

Las endolisinas, una terapia emergente para combatir la resistencia antibiótica: Una revisión sistemática

*Aguilar-Jiménez Luisa María, Arango Mendoza Ana Sofía¹,
Muñoz Pérez Diana María²*

Resumen

Durante las últimas décadas, la resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas (AMR, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una de las mayores preocupaciones de la Organización mundial de la salud y es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Diferentes investigaciones han encontrado ciertas proteínas con capacidad lítica, podrían funcionar como tratamiento alternativo contra estas bacterias resistentes. Para ampliar el conocimiento sobre este tema, se realizó una revisión sistemática con el objetivo de reconocer las características de las endolisinas, su capacidad antimicrobiana sobre diferentes tipos de patógenos bacterianos y la viabilidad de su uso con fines terapéuticos in vivo. En esta revisión se encontró que las endolisinas tienen un efecto antimicrobiano positivo.

Palabras clave: Endolisinas, resistencia antibiótica, terapia con fagos.

1 Estudiantes programa Microbiología, Universidad Libre Pereira.

Correos: Luisam-aguijarj@unilibre.edu.co - anas-arangom@unilibre.edu.co.

2 Profesora Asesora. Universidad Libre Pereira. Correo: dianam.munozp@unilibre.edu.co

Endolysins, an emerging therapy to combat antibiotic resistance: A Sistematic Review

Abstract

During the last decades, antimicrobial resistance of pathogenic bacteria (AMR) has become one of the major concerns of the World Health Organization and is one of the main causes of mortality worldwide. Different investigations have found that certain proteins with lytic capacity could function as an alternative treatment against these resistant bacteria. In order to broaden the knowledge on this subject, a systematic review was carried out with the aim of recognizing the characteristics of endolysins, their antimicrobial capacity against different types of bacterial pathogens and the feasibility of their use for therapeutic purposes in vivo. In this review it was found that endolysins have a positive antimicrobial effect.

Key Words: Endolysins, Drug resistance, phage therapy.

1. Introducción

Desde que la Penicilina fue descubierta por Alexander Fleming, los antibióticos han conformado una parte fundamental en el desarrollo de la medicina moderna, reduciendo significativamente la mortalidad, tanto de enfermedades infecciosas como en procedimientos de alto riesgo (1). Sin embargo, debido a diversos factores como la sobreexposición a altas dosis, la variación de los tiempos de tratamiento establecidos, la automedicación y la aplicación constante de productos químicos en la industria alimentaria y ganadera, gran variedad de cepas bacterianas; ha desarrollado mecanismos de resistencia capaces de evadir el espectro de acción de múltiples antibióticos (MDR, bacterias multirresistentes) (2,3). Esto significa que las bacterias se encuentran en constante evolución; sobreviviendo y multiplicándose en cepas más difíciles de tratar, lo que puede causar enfermedades graves asociadas o incluso la muerte (4)

Durante las últimas décadas, la resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas (AMR, por sus siglas en inglés), se ha convertido en una de las mayores preocupaciones de la Organización mundial de la salud (OMS) y en una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. De las 12 cepas reconocidas como multirresistentes, 9 corresponden a bacterias Gramnegativas cuya resistencia intrínseca se basa en la composición de su pared celular (5). Según Huemet *et al.* (1) cada año 700.000 personas mueren por infecciones de AMR principalmente de procedencia intrahospitalaria, además se cree que para el año 2050 este número se elevará hasta los 10 millones por año.

Por esta razón, la comunidad científica se ve en la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos para estos patógenos; pues la fabricación de nuevos antimicrobianos solo ha provocado la aparición de nuevas cepas AMR, como es el caso de la Daptomicina. Este es un antibiótico lipopeptídico cíclico, que se utiliza para el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas (6) y el cual, poco tiempo después de haber sido aprobado para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* y cepas de *Enterococcus*, ocasionó que estas, generaran mecanismos de resistencia, al igual que con la vancomicina y la metilicina (7,8).

Los científicos han estudiado la relación parasitaria que existe entre bacterias y virus. Los virus ingresan a la bacteria evadiendo sus mecanismos de defensa (enzimas de restricción) con el objetivo de replicar su material genético y ensamblar nuevos fagos que saldrán al espacio extracelular, provocando lisis celular (9).

Para atravesar la pared celular de las bacterias, los bacteriófagos utilizan enzimas codificadas durante la transcripción del genoma, que se encargan de degradar el peptidoglucano de la pared celular y provocar lisis por presión osmótica (10).

La mayoría de ellos utilizan dos grupos de proteínas (categorizadas en el grupo de las hidrolasas) para matar a la célula huésped. Las primeras, conocidas como Holinas actúan en conjunto con las Endolisinas (11). Recientemente algunos estudios han demostrado que estas enzimas pueden ser dirigidas a un blanco en específico y no son susceptibles a los sistemas convencionales de resistencia antibiótica de las bacterias, como las bombas efflux o proteínas de unión a penicilina (9,12).

A pesar de que por sí solas pueden actuar como antimicrobianos, poseen mayor efectividad en bacterias Gram positivas, debido a que la composición de su pared es menos compleja que la de las bacterias Gram negativas. Además, la membrana externa de estas últimas evita la degradación completa del peptidoglucano (5).

Esta revisión tiene como objetivo reconocer las características de las endolisinas, su capacidad antimicrobiana sobre diferentes tipos de patógenos bacterianos y la viabilidad de su uso con fines terapéuticos en experimentos *in vivo*.

2. Metodología

Se realizó una búsqueda de la literatura en tres bases de datos: Pubmed, Science direct y Scopus. La ecuación de búsqueda fue la siguiente: (Antibiotic AND resistance AND phage AND therapy AND

Endolysin); además de estas palabras clave se establecieron dos filtros: información de los últimos 2 años y ensayos clínicos.

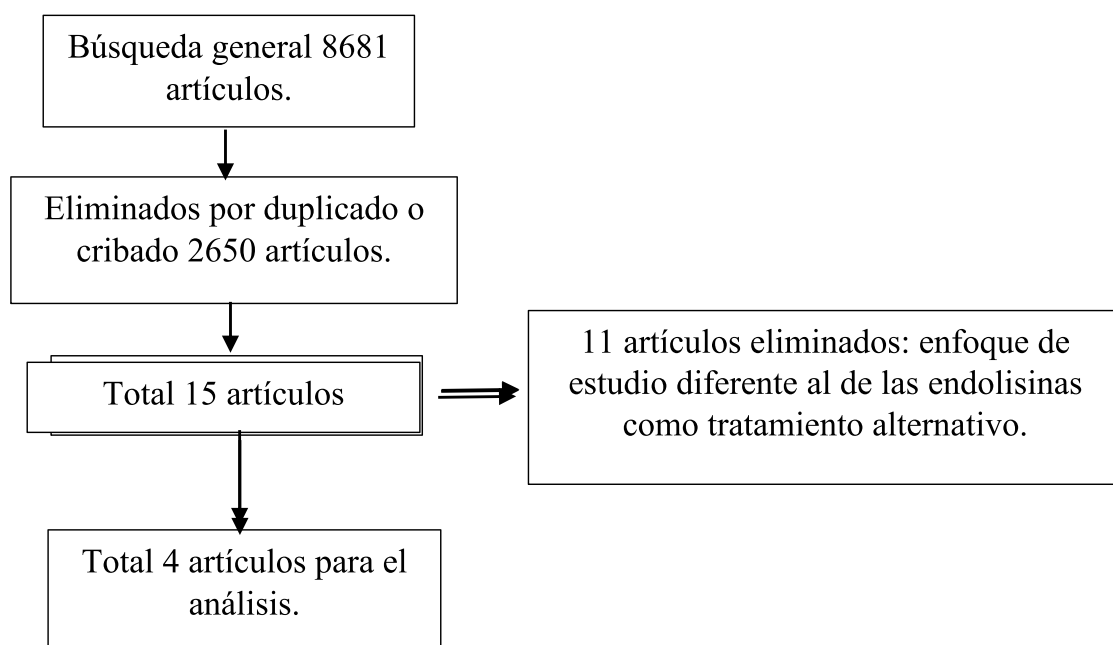
Por último, se incluyeron únicamente estudios e investigaciones originales, en donde se analizó la capacidad lítica de la endolisina, tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos de sepsis en ratones y en peces cebra.

3. Resultados

3.1 Resultados de la búsqueda

Se realizó la lectura de 4 artículos de investigación que presentaron los criterios de inclusión utilizados en la búsqueda, principalmente enfocados al estudio de las endolisinas como alternativa para el uso de antibióticos en infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Los criterios de la búsqueda se describen en la figura 1.

Figura 1. Diagrama de flujo de la información a través de las diferentes fases de la revisión sistemática



3.2 Recopilación de la información

Las cepas utilizadas por los diferentes investigadores fueron *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumani* y *Staphylococcus aureus* con capacidades multirresistentes a antibióticos convencionales. Se realizaron ensayos in vitro para evaluar las características líticas y sinérgicas de la proteína; y varios ensayos in vivo, con ratones de bioterio para comprobar el efecto tóxico y los efectos secundarios en los seres vivos. A continuación, se hablará de cada una de las publicaciones y los resultados obtenidos en cada una de las investigaciones (tabla 1 en anexos).

3.2.1 Efecto sinérgico entre la endolisina y los antibióticos

El efecto de la endolisina Cpl-711 en conjunto con los antibióticos tradicionales (Amoxicilina (AMX), Cefotaxime (CTX), Levofloxacina (LVX) y Vancomicina (VAN)), como tratamiento para *Streptococcus pneumoniae*, fue estudiado por letrado et al. (13), utilizando el ensayo de tablero de ajedrez para medir la sinergia por cada tratamiento. Entre los resultados (anexo 1) más relevantes, se puede observar un sinergismo total entre las partes, pues no se presentó inhibición o antagonismo durante el proceso. Cabe resaltar que el valor más alto de FICI (Concentración inhibitoria fraccional), equivalente a 0,91, ocurrió en presencia de la amoxicilina utilizada para atacar el aislado D3498 durante el experimento.

El tiempo de muerte de las cepas bacterianas fue aproximadamente 6 horas a partir de la aplicación del tratamiento, sin embargo, no afectó de la misma

manera a todas las cepas y varió según los antibióticos utilizados para la prueba.

3.2.2 Actividad Lítica

El efecto lítico de la endolisina fue estudiado bajo diferentes protocolos. En primer lugar, Wu et al (14), compararon su capacidad inhibitoria con la de un bacteriófago previamente aislado, a su vez, se observó cualitativamente su alta efectividad en la degradación del peptidoglucano. Los resultados del análisis lítico se presentaron a través de la toma de la densidad óptica, en donde la turbidez de la cepa *Acinetobacter baumani* multirresistente, se redujo en un 50% con el uso de la proteína y en un 32,4 % en la muestra de bacteriófagos.

De igual manera, Jasim et al. (15) utilizaron la misma cepa bacteriana en su estudio, donde se realizó una comparación entre la capacidad lítica de la endolisina y un coctel de bacteriófagos aislados a partir de diferentes muestras ambientales. Después del análisis turbidimétrico se observó que la endolisina redujo de 0,585 a 0,031, la absorbancia de la muestra en tan solo la primera hora de tratamiento. Cabe resaltar, que todas estas proteínas fueron aisladas a partir de fagos, por lo que se estudió su actividad natural; además se les realizaron pruebas de caracterización y expresión morfológica (anexo 1).

3.2.3 Experimentos in vivo

En estos experimentos se buscó contrastar los resultados de cada uno de los tratamientos propuestos en un diseño experimental, basado en el uso de la endolisina, como agente lítico bacteriano en infecciones inducidas en animales. Por ello, se contó con un grupo

control, grupos tratados únicamente con la proteína y algunos investigadores realizaron experimentación con una variable adicional.

3.2.3.1. Ratones

Para el análisis de modelos in vivo de ratones letrado et al. (13), tomaron 3 grupos de estudio más su respectivo grupo control, cada uno con al menos cuatro ratones hembra infectados con *S. pneumoniae* multirresistente. En el primer grupo se aplicó únicamente Cefotaxima (CTX) para tratar la infección; en el segundo grupo de estudio solo se utilizó la proteína y en el tercer grupo se utilizó una combinación de endolisina + Cefotaxima. En los dos primeros grupos la tasa de supervivencia disminuyó significativamente, como lo podemos observar en la tabla 1. Por otro lado, el tercero presentó una respuesta positiva, pues el 100% de los organismos estudiados sobrevivieron a la enfermedad.

Wu et al (14) utilizaron 80 ratones hembra, divididos en 8 grupos de estudio que fueron inoculados con una dosis mínima letal de *A. baumannii* multirresistente. Se les aplicó 1ml de endolisina, 1ml de PBS o 1ml de solución con el bacteriófago aislado; cada grupo con un tratamiento distinto, sumándosele la aplicación de un coctel de fagos y la combinación del bacteriófago aislado junto con la endolisina.

La tasa de supervivencia más alta (70%) se presentó en aquellos grupos tratados con endolisina, independientemente de la presencia o ausencia del bacteriófago, el cual solo contó con el 60% de supervivencia en cada uno de los grupos

donde se utilizó exclusivamente contra la infección. Por último, fue el coctel de fagos quien obtuvo la tasa más baja, contando únicamente con el 50% de ratones vivos al final de proceso.

Finalmente, Jasim et al. (15) emplearon cuatro grupos de ratones macho de unas 4 o 5 semanas en su investigación con el fin de evaluar los efectos secundarios de los fagos, la virulencia de la bacteria y la eficacia de los bacteriófagos optimizados para tratar la infección. Así pues, se contó con un grupo control, un grupo al que solo se le inyectó la cepa de *A. baumannii* o grupo bacteriano, uno inyectado únicamente con fagos y el grupo de prueba al cual se inyectó con *A. baumannii* y posteriormente se le aplicó el tratamiento con bacteriófagos optimizados. Cabe resaltar, que estos investigadores no realizaron experimentos in vivo con la endolisina aislada, pues solamente se analizó el efecto del bacteriófago sobre la infección.

Luego de un riguroso monitoreo diario, se pudo observar que los ratones del grupo de prueba sobrevivieron más de 6 semanas en condiciones saludables sin ningún tipo de efecto secundario. Por el contrario, para el grupo bacteriano, cuatro horas de infección fueron suficientes para matar al 100% de ratones. Por último, el grupo con fagos no presentó diferencias significativas en la salud de los ratones durante el proceso, por lo que se concluye que no afectan de forma negativa al hospedero en ausencia de su blanco.

3.2.3.2. Peces Cebra

El pez cebra se ha convertido en un modelo de experimentación in vivo debido a su

alta respuesta entre las primeras 4 y 6 semanas de tratamiento para el análisis de agentes antimicrobianos. A pesar de estas ventajas, este modelo únicamente fue tomado por letrado et al. (13) siguiendo el mismo diseño experimental adoptado en las pruebas con ratones para comprobar el sinergismo entre las endolisinas y los antibióticos para tratar a *S. pneumoniae*.

Al igual que con el grupo anterior, los peces tratados únicamente con CTX o la endolisina aislada, presentaron niveles de protección bajos, correspondientes al 45% y 23% respectivamente; todos los individuos del grupo control murieron en las primeras 24 horas. Por otro lado, para el grupo de acción conjunta, la supervivencia fue absoluta y el recuento en sangre de bacterias disminuyó de 2.4×10^4 ufc/ ml a 20 UFC/ml ($p < 0.01$).

3.2. 4 Determinación de concentración inhibitoria mínima (MIC) y concentración bactericida mínima (MBC)

Para analizar la capacidad de inhibición que poseen las endolisinas sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MSSA) y *S. aureus* meticilsusceptible (MRSA) Knaack et al.(16) determinaron factores como la MIC y MBC. Adicionalmente, se comparó la actividad de la endolisina (HY-133), contra bacterias en fase estacionaria o exponencial de crecimiento en doce aislados. Se realizaron curvas de tiempo muerto con dos aislamientos representativos para investigar la farmacodinámica hasta 48 horas de incubación. Todos los experimentos se desarrollaron en comparación con la daptomicina y la mupirocina.

El MBC fue casi siempre igual al MIC y sin diferencias considerables entre MSSA y MRSA. Las curvas de muerte por tiempo, revelaron un efecto bactericida rápido de HY-133 en las primeras dos horas, similar a la daptomicina. Incluso con concentraciones bajas, la endolisina recombinante HY-133, fue altamente activa contra todos los aislamientos probados de MSSA y MRSA, incluidos los aislamientos resistentes a la mupirocina.

4. Discusión

El papel de la endolisina en las infecciones virales se ha convertido en objeto de interés para la investigación científica, pues según la base de datos Lens.org, para el año 2021 se publicaron 123 artículos referentes a esta proteína y su importancia frente a la problemática de la resistencia antibiótica. Una pandemia que amenaza a la medicina moderna, disminuyendo la eficacia de antibióticos de espectro reducido y aumentando el riesgo de muerte en pacientes con patologías leves (17).

Los resultados obtenidos permitieron comprobar la eficiencia de la endolisina frente a infecciones, tanto de bacterias Grampositivas como Gramnegativas, evaluando su espectro de acción con pruebas in vitro. Los estudios in vivo en animales demostraron una respuesta similar en ambos tipos de cepas, en donde el grupo de estudio tratado con la proteína tenía una tasa de supervivencia mayor, que aquellos que fueron expuestos a la bacteria sin el uso de esta; evidenciando que este tratamiento es un método rápido y seguro para combatir infecciones, y que de igual manera puede utilizarse en sinergismo

con antibióticos como la Cefotaxima, sin ningún efecto secundario aparente.

Esta inhibición bacteriana ocurre de manera natural en la última fase del ciclo lítico de una infección viral. Al carecer de una maquinaria para la replicación, los bacteriófagos inyectan su material genético en las bacterias y utilizan sus ribosomas para reproducirse (18). Cuando los viriones se encuentran ensamblados en el citosol de la bacteria, no pueden escapar de la célula por sí solos debido a la presencia y composición de la pared bacteriana, por lo que codifican dos tipos de proteínas líticas a partir de ADN propio (holinas y endolisinas) (19).

En primer lugar, las holinas forman poros en la membrana citoplasmática, a través de los cuales las endolisinas cruzan hacia la capa de peptidoglucano. Estas degradan la capa de mureína rompiendo los enlaces glucosídicos entre el N-Acetilglucosamida y el Acido N-Acilmurámico, provocando lisis celular por presión osmótica, lo que causa la liberación de los viriones para continuar la infección (20); dependiendo del tipo de bacteria y endolisina utilizada, existen diferentes sitios de acción por donde esta última puede romper los enlaces entre ciertos aminoácidos, provocando daño celular (18).

A pesar de que los mecanismos de acción de esta proteína cumplen con un patrón similar en todas las bacterias, *Oliveira et al.* (21) sugieren que su espectro de acción depende del bacteriófago del que fueron aisladas y de su especificidad al momento de unirse a receptores clave de la pared bacteriana, por lo que no todas las bacterias son compatibles con

un mismo tipo y varían en función de la composición de su pared. Estas pueden clasificarse en dos tipos: Espectro amplio y espectro reducido.

Como lo mencionan Dong *et al.* (22), el uso de endolisinas de espectro reducido es mucho más efectivo en tratamientos contra bacterias Grampositivas, debido a que el peptidoglucano de su pared celular se encuentra expuesto, haciendo más sencilla su unión con receptores como los ácidos lipoteicoicos (moléculas de señalización que guían a la proteína a los aminoácidos correspondientes para cumplir con su función). Por otra parte, las bacterias Gram negativas cuentan con una membrana externa, que impide el paso de gran variedad de endolisinas, por lo que hasta el momento es de gran dificultad encontrar alguna proteína que sirva para combatir este tipo de infecciones (23).

Sin embargo, recientemente se propuso el uso de EDTA (Ácido etilendiaminotetra acético) que actúa como los agentes quelantes, para desestabilizar la integridad de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas y permitir el paso de las endolisinas al espacio periplasmático, para alcanzar la capa de peptidoglucano, empleando los lipopolisacáridos como receptores (22,24). Los agentes quelantes son sustancias que promueven la formación de complejos con iones de metales pesados, con el fin de retirar iones de tejidos vivos, o introducirlos en el huésped con fines terapéuticos sin causar daño tóxico (25,26).

Por este motivo, solo las endolisinas de amplio espectro son compatibles con este tipo de bacterias; sin embargo,

se han identificado cepas que no desarrollan sensibilidad por los agentes permeabilizadores. De igual manera, no se conocen aún los posibles efectos adversos de la implementación de los agentes quelantes sobre las células del huésped (22).

A pesar de los beneficios de la endolisina, el tratamiento aún se encuentra en las primeras etapas de desarrollo, pues actualmente son pocos los experimentos que logran llegar a ensayos clínicos o pruebas in vivo (27). Una de las principales razones por la cual este método aún no ha sido aprobado es debido a que el origen proteico de las endolisinas induce una respuesta inmunitaria en los mamíferos, reduciendo su actividad en la célula huésped por cada aplicación. Por lo tanto, el desarrollo de anticuerpos neutralizantes es motivo de preocupación en caso del uso repetitivo en seres humanos (28).

Este tratamiento alternativo no solo ha sido investigado dentro del campo de la medicina, sino también en la agricultura y la industria alimentaria. Con el objetivo de fabricar productos biotecnológicos desarrollados a partir de estas proteínas; como los conservantes artificiales, los cuales combaten las enfermedades transmitidas por alimentos y los mantienen frescos y de buena calidad para el consumidor (21,29). Para la industria agrónoma, se busca que algunas plantas transgénicas produzcan endolisinas, para prevenir la colonización de bacterias fitopatógenas que puedan representar grandes pérdidas económicas a largo plazo (30).

Actualmente, la terapia con bacteriófagos se ha convertido en la alternativa de muchos para combatir infecciones mortales, sin embargo, es un tratamiento que solo es

legal en algunos países de Europa oriental, debido a que no se conoce el impacto a largo plazo en el organismo del huésped y las reacciones inmunológicas que pueden ocurrir durante las intervenciones, pues los fagos son reconocidos como agentes patógenos por el sistema inmune y podrían empeorar la infección en lugar de mejorarla (13).

Por esta razón, las endolisinas parecen ser la solución más viable, pues al ser proteínas pueden ser modificadas para que no sean reconocidas como invasoras, su tamaño es parecido a las pequeñas moléculas de antibióticos en contraste con los fagos, y proporcionarían una mejor especificidad a los tratamientos contra bacterias Grampositivas, que con las bacterias Gramnegativas (26).

5. Limitaciones

La principal limitación de esta revisión declarada por los autores, se presentó al momento de escoger las palabras clave para realizar las búsquedas en las bases de datos, pues en su momento no se encontró fácilmente el enfoque esperado. Para la revisión de literatura general se utilizaron operadores booleanos muy específicos y los resultados propuestos mostraron más artículos dentro de los criterios de inclusión acordados.

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta los artículos analizados, se podría concluir que las endolisinas son proteínas capaces de mejorar los tratamientos alternativos contra bacterias multirresistentes como *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter Baumannii*, *Staphylococcus aureus*, entre otras.

Estas proteínas, no tienen la capacidad de reemplazar en su totalidad a los antibióticos; sin embargo, pueden convertirse en un complemento para potenciar la inhibición bacteriana y evadir

mecanismos de resistencia que les permita alcanzar su molécula diana.

Las endolisinas podrían tener efectos secundarios a largo plazo, lo cual merece futuras investigaciones para su comprensión.

7. Referencias

1. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* 2020 Dec 3;21(12).
2. Vanegas-Múnera JM, Jiménez-Quiceno JN. Antimicrobial resistance in the 21st century: Towards a post-antibiotic era? Vol. 38, *Revista Facultad Nacional de Salud Publica.* Universidad de Antioquia; 2020.
3. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. Vol. 30, *Infectious Disease Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2016. p. 313–22.
4. García Apac C. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina Artículo de revisión. 2012.
5. Lai WCB, Chen X, Ho MKY, Xia J, Leung SSY. Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria. Vol. 589, *International Journal of Pharmaceutics.* Elsevier B.V.; 2020.
6. Heidary M, Khosravi AD, Khoshnood S, Nasiri MJ, Soleimani S, Goudarzi M. Daptomycin. Vol. 73, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Oxford University Press; 2018. p. 1–11.
7. Skiest DJ. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):655–6.
8. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates.* 2018 Sep 1;40:25–39.
9. Linden SB, Alreja AB, Nelson DC. Application of bacteriophage-derived endolysins to combat streptococcal disease: current State and perspectives. Vol. 68, *Current Opinion in Biotechnology.* Elsevier Ltd; 2021. p. 213–20.
10. Ongena V, Briegel A, Claessen D. Cell wall deficiency as an escape mechanism from phage infection. *Open Biol.* 2021 Sep 1;11(9).
11. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyzewski Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. Vol. 74, *Current Microbiology.* Springer New York LLC; 2017. p. 277–83.

12. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Vol. 13, Nature Reviews Microbiology. Nature Publishing Group; 2015. p. 42–51.
13. Letrado P, Corsini B, DÍez-Martínez R, Bustamante N, Yuste JE, García P. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiol.* 2018 Sep 1;13(11):1215–23.
14. Wu M, Hu K, Xie Y, Liu Y, Mu D, Guo H, et al. A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN).
15. Jasim HN, Hafidh RR, Abdulmir AS. Formation of therapeutic phage cocktail and endolysin to highly study multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*: In vitro and in vivo. *Iran J Basic Med Sci.* 2018 Nov 1;21(11):1100–8.
16. Knaack D, Idelevich EA, Schleimer N, Molinaro S, Kriegeskorte A, Peters G, et al. Bactericidal activity of bacteriophage endolysin HY-133 against *Staphylococcus aureus* in comparison to other antibiotics as determined by minimum bactericidal concentrations and time-kill analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019 Apr 1;93(4):362–8.
17. Coates ARM, Hu Y, Holt J, Yeh P. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020 Jan 2;18(1):5–15.
18. Fernández DG, Llamas LF, González AR, Suárez PG. Bacteriophages and endolysins in the food industry. *Arbor.* 2020;196(795):1–11.
19. Cahill J, Young R. Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. In: *Advances in Virus Research.* Academic Press Inc.; 2019. p. 33–70.
20. Marques AT, Tanoeiro L, Duarte A, Gonçalves L, Vítor JMB, Vale FF. Genomic analysis of prophages from *klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microorganisms.* 2021 Nov 1;9(11).
21. Oliveira H, Azeredo J, Lavigne R, Kluskens LD. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. Vol. 28, *Trends in Food Science and Technology.* 2012. p. 103–15.
22. Dong H, Zhu C, Chen J, Ye X, Huang YP. Antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* endolysin P28 against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2015;6(NOV).
23. Zampara A, Sørensen MCH, Grimon D, Antenucci F, Vitt AR, Bortolaia V, et al. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).

24. Briers Y, Lavigne R. Breaking barriers: Expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. Vol. 10, Future Microbiology. Future Medicine Ltd.; 2015. p. 377–90.
25. Méndez A. Quelantes [Internet]. La guía. 2014 [cited 2022 Jun 8]. Available from: <https://quimica.laguia2000.com/quimica-inorganica/quelantes>
26. Oliveira H, Thiagarajan V, Walmagh M, Sillankorva S, Lavigne R, Neves-Petersen MT, et al. A thermostable salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. PLoS One. 2014 Oct 7;9(10).
27. Joshi H, Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse Escherichia coli for the isolation of recombinant protein. Anal Biochem. 2017 Jul 1;528:1–6.
28. Vasina D v., Antonova NP, Grigoriev I v., Yakimakha VS, Lendel AM, Nikiforova MA, et al. Discovering the Potentials of Four Phage Endolysins to Combat Gram-Negative Infections. Front Microbiol. 2021 Oct 13;12.
29. Rehman S, Ali Z, Khan M, Bostan N, Naseem S. The dawn of phage therapy. Vol. 29, Reviews in Medical Virology. John Wiley and Sons Ltd; 2019.
30. Fernández DG, Llamas LF, González AR, Suárez PG. Bacteriophages and endolysins in the food industry. Arbor. 2020;196(795):1–11.

8. Anexos

Anexo 1. Tabla de resultados de cada artículo.

Referencia (Año)	Microorganismos analizados	Variables Investigadas	Resultados
(Letrado et al., 2018)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Efecto sinérgico de la endolisina y los antibióticos	FICI Cepa D39: AMX- 0,43; CTX- 0,50; LVX - 0,40; VAN - 0,31. FICI Cepa 48: AMX - 0,50; CTX - 0,50; LVX - 0,50; VAN - 0,50. FICI Cepa 450: AMX- 0,31; CTX- 0,62; LVX - 0,62; VAN - 0,75. FICI Cepa 3498: AMX- 0,91; CTX- 0,87; LVX - 0,75; VAN - 0,50.
		Análisis de tiempo-muerte	Cepa D39: AMX, - 5 log ufc/ml. CTX, -1 log ufc/ml. Cepa 48: AMX - 1log ufc/ml. CTX, - 2 log ufc/ml. Cepa 450: AMX, - 2 log ufc/ml. CTX, no significativo. Cepa 3498: AMX, no significativo. CTX, -2 log ufc/ml.
		Modelo de infección de ratón	Grupo CTX: 67% supervivencia. Grupo Cpl-711: 58% supervivencia. Grupo CTX-Cpl11: 100% supervivencia.
		Modelo de infección de pez cebra	Grupo CTX: 45% supervivencia (2,4 x10 ⁴ ufc/ml) Grupo Cpl-711: 23% supervivencia (2,5 x10 ⁴ ufc/ml). Grupo CTX-Cpl11: 100% supervivencia (20 ufc/ml).
(Wu et al., 2019)	<i>Acinetobacter baumannii</i> multiresistente	Efecto lítico y degradativo de Ply6A3.	Unidad de actividad: 2048 unidades/ml Reducción: 50% de turbidez. Halo en placa: 1 cm. Cepas MDRAB: 141 de 200 lisadas. Cepas PDR-AB: 21 de 41 lisadas.
		Modelo de infección de ratón	Grupo endolisinas: 70% supervivencia. Grupo bacteriófago: 60% supervivencia. Grupo coctel bacteriófagos: 50% supervivencia. Grupo bacteriófago + endolisina: 70% supervivencia
(Jasim et al., 2018)	<i>Acinetobacter baumannii</i> multiresistente	Actividad lítica de la endolisina	DO <i>A. Baumannii</i>: 0,585 a 0,031 tras 1 hora. Umbral de reducción: 1,4 log ufc/ml
		Fagoterapia in vivo	Grupo de prueba (Bacteria + tratamiento): 100% supervivencia Grupo bacteriano: Muerte 100% en 4 horas. Grupo solo fagos: 100% supervivencia sin efectos secundarios.

(Knaack et al., 2019)	<i>Staphylococcus aureus</i> . MRSSA y MRSA	Determinación de CIM y CBM de HY-133	<p>Cepas MSSA: MIC 50/90 = 0,25/0,5 mg/L, MBC 50/90 =32/>32 mg/L.</p> <p>Cepas MRSA: MIC 50/90 = 0,12/0,25 mg/L, MBC 50/90 =32/>32 mg/L.</p>
		Curvas tiempo-muerte	<p>HY-133 MIC 2 (0,5 mg/L),4 (1,0 mg/L): Muerte en 1 hora.</p> <p>HY-133 MIC 16 (4,0 mg/L): Muerte MRSA en 4 min y MSSA en 8 min.</p> <p>Daptomicina MIC 4 (2,0 mg/L): Muerte en 2 horas.</p> <p>Daptomicina MIC 16 (8,0 mg/L): Muerte en 1 hora.</p> <p>Mupirucin: No significado.</p>