (fagos lambda y los “siete enanitos”, o fagos de la serie T). En 1944 el grupo *Phage Group*, liderado por Delbrück y formado por eminentes biólogos y físicos, concentró sus estudios de la estructura y función del material hereditario de los seres vivos en un limitado número de fagos (fagos T1 a T7), usando unas pocas cepas bacterianas y condiciones experimentales estandarizadas. Los resultados logrados contribuyeron a unificar el campo de la genética bacteriana y al desarrollo de un nuevo paradigma, la biología molecular moderna.

El desarrollo de técnicas basadas en la microscopía de epifluorescencia para visualizar y cuantificar los fagos presentes en distintos nichos ecológicos, la secuenciación masiva de genomas microbianos y los estudios metagenómicos hizo posible visualizar que los fagos son posiblemente las entidades biológicas más antiguas y sin duda las más abundantes y ubicuas que existen en la biosfera. Se estima que hay aproximadamente 10^{31} partículas virales.Los fagos ocupan prácticamente todos los nichos ecológicos; por su capacidad lítica (se estima que son responsables de la muerte de aproximadamente el 20% -40% cada 24 h de las bacterias de los océanos [3] o como vehículos en la transferencia horizontal de genes, juegan un papel determinante en la ecología y diversidad de las comunidades bacterianas. Los genomas de fagos integrados en los genomas bacterianos pueden expresar toxinas y otros factores que contribuyen a la virulencia y a la adaptación a nichos específicos de bacterias patógenas. Los fagos fueron también de gran utilidad para descifrar el papel de las secuencias CRISPRs en la inmunidad adquirida en bacterias; sistemas que están presentes en un 80% de arqueas y en el 50% de las bacterias.

Muchos investigadores que utilizaron a los fagos como organismos modelo de experimentación fueron galardonados con el premio Nobel. A su vez, el conocimiento generado a partir del estudio de los fagos dio lugar a diversas aplicaciones biotecnológicas; entre las más importantes: i) el uso de las enzimas de restricción y otras enzimas derivadas de fagos para la generación de moléculas de DNA recombinante y el desarrollo de la ingeniería genética; ii) la técnica de *phage display*, que permite la expresión de proteínas o péptidos heterólogos en la cápside de un fago. Es una técnica muy poderosa utilizada, entre otros, para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas de cáncer y enfermedades inflamatorias y péptidos con acción antimicrobiana; y iii) el desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 que permite editar el genoma de cualquier célula (incluso ha permitido modificar el DNA de embriones humanos) y en diagnóstico, y que ha causado una verdadera revolución en las ciencias de la vida y de la salud.

Fagos. Generalidades

La partícula madura de los fagos es una nucleoproteína que posee una estructura con diferentes grados de complejidad. Se reconocen tres morfologías principales: icosahédrica sin cola, icosahédrica con cola y filamentosa. La clasificación de los fagos se basa en criterios tales como su especificidad de hospedador, morfología, tipo de ácido nucleico, modo de infección, filogenia, serología, y sensibilidad a los agentes físicos y químicos. La mayoría de los fagos estudiados poseen cola, constituyendo el orden *Caudovirales*, que se distribuyen en cinco familias: *Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Ackermannviridae* y

Herelleviridae (International Committee onTaxonomy of Viruses ICTV https://talk.ictvonline.org/taxonomy/). La cápside de los caudovirus puede ser icosahédrica o alargada y su cola puede ser contráctil (myovirus), flexible y no contráctil (siphovirus) o muy corta y a veces “embebida” en la cápside (podovirus). Los fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos constituyen menos del 10% de los fagos caracterizados. El material genético de los fagos, que se encuentra rodeado de proteínas que lo protegen del medio ambiente, puede ser una molécula de DNA o RNA, de hebra simple o doble, siendo en la mayoría de los fagos caracterizados una molécula de DNA, con un tamaño variable entre 5 hasta 500 kilopares de bases. El genoma de los fagos presenta una estructura característica de mosaico, producto de múltiples eventos de recombinación con otros genomas virales y bacterianos. El DNA puede contener bases modificadas; *i.e.* el fago T4 contiene 5´-hidroximetilcitosina pero no citosina.Otros fagos poseen proteínas covalentemente unidas a los extremos de su genoma; *i.e.* el fago phi29 posee una proteína en los extremos 5´que contribuye al inicio de la replicación de su DNA. El DNA presente en las cápsides de las partículas maduras puede corresponder al equivalente de un genoma del fago (*i.e.* el genoma del fago lambda, cuyos extremos son cohesivos y siempre idénticos) o ser mayor a este (*i.e.* el genoma del fago T4, cuyo genoma es lineal, circularmente permutado, con repeticiones terminales directas de 3 a 6 kpb). Otros fagos encapsidan su genoma como DNA circular (fago PM2) o segmentado (fago fi6, en tres segmentos de RNA y fago T5, DNA lineal de doble cadena, con una de las hebras segmentada). Algunos fagos pueden encapsidar también DNA bacteriano y transferirlo a otras células mediante un mecanismo de transferencia de genes bacterianos denominado transducción. Las traducción puede ser **especializada**, cuando se transfieren unos pocos genes (*i.e.*, por una imprecisa excisión del profago lambda, el fago puede incorporar DNA del gen gal o el gen bio en los extremos de su genoma), o bien **generalizada**, cuando se encapsida y transfiere cualquier fragmento de DNA de la célula infectada. La transferencia de DNA mediada por transducción es uno de los mecanismos de transferencia horizontal de genes, de gran importancia en la evolución de los genomas procariotas. En el laboratorio, se puede generar también sistemas artificiales de transducción que facilitan el estudio genético de bacterias recalcitrantes a otros mecanismos de transferencia genética [4]

Ciclos de vida

Ciclos de reproducción: lítico y lisogénico y según el ciclo de vida los fagos se agrupan en fagos virulentos (ciclo lítico) y fagos temperados (pueden seguir ambos ciclos de reproducción). Otros dos ciclos reconocidos son la pseudolisogenia y la Hay 2 principales infección crónica (*i.e.*, fago M13). En la pseudolisogenia el fago inyecta su DNA en la célula pero no se reproduce ni integra su genoma en el cromosoma bacteriano; generalmente ocurre cuando las células se encuentran en una situación de crecimiento desfavorable, posiblemente como una estrategia para preservar la sobrevida del genoma del fago hasta que las condiciones de crecimiento celular son nuevamente favorables; *i.e.* el fago phi29 es un fago lítico de *Bacillus subtilis*, y puede mantenerse en un estado inactivo en las esporas de su hospedador. Otro ejemplo es el fago temperado P22, luego de infectar a *Salmonella typhimurium* el fago se mantiene por un largo período en estado de pseudolisogenia, antes de integrarse en el genoma de su hospedador. En la infección crónica, luego de la infección y reproducción, partículas maduras del fago se liberan continuamente sin producir la muerte celular.

Se reconocen cinco etapas en el proceso de infección. La partícula viral se fija a la bacteria huésped (adsorción) a través del reconocimiento de receptores específicos presentes en la envoltura celular e inyecta su ácido nucleico (penetración; la inyección del DNA puede ser sincronizada o no, en función de la temperatura y la presencia de sales de Mg, factores que afectan la fluidez del DNA empaquetado en las cápsides); el fago luego expresa sus genes de una manera coordinada usando la maquinaria celular

(transición del metabolismo celular, controlado por el fago), para producir nuevas copias de las proteínas y ácidos nucleicos del fago, las que se ensamblan en un gran número de nuevas partículas virales (morfogénesis); finalmente, la envoltura celular se rompe (lisis celular) y se liberan los nuevos virus para infectar nuevas bacterias. En bacterias Gram negativas se han identificado dos sistemas que participan en la etapa de lisis celular: el modelo holina-endolisina y el modelo pinholina-endolisina SAR (*Signal anchor release*); en ambos modelos participan endolisinas, holinas y espaninas. En el primero, la endolisina responsable de la digestión del peptiglicano (PG) de la pared celular se sintetiza y se acumula en el citoplasma; la holina se acumula en la membrana interna y su actividad es controlada por una antiholina; y las dos espaninas se localizan, una en la membrana interna (MI) y la segunda en la membrana externa (ME) de las células. Cuando se produce un colapso de la fuerza protomotriz (FPM), las holinas se activan y forman pequeños poros en la MI que permiten la salida de la endolisina, la cual degrada el PG. La degradación del PG per se no produce la lisis celular, aunque las células se vuelven esféricas, pero actúa como señal activando a las espaninas que producen la fusión de las membranas, gatillando la lisis celular. En el segundo modelo, la endolisina SAR se secreta al periplasma y queda anclada en MI por la señal SAR. Cuando la holina en la MI dimeriza, produciendo poros de mayor tamaño que en modelo anterior, y la FMP colapsa, lo que produce la liberación de la endolisina de la secuencia SAR. La degradación del PG es nuevamente la señal para que las espaninas se activen provocando la lisis celular.

Los fagos virulentos siguen un ciclo lítico y se comportan como parásitos intracelulares obligados. En este caso se presenta una carrera armamentista permanente entre la bacteria, presentando diversos mecanismos de defensa contra el fago, y el fago, generando nuevas variantes para superar las barreras presentadas por las bacterias u optimizando su nuevo ciclo de infección. En la Tabla 1 se sintetizan los principales mecanismos de defensa bacterianos estudiados y las estrategias de los fagos para superarlos [5-14].

Tabla 1. Mecanismos de resistencia

Mecanismo de inhibición	**Mecanismos de Resistencia/contrarresistencia**
Interferencia de la adsorción	Modificación o mutación de los receptores específicos (proteína; polisacárido; lipopolisacárido; o ácidos teicoicos) de la superficie celular / Mutación en la proteína RBP (proteína del fago que une al receptor) puede reconocer el receptor mutado o adaptarse a nuevos receptores celulares. Variación de fase en la expresión del receptor / Expresión simultánea de dos formas RBP en las partículas del fago para infección especializada. Producción de exopolisacáridos (EPS) que enmascaran el receptor/ Producción de hidrolasas que degradan el EPS.
Bloqueo de la inyección del DNA del fago	Lipoproteínas ancladas a la membrana celular o proteínas asociadas con los componentes de la membrana pueden modificar la conformación del sitio de entrada del DNA del fago y bloquear su inyección en la célula huésped. A veces, estas proteínas son codificadas por un fago (profago o fago virulento: mecanismo de exclusión de la superinfección), para conferir inmunidad contra otros fagos: *i.e.* la proteína Imm del fago T4 bloquea la translocación del DNA de otros fagos en el citoplasma de la célula ya infectada por el fago T4.

Degradación del genoma del fago inyectado	A- Los sistemas de RM consisten en una endonucleasa de restricción (R) y en una metiltransferasa (M). La función principal del sistema es proteger a la célula contra la invasión de DNA exógeno. El DNA del hospedador se encuentra protegido por metilación; cuando el DNA del fago no metilado ingresa en una célula que posee el sistema (RM) será reconocido y degradado por la enzima de restricción / Este tipo de resistencia es reversible; el fago puede incorporar en su genoma a M para escapar de R, o bien pueden mutar la secuencia de reconocimiento de R. El sistema DISARM es similar al sistema RM, pero la enzima de restricción requiere de múltiple componentes. Son módulos integrados por cinco genes y localizados en islas de defensa. Finalmente, el sistema pAgos utiliza moléculas de DNA y RNA como guías para degradar el DNA invasor. B- En los sistemas CRISPR–Cas (por *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), las células mutantes a la infección incorporan en el locus CRISPR una pequeña secuencia del DNA del fago ("espaciador"), el que una vez transcripto será utilizado como guía de las nucleasas Cas para degradar el genoma del fago en un nuevo ciclo de infección / Los fagos pueden superar esta barrera por mutación o inactivando el sistema CRISPR-Cas mediante la expresión de proteínas anti-CRISPR-Cas.
Infección abortiva (Abi)	Los sistemas Abi de resistencia abortan el proceso de infección y simultáneamente conducen a la muerte de la célula hospedadora. Los blancos de acción son múltiples; un mecanismo Abi puede interferir en la replicación del genoma, o en las etapas de transcripción y traducción, y ensamblado de los fagos / Generalmente los fagos superan estas barrera por mutación espontánea y adaptación.

A. Inyectado por sistemas de inmunidad innata: i) Enzimas de restricción/modificación (RM); ii) Islas de defensa asociadas a RM (DISARM); iii) Proteínas argonauta (pAgos) .
B. Inmunidad adquirida: sistemas CRISPR-CAS

La evolución recíproca que se establece entre ambos es un importante impulsor de los procesos ecológicos y evolutivos en las comunidades microbianas.Por el contrario, los fagos temperados pueden multiplicarse a través del ciclo lítico o ingresar al ciclo lisogénico integrando su genoma, de manera reversible, en el cromosoma de la célula huésped (se denomina profago al fago integrado y lisógeno a la bacteria portadora del profago). La integración del profago puede ser preferentemente en un sitio específico del genoma bacteriano (*i.e.*, el profago lambda se integra entre los genes gal y bio de la bacteria *E. coli*) o al azar (*i.e.*, fago Mu). En ciertos casos, el profago puede mantenerse no integrado, como un plásmido en el citoplasma de la bacteria (*i.e.*, el fago P1, con un genoma de DNA circular de doble hebra, y el fago N15, con su genoma de DNA circular de simple hebra). El genoma del profago se replica junto al genoma bacteriano y el estado lisogénico se mantiene por la represión de los genes responsables del ciclo lítico del fago. Sin embargo, de manera espontánea o bajo ciertas condiciones específicas que dañan el DNA bacteriano e inducen la respuesta celular SOS (*i.e.* estrés ambiental, tratamiento con antibióticos, estrés oxidativo, luz UV), los profagos pueden activar su ciclo lítico de reproducción. Muchas bacterias no son lisógenos, mientras que algunos lisógenos codifican más de una docena de profagos (polilisogenia); incluso muchos de ellos pueden no ser funcionales (no generar partículas completas de fagos) aunque su permanencia en el genoma bacteriano sugiere que contribuye al fitness de la bacteria. Se estima que el 14% de los genomas de *E. coli* corresponden a genes de profagos. Factores tales como una alta multiplicidad de infección, un pequeño volumen celular y el crecimiento celular en condiciones limitadas en nutrientes y a bajas temperaturas, incrementan la frecuencia de lisogenización. En un reciente estudio se ha descripto que la producción de un pequeño péptido de 43 aminoácidos codificado por un fago temperado,

denominado phi3T, estimula la lisogenización de la población a través de un mecanismo del tipo *quorum sensing*. El péptido, denominado *arbitrium*, es procesado por la bacteria huésped y secretado; el péptido liberado, es luego incorporado por otros miembros de la población bacteriana y utilizado para inhibir un regulador del fago (AimP) que estimula la expresión del ciclo lítico del fago en toda la población. Este tipo de estudios de interacción fago-fago son cada vez más frecuentes y han determinado que se establecen relaciones de competencia y de mutualismo entre los fagos en los procesos de coinfección, lo que ha llevado a proponer una nueva rama de estudio, la virología social.

El ciclo de vida del fago temperado lambda tiene un estatus especial en la historia de la biología molecular; es uno de los sistemas biológicos más estudiados y dio lugar a varios descubrimientos de gran importancia (*i.e.*,toma de decisiones entre los ciclos líticos-lisogénicos; mecanismos de recombinación; y concepto de control negativo de la transcripción mediado por una molécula represora. El profago lambda se integra en el genoma de su hospedador sin producirle ningún daño aparente.

Las interacciones entre profagos y lisógenos pueden ser beneficiosas para ambos miembros en términos evolutivos. Mientras la célula toma a su cargo la replicación del genoma del fago, en algunas circunstancias, el profago puede expresar ciertas proteínas que mejoran la supervivencia bacteriana (fenómeno conocido como “conversión lisogénica”). Estas proteínas se encuentran codificadas en el fago en regiones conocidas como “moron”. Un moron es una unidad transcripcional independiente, con su propio promotor y región terminadora, y que contiene un porcentaje en GC distinto al contenido en GC de regiones contiguas, producto de una transferencia horizontal. Por ejemplo, algunos fagos portan los genes responsables de la producción de toxinas (*i.e.*, toxina Shiga) y, al integrarse como profagos, convierten una bacteria no patógena en patógena. Enfermedades como la difteria, el cólera, el síndrome urémico hemolítico, el botulismo, o la escarlatina son mediadas por toxinas que están codificadas por fagos; la expresión de esas toxinas se incrementa si se inducen los profagos (i.e, luego del tratamiento con ciertas clases de antibióticos como las quinolonas, que inducen la respuesta SOS), lo que puede agravar la enfermedad. La liberación de las toxinas al medio externo puede estar mediada activamente por mecanismos de secreción celular del tipo III (*i.e.*, toxina del cólera) o luego de la lisis celular (i.e toxina Shiga). Otros ejemplos de factores de virulencia codificados en profagos contribuyen en el fenómeno de exclusión a la superinfección; mejoran la interacción e invasión del patógeno en células epiteliales; contribuyen en la evasión de la respuesta inmune u otorgan una mayor resistencia a la misma mediante la expresión de actividad superóxido dismutasa o de factores mitogénicos; afectan la formación de biopelículas; y expresan sistemas de toxina-antitoxina o proteínas anti CRIPRs. Los profagos pueden también causar la inactivación de genes cromosómicos durante la inserción lo que da lugar a la pérdida de función de dichos genes. Este proceso puede dar lugar a una conversión lisogénica negativa (*i.e.* la inactivación del gen responsable de la síntesis de la enzima lisina descarboxilasa en *Shigella*) [15] o bien a un fenómeno conocido como lisogenia activa: si la función del gen inactivado es esencial para el crecimiento celular bajo ciertas condiciones, el profago se escinde y regenera el sitio de inserción, contribuyendo de manera activa en la recuperación del gen inactivado durante la integración. Por ejemplo, las células del patógeno *Listeria monocytogenes* requieren del factor sigma ComK para expresar los genes necesarios que le permitan escapar de los fagosomas en las células eucariotas. En esas condiciones, un profago inserto en el gen comK se escinde y se mantiene libre en el citoplasma bacteriano, posiblemente en un estado de pseudolisogenia, permitiendo la expresión de ComK. Una vez que la bacteria se encuentra libre en el citoplasma celular, el fago se reinserta nuevamente en comK, inactivándolo (lisogenia activa reversible). Una situación similar ha sido descripta en *Bacillus subtilis*: un fago remanente, denominado skin, se escinde de manera precisa de su sitio de integración lo que permite la expresión del factor Sigma

K, necesario para la expresión de los genes de esporulación en la célula madre. El elemento skin no posee la capacidad de reintegrase, por lo que se pierde en la célula madre, pero se mantiene aún integrado en las endosporas (lisogenia activa irreversible). La expresión de los factores de virulencia codificados en los profagos puede estar regulada mediante factores de transcripción bacterianos (*i.e.*, en la expresión de la toxina del cólera participan los factores de transcripción de la bacteria *Vibrio cholerae*). En conjunto, cuando un fago temperado integra su DNA en el cromosoma bacteriano se establece una relación con beneficios mutuos para el lisógeno y el profago. En esta situación, el fago contribuye en los procesos ecológicos y evolutivos de los lisógenos como agentes de transferencia horizontal de genes, como armas de competencia bacteriana, y como fuente de variación genética para la innovación evolutiva.

Fagos intestinales y respuesta inmune

El intestino humano contiene una de los ecosistemas más densamente poblados, el cual es esencial para la salud humana. La microbiota intestinal es una comunidad compleja de microorganismos integrada por bacterias, arqueas, hongos y virus. Los estudios de población han resultado en una mejor caracterización de la estructura y funciones del componente bacteriano de esta comunidad en individuos sanos, y de los factores que influyen en su composición, como la dieta, la edad, y el estado de salud; sin embargo, la composición y función del componente viral, que posee el potencial de modular el componente bacteriano, ha sido menos estudiado y su posible contribución en la salud y la enfermedad aún no se ha determinado.

El viroma intestinal comprende virus eucariotas y fagos, siendo los fagos las entidades más abundantes en el intestino. En muestras fecales de individuos adultos, se ha determinado una abundancia de 10^{9-10} partículas virales y de 10^{11-12} bacterias por gramo de heces, lo que resulta en una proporción de fago/bacteria de aproximadamente 0,1 a 1. Está relación es mucho menor a la estimada en muestras marinas (que puede variar entre 2.6 a 160), y se explica porque en el intestino humano hay una mayor abundancia de fagos temperados en comparación con los fagos líticos. La relación fago/bacteria no es consistente en todo el tracto gastrointestinal, observándose un incremento de la misma en las superficies mucosas de los seres humanos y de diferentes especies animales. Las proteínas de la cápside de algunos fagos poseen dominios del tipo Ig que interactúan con la glicoproteína de la mucina, facilitando la adhesión de los mismos a la mucosa del sistema gastrointestinal. Esta interacción podría facilitar la frecuencia de las interacciones entre los fagos y las bacterias, estimulando la transferencia horizontal de genes a las células del microbioma, proporcionando genes que confieren una ventaja competitiva en el ecosistema donde ambos residen, y/o protegiendo al hospedador de infecciones bacterianas.

Los fagos colonizan el intestino infantil en un etapa temprana del individuo (se detectan 108 partículas víricas por gramo de heces en bebés de 7 días); sin embargo, el “fagoma” del intestino de adultos sanos es más abundante, diverso y estable que el “fagoma” del intestino de infantes sanos. En adultos el “fagoma” comprende al menos 1000 secuencias de fagos y profagos, el 77% de los cuales son fagos con cola con DNA de doble cadena. Se detectan también fagos de DNA de cadena simple de la familia Microviridae. Los fagos de RNA presentes en el intestino humano representan menos del 0,02%. Un 50% de las secuencias de fagos no pudieron ser clasificadas aún por la limitación de los bancos de datos públicos. En la mayoría de los metagenomas de muestras fecales humanas se detectan genes que codifican para integrasas y otros genes que son el sello de un estilo de vida lisogénico. Sin embargo, es importante tener en cuenta las dificultades que limitan los estudios del fagoma intestinal humano, como la falta de regiones conservadas en genomas virales (como el gen 16S rRNA en procariotas) para realizar amplificaciones dirigidas, la dificultad de amplificar simultáneamente múltiples tipos de genomas virales (lineales o circulares de RNA o

DNA monocatenario o bicatenario), así como el no disponer de bases de datos virales completas. [16-18].

El fagoma intestinal infantil muestra una gran dinámica. Los fagos colonizan tempranamente el intestino del recién nacido y a la semana del nacimiento se detectan principalmente siphovirus. Durante los primeros meses de vida se producen cambios drásticos en la diversidad y abundancia de los fagos, y luego, hasta los dos años, la población del microbioma bacteriano, los virus eucariotas y miembros de la familia Microviridae se expanden mientras la población de fagos del orden Caudovirales se contraen [19]. Una vez estabilizado, el viroma intestinal de un individuo sano es temporalmente estable y un 80-95% de los mismos genotipos virales pueden identificarse durante un período de dos años y medio.

Existe una alta variación entre los fagomas intestinales en adultos, lo que indica que la composición del fagoma intestinal de un individuo adulto sano es única. Los estudios realizados con fagomas y microbiomas intestinales de gemelos monocigóticos (MZ) adultos mostraron una relación directa entre la diversidad de los fagomas y la diversidad de los microbiomas, y una mayor diversidad de los fagomas en aquellas parejas MZ cuyos microbiomas eran menos concordantes. La dieta, de manera directa o indirecta, puede afectar la composición de los fagomas, lo que podría explicar las diferencias observadas. Se ha establecido también una fuerte correlación entre la diversidad de los fagomas con el modo de nacimiento (natural versus cesárea) y con ciertas enfermedades asociadas a un desequilibrio del microbioma intestinal.

Los estudios de metagenómica comparativa del microbioma intestinal sugieren el concepto de un “microbioma intestinal saludable”, donde microorganismos similares proporcionan funciones similares que contribuyen a la homeostasis intestinal. La estructura del microbioma intestinal saludable sería conservada a un nivel taxonómico superior (de filo), donde predominan Firmicutes y Bacteroides, y estaría conformada por un núcleo de especies, compartidas por más del 90% de los individuos, que proporcionarían las funciones beneficiosas. Un concepto similar, el “fagoma intestinal saludable”, ha sido propuesto para describir los fagos comunes presentes en los microbiomas intestinales de la mayoría de individuos sanos y que serían críticos en el mantenimiento de la estructura y función de un ecosistema intestinal saludable. De los 4301 fagos detectados en el estudio, se determinó que 23 estaban presentes en más del 50% de las muestras. Se observó que la presencia de los fagos comunes en individuos sanos era inferior en individuos que padecían enfermedades gastrointestinales (enfermedad de Chron y colitis ulcerosa).

La microbiota de un infante sano es rica en bacterias Gram positivas mientras que en la microbiota de un adulto sano predominan Bacteroides, Firmicutes y Proteobacterias [20]. Si los fagos modulan la microbiota intestinal, entonces tendrían un impacto indirecto en las interacciones microbio-huésped y por lo tanto en la salud del huésped. Se ha demostrado una relación directa entre salud y diversidad y riqueza genética del microbioma, y entre este y la riqueza y diversidad del fagoma del intestino humano. Los fagos pueden translocarse a través de la mucosa intestinal hasta los ganglios linfáticos locales y los órganos internos, lo que lleva a interacciones íntimas con el sistema inmunitario del huésped. Algunos estudios sugieren que el cambio en la composición del fagoma (*i.e.*, un incremento en la abundancia de Caudovirales) está asociado a la inflamación del intestino grueso y del recto (colitis ulcerosa, CU). A su vez, ciertos fagos proporcionan una inmunidad indirecta al huésped lisando a las bacterias susceptibles que se encuentren a lo largo del intestino; estos fagos interaccionan con la mucina del moco intestinal a través de unos dominios, expuestos en la cápside del fago, de proteínas similares a inmunoglobulinas (Ig).

En un reciente estudio in vivo de fagoterapia, realizado con un cóctel de tres fagos activos contra una cepa de *E. coli* con características adherente-invasiva, se observó que los transcriptos asociados a los sistemas de inmunidad innata y adquirida estaban up-regulados en los animales tratados con los fagos respecto a los

animales controles [21]. En animales libres de gérmenes, el tratamiento con los fagos estimuló, en las placas de Peyer, la producción de la interferón gamma (IFN-?) por linfocitos T CD4+. Una respuesta similar se observó con dos fagos activos contra *Lactobacillus plantarum* y *Bacteroides thetalotaomicron*, dos bacterias comensales del intestino. Se demostró que los fagos inducen una respuesta inmune específica y que actúan como adyuvantes; que la respuesta inmune es inducida por el ácido nucleico de los fagos, y no por sus proteínas de cápside; y que la respuesta inmune fue mediada por células dendríticas a través del receptor tipo Toll 9 (TLR9).

Aunque se ha sugerido la identificación de fagos como biomarcadores de salud y enfermedad (*i.e.* los fagos contra Clostridiales y Alteromonadales), nuestro conocimiento es aún demasiado limitado para apreciar plenamente la importancia de los fagos en la salud humana y especialmente si juegan un papel en el desarrollo de enfermedades intestinales tales como enfermedades inflamatorias del intestino [22].

Aplicaciones biotecnológicas

Desde su descubrimiento hace ya más de 100 años los bacteriófagos han sido aplicados en numerosas áreas biotecnológicas, que van desde el tratamiento de infecciones humanas mediante fagoterapia: phage display, biopreservación y seguridad alimentaria, control biológico de patógenos de plantas,y biosensores, hasta el control de corrosión y desinfección de superficies [23-24]

Hay distintas aplicaciones de fagos y sus enzimas, algunas de ellas indicadas en la Tabla 2

Tabla 2: se indican distintas aplicaciones de fagos y sus enzimas [25-36].

Aplicación	Descripción	Ejemplos/Productos
Fagoterapia	Uso de fagos estrictamente líticos como alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos	Infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente, en un paciente diabético de 68 años con pancreatitis necrotizante y *Mycobacterium abscessus*, en una paciente de 15 años de edad con un doble transplante de pulmón), y que no respondían a los tratamientos antibióticos convencionales, fueron tratadas con éxito mediante la administración de un cóctel de fagos. Estos tratamientos son personalizados (“a la carte”) y exigen el aislamiento y la caracterización exhaustiva de fagos líticos o la inactivación de la integrasa de mycofagos temperados

Productos de fagos como antimicrobianos, en diagnóstico y nanotecnología	Uso de endolisinas purificadas o de fagos modificados genéticamente para tratamientos antibacterianos; los fagos contienen y expresan genes letales (endonucleasas de restricción, holinas, sistemas toxina-antitoxina) o han sido conjugados con proteínas que condensan el DNA o con antibióticos. Uso de fagos filamentosos, fagos ?, T4 y mycovirus modificados para la administración dirigida de agentes terapéuticos o en diagnóstico.	Staphefekt (Micreos Salud Humana, Países Bajos), producto disponible comercialmente que contiene una endolisina para el tratamiento de infecciones de piel causadas por *Staphylococcus aureus*. Fago T7 recombinante que expresa una enzima degradadora de exopolisacáridos (EPS) activa contra biopelículas de *E. coli* patógenas. SASPject; Terapéutica Fico, (Cambridge, Reino Unido), fagos que portan endonucleasas de restricción, holinas, sistemas toxina-antitoxina o proteínas que condensan el DDN.
Biocontrol: seguridad alimentaria y en agricultura	Uso de fagos líticos para controlar patógenos responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos, o para reducir/eliminar las bacterias patógenas en sus reservorios o en las superficies y equipos.	Productos aprobados por la Food and Drug Administration para ser aplicados a distintos tipos de alimentos frescos y procesados (ensaladas listas para el consumo; productos derivados de aves, peces, etc.) y disponibles en el mercado: ListShield (Intralytix) o LISTEX (Micreos Food Safety) para el control de *Listeria monocytogenes*; Ecolicide® (EcolicidePX™), EcoShield (Intralytix) y Finalyse® (Passport Food Safety Solutions) para el control de *E. coli* O157: H7; SalmoFresh™ (de Intralytix) y SALMONELEX y PhageGuard S™ (Micreos Food Safety) para el control de Salmonella; ShigaShield™ y ShigActive™ (Intralytix) para el control de *Shigella spp*. Agriphage (Omnilytics) para el control de *Xanthomonas campestris*
Phage display	Diseño de fagos con superficie decorada con péptidos o proteínas heterólogas, para el estudio de interacciones péptido-proteìna, proteína-proteìna, y proteína-DNA	Numerosas aplicaciones, entre ellas: la identificación de epítopes; el suministro de antígenos; el descubrimiento de fármacos; el diseño de vacunas, en bioimagen y biosensores; y en el diseño de nanomateriales. Mediante *phage display*, los péptidos o todo el fago pueden ser diseñados, por ejemplo, para enlazar y liberar medicamentos, vacunas o etiquetas de imagen en ubicaciones específicas para identificar u orientar células cancerosas o infecciones bacterianas. Existen en el mercado diversos kits de diagnóstico para la detección de patógenos humanos.

Un importante número de subsidios han sido otorgados por National Institutes of Health (NIH) para el estudio de fagos como potencial alternativa a los antibióticos tradicionales y numerosas compañías

biotecnológicas en los últimos años han surgido alrededor del mundo para el desarrollo de nuevos productos; entre ellas: MICROGEN, Intralytics, AmpliPhi Biosciences Corporation, BiomX, Locus Biosciences, Center of Phage Technology, Phage Biotech Ltd., Fixed-Phage Limited, InnoPhage, Pherecydes Pharma, y TechnoPhage SA).El mercado mundial de los fagos en 2017 fue de 568 millones de dólares y se estima que crecerá durante el período 2017-2025 a un promedio anual de 3.9% hasta alcanzar los 800 millones en 2026. Los productos que contienen fagos se aplican principalmente en el sector de alimentos y bebidas (https://www.credenceresearch.com/report/bacteriophage-market). El desarrollo de nuevas biotecnologías a “hombros de estos pequeños gigantes” se desarrolla sin duda a una velocidad vertiginosa.

Referencias:

1. **Douglas J** (1975) Bacteriophages. USA: *Springer*

2. **Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris J** (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

3. **Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja VV, Koonin EV** (2010) New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends in Microbiology* 18:11-19

4. **Raya RR, Klaenhammer TR** (1992) High-frequency plasmid transduction by Lactobacillus gasseri bacteriophage phiadh. *Applied and Environmental Microbiology* 58:187-93

5. **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath** (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-1712

6. **Chaudhary K, Chattopadhyay A, Pratap D** (2018) Anti-CRISPR proteins: Counterattack of phages on bacterial defense (CRISPR/Cas) system. *Journal of Cell Physiology* 233:57-59

7. **Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R** (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science* 359(6379) eaar4120

8. **Han W, She Q** (2017) CRISPR History: Discovery, characterization, and prosperity. Progress in Molecular Biology and Translational *Science* 152:1-21

9. **Kutter E, Raya R, Carlson K** (2004) Molecular mechanisms of phage infection. Bacteriophages: Biology and Applications. USA: *CRC Press*

10. **Labrie SJ, Samson JE, Moineau S.** (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews in Microbiology* 8:317-327

11. **Ofir G, Melamed S, Sberro H, Mukamel Z, Silverman S, Yaakov G, Doron S, Sorek R** (2018) DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature Microbiology* 3:90–98

12. **Stern A, Sorek R** (2011) The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays* 33:43-51

13. **Sturino JM, Klaenhammer TR** (2004) Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 56:331-78

14. **Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Snijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJJ, van der Oost J** (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* 507:258–61

15. **Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP** (2015) Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology* 23:171-178

16. **Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD** (2011) The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Research* 21:1616-1625

17. **Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI** (2010) Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466:334-338

18. **Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F** (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology* 185:6220-6223

19. **Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, WRNAer BB, Tarr PI, Wang D, Holtz LR** (2015) Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine* 21:1228-34

20. **Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Doré J, Leclerc M** (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57:424-5

21. **Gogokhia L, Buhrke K, Bell R, Hoffman B, Brown DG, Hanke-Gogokhia C, Ajami NJ, Wong MC, Ghazaryan A, Valentine JF, Porter N, Martens E, O'Connell R, Jacob V, Scherl E, Crawford C, Stephens WZ, Casjens SR, Longman RS, Round JL** (2019) Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. *Cell Host Microbe* 25:285-299

22. **Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP**. (2013) Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes* 4:4-16

23. **Lin DM, Koskella B, Lin HC** (2017) Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 8:162-173

24. **Sulakvelidze A** (2013) Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:3137-3146.

25. **Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T** (2017) Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant Acinetobacter baumannii infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: e00954-17

26. **Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H** (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus. *Nature Medicine* 25:730-33

27. **Fischetti VA** (2018) Development of phage lysins as novel therapeutics: A historical perspective. *Viruses* 10: E310

28. **Henry M, Debarbieux L** (2012) Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology* 434:151-161

29. **Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A** (2018) Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses* 19:10(4). pii: E205

30. **Piuri M, Hatfull GF** (2019) Fluoromycobacteriophages for drug susceptibility testing (DST) of mycobacteria. *Methods in Molecular Biology* 1898:27-36.

31. **Raya RR, Varey P, Oot RA, Dyen MR, Callaway TR, Edrington TS, Kutter EM, Brabban AD** (2006) Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce Escherichia coli O157:H7 levels in sheep *Applied and Environmental Microbiology* 72:6405-10.

32. **Raya RR, Oot RA, Moore-Maley B, Wieland S, Callaway TR, Kutter EM, Brabban AD** (2011) Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce Escherichia coli O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage* 1:15-24

33. **Roach DR, Donovan DM** (2015) Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* 5:e1062590

34. **Salmond GP, Fineran PC** (2015) A century of the phage: past, present and future. *Nature Review Microbiology* 13:777-86

35. **Sillankorva S, Oliveira H, Azeredo J** (2012) Bacteriophages and their role in food safety. International *Journal of Microbiology* doi: 10.1155/2012/863945

36. **RahbRNAia L, Farajnia S, Babaei H, Majidi J, Veisi K, Ahmadzadeh V, Akbari B** (2017) Evolution of phage display technology: from discovery to application. *Journal of Drug Targeting* 25:216-24

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Volumen 18, Número 2, Agosto de 2019

ID artículo:E0165

Versión online