Programa Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Implicación de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia a fagos

Tesis Doctoral

Lucas Mora Quilis

Directores

Pilar Domingo Calap

Rafael Sanjuán Verdeguer

Febrero 2026

Dra. **Pilar Domingo Calap**, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Universitat de València

Dr. **Rafael Sanjuán Verdeguer**, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universitat de València

CERTIFICAN: Que D. **Lucas Mora Quilis** ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo que lleva por título **"Implicación de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* en la resistencia a fagos"**, para optar al Grado de Doctor en Biomedicina y Biotecnología por la Universitat de València, y emiten su informe favorable para el depósito y la defensa de la Tesis Doctoral.

20 de febrero de 2026

Esta tesis se ha desarrollado en el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio, centro mixto CSIC-UV) gracias a un contrato predoctoral **FPU19/04611** financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIN). La investigación ha sido financiada por los proyectos **PID2020-112835RA-I00** y **PID2023-150309OB-I00**, otorgados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033; el proyecto **SEJIGENT/2021/014** de la Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital (Generalitat Valenciana) otorgado a P. D-C.; y los proyectos del European Research Council (ERC) **724519 – Vis-a-Vis** y **101019724 – EVADER**, otorgados a R.S.

Índice

Índice 7
Agradecimientos 13
Resumen 17
Abstract 20
Abreviaturas 23
Publicaciones 27
Introducción 29
1. *Klebsiella pneumoniae*: biología, ecología y diversidad 31
1.1 La cápsula de *Klebsiella* 32
2. Bacteriófagos: los virus de *Klebsiella* 37
2.1 La cápsula como receptor y como barrera para los fagos 38
2.2 Estructura y función de las depolimerasas 39
3. Resistencia a fagos mediada por pérdida de cápsula: un compromiso evolutivo 41
4. Dinámica coevolutiva fago-bacteria 44
Objetivos 47
Metodología 51
1. Cultivo y caracterización bacteriana 53
1.1 Bacteria y condiciones de cultivo 53
1.2 Tinción y visualización de cápsula al microscopio 53
1.3 Cuantificación de cápsula mediante el método del ácido urónico 53
2. Aislamiento y caracterización de fagos 54
2.1 Aislamiento de fagos a partir de muestras de aguas residuales 54
2.2 Titulación de fago mediante recuento de UFP 55

2.3. Microscopía electrónica de transmisión 55
3. Ensayos de infectividad y resistencia 56
3.1 Ensayos de infectividad 56
3.1.1 Capacidad replicativa del fago..... 56
3.1.2 Técnica del *spot* 56
3.1.3 Curvas de crecimiento bacteriano e infección 57
3.2. Estudio de la resistencia a fagos..... 57
3.2.1 Selección y aislamiento de cultivos resistentes a Cap62..... 57
3.2.2 Evaluación cuantitativa de la resistencia 58
3.3 Análisis de susceptibilidad a nivel de célula única mediante citometría de flujo 59
3.4 Ensayo con medio condicionado 60
4. Ensayos de evolución experimental 61
4.1 Coevolución fago-bacteria..... 61
4.2 Aislamiento y purificación de fagos evolucionados 62
5. Análisis genómico, transcriptómico y funcional..... 62
5.1 Extracción de ADN, secuenciación y análisis genómico de fagos... 62
5.2 Modelización estructural y visualización de proteínas estructurales de fagos 63
5.3 Extracción de ADN, secuenciación y análisis genómico bacteriano64
5.4 Extracción de ARN, secuenciación y análisis transcriptómico bacteriano 65
Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de cultivos de *K. pneumoniae* resistentes a un fago específico del tipo capsular K1 67
1. Aislamiento y caracterización del fago Cap62..... 69
1.1 Aislamiento del fago Cap62 a partir de muestras de aguas residuales 69
1.2 Caracterización morfológica y genómica de Cap62 70
1.3 Caracterización de las propiedades infectivas de Cap62 72

2. Selección y caracterización fenotípica de cultivos bacterianos resistentes a Cap62 73

2.1 Perfil de resistencia de los clones seleccionados frente a Cap62 .. 73

2.2 La presencia de Cap62 como determinante de la resistencia total 74

2.3 Selección de cultivos candidatos y caracterización fenotípica..... 75

2.4 Implicación de moléculas de señalización en la pérdida de cápsula 79

3. Caracterización molecular de los cultivos resistentes a Cap62..... 80

3.1 Secuenciación y análisis genómico..... 80

3.1.1 Análisis de frecuencias alélicas en el cultivo RP 82

3.1.2 Mutación en *rfaH* en CL13..... 83

3.2 Análisis transcriptómico de los cultivos 85

3.2.1 Análisis de expresión diferencial..... 86

3.2.2 Análisis de expresión génica en el clúster biosintético de la cápsula y genes relacionados 91

3.2.3 Análisis de expresión génica en el clúster biosintético del antígeno O del LPS..... 94

3.2.4 Análisis de expresión génica de otros clústers de genes con cambios de expresión..... 96

Capítulo 2. Diseño y caracterización de combinaciones de fagos para el control de la resistencia en *K. pneumoniae* 99

1. Aislamiento de fagos contra cultivos resistentes a Cap62 101

2. Caracterización genómica y taxonómica de los nuevos fagos 103

3. Propiedades infectivas de los nuevos fagos frente a cultivos resistentes a Cap62..... 105

3.1 Ensayos de rango de hospedador 105

3.2 Capacidad para retrasar la aparición de las resistencias..... 106

4. Análisis del efecto complementario del cóctel de fagos mediante ensayos de célula única por citometría de flujo..... 109

4.1 Diseño y desarrollo de la técnica 109

4.2 Susceptibilidad de células individuales frente a los fagos Cap62 y CuaHET1 113

4.3 Ensayos de recuperación de cápsula mediante experimentos de célula única 115

Capítulo 3. Estudio de la dinámica coevolutiva entre *K. pneumoniae* y una combinación de fagos 119

1. Coevolución del sistema fago - bacteria 121

1.1 Diseño experimental de la coevolución 121

1.2 Dinámica de fago y bacteria durante la coevolución 122

2. Evolución de fago 123

2.1 Efecto de los fagos evolucionados en el retraso de la aparición de resistencias 123

2.1.1 Evaluación de las poblaciones evolucionadas de fagos 123

2.1.2 Selección y evaluación de fagos aislados a partir de las poblaciones evolucionadas 125

2.1.3 Contribución relativa de cada fago al retraso de la resistencia 127

2.2 Análisis genómico y estructural de los fagos evolucionados 129

3. Evolución bacteriana 131

3.1 Caracterización fenotípica de la adaptación 131

3.2 Análisis genómico de la bacteria evolucionada 132

Discusión 135

Resistencia fenotípica y reversibilidad: nuevos retos y estrategias metodológicas 137

Resistencia mediada por receptores: más allá de la mutación 140

Bases moleculares de la resistencia: desregulación de cápsula y estrés metabólico 144

Dinámica coevolutiva: jerarquía de defensas y coste evolutivo 147

Implicaciones terapéuticas de las combinaciones de fagos: diseño de cócteles para la supresión de la resistencia 151

Perspectivas futuras 155

Conclusiones 159

Bibliografía 163

Anexo 189

Agradecimientos

Uno siempre se imagina ese momento en el que se sienta a escribir estas líneas, sin embargo, ahora que estoy escribiéndolas, es cuando menos sé qué decir; tantos recuerdos, tantas emociones… Estas líneas no son únicamente el culmen de un proyecto de investigación, sino de una etapa en la vida. Una etapa de seis largos años, que ha ido acompañada de personas y experiencias maravillosas, pero también, de momentos duros, de mucho sacrificio.

Hacer un doctorado no es una tarea fácil, y por desgracia, aunque romántico, requiere de mucha vocación. Sin embargo, el término *vocación* es un término demasiado genérico, que no hace justicia a todas las aptitudes y cualidades que se necesitan para realizar una tesis, y que determinan el espíritu y carácter de un estudiante de doctorado. Por ello, en primer lugar, esta tesis se la quiero dedicar a cuatro conceptos que me han acompañado durante distintas etapas de la tesis, y sin los cuales, no habría llegado hasta aquí. **A la *ilusión*:** A la ilusión de hacer ciencia. De conocer mejor lo que nos rodea. De hacerse preguntas, y de responderlas. **A la *serendipia*:** Porque como en esta tesis, los hallazgos más sorprendentes son aquellos que no vamos buscando. **Al *empeño*:** Porque sin determinación ni tenacidad nada de esto se hubiera conseguido. **A la *resiliencia*:** Porque ante las vicisitudes que nos encontramos en el camino, solo queda levantarse y seguir hacia delante.

Y como no, estos cuatro conceptos o cualidades solo son reflejo de todo lo que he aprendido de la gente que me rodea. Por ello, no puedo empezar sino agradeciendo a mi padre y a mi madre, a los que debo absolutamente todo en esta vida, incluso la vida misma. De ellos aprendí el amor por el campo y la naturaleza. Ellos fueron los artífices de que desde pequeño tuviese un microscopio y un maletín de investigador, con auténticos tubos de ensayo y probetas. Ellos me enseñaron a mirar la vida con curiosidad, a cuestionar las cosas, y a dar lo mejor de mí en cualquier situación. Ambos son mi ejemplo de valentía y resiliencia. Y gracias a todo su esfuerzo, a pesar de las piedras que nos pone la vida, nunca me ha faltado de nada, y he podido dedicarme enteramente a mis estudios; lo que me ha traído hasta aquí. A mi hermana Carla, por haber compartido todas estas vivencias conmigo. Por haber aguantado todas mis tonterías de hermano mayor. Y pese a todo, haber mantenido tu rumbo y personalidad; no es fácil diferenciarse y brillar con luz propia. Me siento muy orgulloso de ti. A todas mis tías y tíos, primos y primas, que han seguido mi carrera siempre de cerca, con interés y admiración. Pero sobre todo a mi prima Carme y a Fabián, mis grandes referentes en lo académico. Gracias por haberme motivado a perseguir mi sueño universitario, a matricularme no en una, sino en dos carreras, por haberme enseñado a pelear con las secretarías, la administración y la burocracia, y a dar toda la guerra que sea necesaria para conseguir lo que queramos. Quizás ahora sea un buen momento para recordar algunas de las lecciones que aprendí de vosotros, y seguir dando guerra. A todos mis amigos y amigas, y a todas aquellas personas que me han preguntado incansablemente por “cómo va la tesis”. Y, por supuesto, a Lisa, porque desde el día en que nuestras vidas se

cruzaron en los aularios de la universidad has estado siempre a mi lado. Gracias por haberme aguantado en los buenos y en los malos momentos de esta tesis, con las frustraciones y los cabreos, y con las alegrías y los logros. Esta tesis, también la firmas tú.

Quiero también agradecer a todas las personas que han compartido conmigo todos estos momentos en el laboratorio, que me vieron empezar como estudiante de grado, y que me ven irme como doctor. Para facilitarme la tarea, seguiré un orden relativamente cronológico (y que me disculpen, si me olvido de alguien, no es por menos importante): Gracias a Rafa por darme la primera oportunidad como estudiante de TFG, y abrirme las puertas para hacer la tesis en su laboratorio. Gracias a Pilar por enseñarme el mundo de los fagos, amadrinarme en los últimos años de la tesis, y apostar en todo momento por mí. A María Durán, por hacer de "mamá pato" y enseñarme literalmente a pipetear durante mis primeros días de laboratorio. A mis incondicionales María y Alejandra, que me acogieron como uno más en el laboratorio; gracias por vuestros consejos, chismes y las meriendas hasta las tantas de la tarde, cuando ya no quedaba nadie en el labo; no os imagináis lo importante que sois para mí. Gracias a Flo y Víctor por los consejos más "des-" que "-movitacionales"; ahora os entiendo chicos. A Carlos y Chantal, por las tardes de plaqueo escuchando AC/DC en el P2 (todavía puedo escuchar vuestra inconfundible risa, que se hacía escuchar ya desde la presala). A Ernesto, Juanvi, y por supuesto a Iván, por vuestra eterna sabiduría. A José Cuevas, por su enorme bondad y buenrollismo. A Bea, por todo lo que me has enseñado de fagos, y sobre todo por tu ejemplo de constancia, lucha y superación. A mi querido hermanito Robby, porque has pasado por lo mismo que yo, y

has demostrado todo lo que vales. A Amanda, por ser mi eterna y más fiel compañera; para mí siempre estarás sentada a mi lado. Junto a Amanda, a Mireia, Celia y Marco; lo que empezó siendo un grupo para preparar medios acabó siendo una amistad que estoy seguro de que va a durar para toda la vida. Gracias por haberme acompañado en los momentos más duros de la tesis, pero sobre todo por todos los momentos que hemos disfrutado juntos, tanto dentro, como fuera del laboratorio. Y a Raquel y Jorge, que sin preparar medios, sois parte del equipo en todo lo demás. A Valdi, Jaime, Jeremy, Rodri, Marc, Miranda, Tamara y toda la gente que ha hecho mi estancia tan agradable los últimos meses en el laboratorio, y que forman parte también de esta historia que termina hoy. Me llevo el mejor de los recuerdos.

Simplemente, gracias de corazón.

Resumen

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista con un elevado potencial de virulencia. Su cápsula polisacarídica es una estructura crítica para la supervivencia y el principal determinante de la virulencia, actuando a su vez como receptor primario para la mayoría de los bacteriófagos (fagos) caracterizados. La evasión de la infección por fagos se produce mayoritariamente mediante la modificación de estos receptores de superficie. En el caso de la cápsula, esta resistencia se ha atribuido clásicamente a mutaciones estables en genes biosintéticos, generando variantes acapsulares. Sin embargo, esto puede conllevar un elevado coste biológico que comprometa irreversiblemente la supervivencia de la bacteria. Este compromiso evolutivo plantea la incógnita de si *K. pneumoniae* podría explotar la plasticidad fenotípica para resistir transitoriamente la infección sin comprometerse de forma permanente.

Los objetivos de la presente tesis son caracterizar fenotípica y molecularmente los mecanismos de resistencia de *K. pneumoniae* frente a un fago específico de tipo capsular, diseñar combinaciones de fagos para el control de la resistencia, y explorar la dinámica coevolutiva a largo plazo que se establece entre el patógeno y un cóctel de fagos.

Para abordar estos objetivos, el estudio partió del aislamiento y caracterización del fago Cap62, específico para el serotipo K1. Mediante ensayos de infectividad y microscopía, se demostró que la presión selectiva del fago favorece inicialmente la aparición de una población acapsular. Sin embargo, el análisis de variantes individuales reveló una alta heterogeneidad en los perfiles de susceptibilidad. Mientras la

mayoría de clones (como CL4) recuperaron la expresión de la cápsula mostrando resistencia parcial, una minoría (como CL13) exhibió una pérdida estable de la cápsula y resistencia total. El análisis de la población resistente total no clonal (RP) mostró que esta presentaba el mayor nivel de resistencia, asociado a un fenotipo acapsular. El análisis genómico reveló bases moleculares divergentes: la resistencia estable en CL13 está determinada por una deleción en el regulador *rfaH*, mientras ni la población RP ni CL4 contenían mutaciones consistentes, confirmando un mecanismo de resistencia fenotípica reversible. El análisis transcriptómico demostró que esta resistencia transitoria se asocia a una profunda reprogramación celular con marcada infraexpresión del clúster biosintético capsular (*cps*). A diferencia de CL4, la población RP evidenció adicionalmente una drástica desregulación del metabolismo energético (como el operón *glpABC*), sugiriendo un estado fisiológico de ahorro energético que limita la síntesis de estructuras costosas y consolida dicho fenotipo.

Para hacer frente a estas variantes, los cultivos resistentes se emplearon como plataforma para el aislamiento diferencial de nuevos fagos. Mantener la población RP bajo presencia continua de Cap62 permitió aislar fagos capaces de infectar a las resistentes transitorias en fase acapsular. La evaluación de estas combinaciones reveló que la unión de Cap62 con fagos aislados en la población RP (como CuaHET1) lograba el retraso más pronunciado de las resistencias. Mediante citometría de flujo con separación de células individuales, se evidenció que las variantes capsulares y acapsulares presentan perfiles de susceptibilidad inversos frente a ambos fagos, basando la eficacia de la combinación en la complementariedad de los rangos de hospedador. Además, se demostró que la presencia de Cap62 es necesaria para

forzar y estabilizar el fenotipo acapsular, bloqueando su reversión. Esta acción de Cap62 garantiza la infección efectiva por CuaHET1 y el mayor retraso en la emergencia de resistencias.

La evaluación de la dinámica coevolutiva a largo plazo demostró que la coevolución experimental incrementó significativamente la eficacia del cóctel. Esta mejora estuvo impulsada por la adaptación de CuaHET1, que acumuló mutaciones en sus proteínas de unión al receptor para optimizar su infectividad sobre el fenotipo acapsular predominante. La adaptación bacteriana reveló una clara jerarquía de defensas gobernada por el coste biológico. Mientras la exposición individual permite a la población sobrevivir mediante modulación transitoria de la cápsula, la presión selectiva simultánea de ambos fagos hace insuficiente esta estrategia. Ante este escenario, la bacteria se ve forzada a abandonar la plasticidad fenotípica y adquirir mutaciones estables en genes esenciales de la biosíntesis del lipopolisacárido, y que podría actuar como receptor del fago CuaHET1. La sinergia evolutiva del cóctel prolonga la supresión bacteriana y restringe las vías de escape, obligando al patógeno a asumir el elevado coste de la resistencia genética cuando la regulación fenotípica resulta ineficaz.

En conclusión, esta tesis demuestra que *K. pneumoniae* emplea la plasticidad fenotípica como primera línea de defensa reversible frente a fagos, desafiando el paradigma clásico de la resistencia estrictamente mutacional. A nivel clínico, estos resultados sugieren que la rápida reversibilidad de este fenotipo podría comprometer la viabilidad de la fagoterapia secuencial, planteando la necesidad de evaluar en futuros estudios *in vivo* la eficacia de administrar fagos de manera simultánea.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen with a high virulence potential. Its polysaccharide capsule (CPS) is a critical structure for survival and the main virulence determinant, acting in turn as the primary receptor for most characterized bacteriophages (phages). Evasion of phage infection occurs predominantly through the modification of these surface receptors. In the case of the capsule, this resistance has been classically attributed to stable mutations in biosynthetic genes, generating acapsular variants. However, this can entail a high biological cost that irreversibly compromises the survival of the bacterium. This evolutionary trade-off raises the question of whether *K. pneumoniae* could exploit phenotypic plasticity to transiently resist infection without permanently compromising itself.

The objectives of this thesis are to phenotypically and molecularly characterize the resistance mechanisms of *K. pneumoniae* against a capsule-specific phage, to design phage combinations for resistance control, and to explore the long-term coevolutionary dynamics established between the pathogen and a phage cocktail.

To address these objectives, the study began with the isolation and characterization of phage Cap62, specific to the K1 serotype. Through infectivity assays and microscopy, it was demonstrated that the selective pressure of the phage initially favors the emergence of an acapsular population. However, the analysis of individual variants revealed a high heterogeneity in susceptibility profiles. While the majority of clones (such as CL4) recovered capsule expression, showing partial resistance to Cap62, a minority (such as CL13)

exhibited a stable loss of the capsule and total phage resistance. The analysis of the total non-clonal resistant population (RP) showed that it presented the highest level of resistance, associated with an acapsular phenotype. Genomic analysis revealed divergent molecular bases: stable resistance in CL13 is determined by a deletion in the *rfaH* transcriptional regulator, whereas neither the RP population nor CL4 contained consistent mutations, confirming a reversible phenotypic resistance mechanism. Transcriptomic analysis demonstrated that this transient resistance is associated with a deep cellular reprogramming with a marked underexpression of the capsular biosynthetic cluster (*cps*). Unlike CL4, the RP population additionally evidenced a drastic dysregulation of energy metabolism (such as the *glpABC* operon), suggesting a physiological state of energy conservation that limits the synthesis of costly structures and consolidates this phenotype.

To counter these variants, resistant cultures were used as a platform for the differential isolation of new phages. Maintaining the RP population under the continuous presence of Cap62 allowed the isolation of phages capable of infecting the transient resistant variants in the acapsular phase. The evaluation of these combinations revealed that joining Cap62 with phages isolated in the RP population (such as CuaHET1) achieved the most pronounced delay in resistance. Using flow cytometry with single-cell sorting, it was evidenced that capsular and acapsular variants present inverse susceptibility profiles to both phages, basing the efficacy of the combination on the complementarity of their host ranges. Furthermore, it was demonstrated that the presence of Cap62 is necessary to force and stabilize the acapsular phenotype, blocking its reversion. This action of Cap62 guarantees

effective infection by CuaHET1 and the greatest delay in the emergence of resistance.

The evaluation of the long-term coevolutionary dynamics demonstrated that experimental coevolution significantly increased the efficacy of the cocktail. This improvement was driven by the adaptation of CuaHET1, which accumulated mutations in its receptor-binding proteins to optimize its infectivity on the predominant acapsular phenotype. Bacterial adaptation revealed a clear hierarchy of defenses governed by biological cost. While individual exposure allows the population to survive through transient modulation of the capsule, the simultaneous selective pressure of both phages renders this strategy insufficient. Faced with this scenario, the bacterium is forced to abandon phenotypic plasticity and acquire stable mutations in essential genes for lipopolysaccharide biosynthesis, which could act as a receptor for phage CuaHET1. The evolutionary synergy of the cocktail prolongs bacterial suppression and restricts escape routes, forcing the pathogen to assume the high evolutionary cost of genetic resistance when phenotypic regulation proves ineffective.

In conclusion, this thesis demonstrates that *K. pneumoniae* employs phenotypic plasticity as a reversible first line of defense against phages, challenging the classic paradigm of strictly mutational resistance. At the clinical level, these results suggest that the rapid reversibility of this phenotype could compromise the viability of sequential phage therapy, raising the need to evaluate the efficacy of simultaneous phage administration in future *in vivo* studies.

Abreviaturas

Abi	Infección abortiva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Frecuencia alélica
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
ARNnc	ARN no codificante
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BLASTn	BLAST de nucleótidos
BLASTp	BLAST de proteínas
Cas	Proteínas asociadas a CRISPR
CDS	Secuencia codificante
CL	Clon resistente a fago
COG	Clúster de Genes Ortólogos
CPS	Cápsula polisacarídica
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CRP	Proteína receptora de AMPc
SEM	Error estándar de la media
FDR	Tasa de descubrimiento falso

ICTV	*International Committee on Taxonomy of Viruses*
IS	Secuencia de inserción (del inglés *Insertion sequence*)
K-	Tipo capsular (serotipo) de *K. pneumoniae*
KL-	Tipo capsular asociado al locus (genotipo)
KPC	Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*
LB	*Lysogeny Broth*
LPS	Lipopolisacárido
Log_2FC	*Log2 Fold Change*
MOI	Multiplicidad de infección
NDM	Metalobetalactamasa tipo Nueva Delhi
O	Antígeno O del LPS
OD	Densidad óptica (del inglés *Optical Density*)
OMP	Proteína de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXA-48	Carbapenemasa Oxacilina-hidrolasa 48
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	*Protein Data Bank*
pLDDT	*Predicted Local-Difference Distance Test*
RBP	Proteína de unión al receptor
RDI	Índice de Retraso de Resistencias
R-M	Restricción-Modificación
RP	Población resistente
SIE	Exclusión de la superinfección

SNP	Polimorfismos de nucleótido único
SNV	Variantes de nucleótido único
spp.	Especies
SSC-A	*Side Scatter Area*
SSC-H	*Side Scatter Height*
ST	Tipo de secuencia (del inglés, *Sequence Type*)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFP	Unidades formadoras de placas
VST	Transformación estabilizadora de la varianza
WT	Cepa salvaje (del inglés, *Wild Type*)

Publicaciones

Artículos elaborados a partir de los datos y resultados obtenidos en esta tesis:

1. Mora-Quilis, L., Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2025). Reversible phenotypic resistance to phage infection via capsule downregulation in Klebsiella pneumoniae. *Iscience*, *28*(12). https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.114107

2. Mora-Quilis, L., Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2025). Phenotypic Heterogeneity Shapes Phage Resistance and Cocktail Efficacy in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, e02261-25. https://doi.org/10.1128/spectrum.02261-25

3. Mora-Quilis, L., & Domingo-Calap, P. (2025). Single-Cell Sorting to Assess Phage Sensitivity in Heterogeneous Bacterial Populations. En *Single-Cell Omics in Microbiome Research: Exploring Microbial Diversity Across Ecosystems* (pp. 125-135). Cham: Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-032-07527-7_8

4. Mora-Quilis, L., & Domingo-Calap, P. (2025). Coevolution of a phage cocktail constrains reversible phenotypic resistance in *K. pneumoniae*. *bioRxiv*, 2025-12. https://doi.org/10.64898/2025.12.19.695413

Introducción

1. *Klebsiella pneumoniae*: biología, ecología y diversidad

Klebsiella pneumoniae es un bacilo gramnegativo, con cápsula y anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria ubicua, presente en ecosistemas terrestres, acuáticos y artificiales, y asociada tanto a vegetación como a animales. En el ser humano, actúa como un comensal habitual de la microbiota del tracto gastrointestinal y nasofaríngeo. Sin embargo, puede comportarse como un patógeno oportunista con un elevado potencial de virulencia [1].

K. pneumoniae está incluida en la lista de patógenos prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2,3], siendo uno de los principales agentes infecciosos asociados a la atención sanitaria, implicado en infecciones del tracto urinario, neumonía nosocomial, infecciones quirúrgicas, bacteremias y sepsis [1,2]. La gravedad de estas infecciones se ve incrementada por la emergencia de clones de alto riesgo, como ST258, ST11, o ST147, que combinan una elevada virulencia con resistencia a múltiples fármacos antibióticos [4]. La diseminación global de cepas productoras de carbapenemasas, como KPC, NDM y OXA-48, ha limitado drásticamente las opciones terapéuticas, obligando al uso de antibióticos de último recurso con perfiles de toxicidad elevados, como la colistina, frente a los cuales también ha comenzado a desarrollar resistencia [5–7].

1.1 La cápsula de *Klebsiella*

La patogenicidad de *K. pneumoniae* no se basa únicamente en su capacidad para resistir a los antibióticos, sino que también se sustenta por un sofisticado arsenal de factores de virulencia que facilitan la colonización, la invasión tisular y la evasión del sistema inmune. Los sideróforos permiten secuestrar el hierro esencial para el metabolismo bacteriano; las fimbrias (o pili), implicadas en la adherencia a las células epiteliales de la vejiga o tracto respiratorio, así como a catéteres, facilitando la formación de biofilms; las bombas de eflujo, que confieren resistencia a antimicrobianos; y el lipopolisacárido (LPS), que actúa como endotoxina y protege frente al sistema del complemento. No obstante, de entre todos ellos, la cápsula (CPS) es, sin duda, la estructura más crítica para la supervivencia de la bacteria, jugando un papel fundamental en la interacción con el entorno, el sistema inmune, y sus parásitos [8].

La cápsula es una capa polisacarídica extracelular formada por unidades repetitivas de oligosacáridos. Estas unidades suelen constar de cuatro a seis monosacáridos, que incluyen azúcares comunes como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa y fucosa, combinados frecuentemente con ácidos urónicos (ácido glucurónico o ácido galacturónico) o ácido pirúvico. La presencia de estos ácidos confiere una carga negativa neta a la superficie bacteriana. Además, el piruvato, los grupos O-acetilo y formilo contribuyen a la enorme diversidad de cápsulas en el género *Klebsiella* spp. [9,10].

La biosíntesis de CPS en *Klebsiella* es un proceso altamente regulado y energéticamente costoso, que sigue la vía dependiente de Wzx/Wzy. Esta ruta está codificada por el clúster genético *cps*,

ubicado en el cromosoma bacteriano, y con un tamaño que oscila generalmente entre 10 – 30 kb [9–11]. El clúster *cps* se puede dividir en tres unidades transcripcionales [10] (**Figura I.1.A** y **B**):

- **Primera unidad transcripcional:** Se trata de una región conservada, que codifica típicamente para dos genes.
    - ***galF*:** Involucrado en el metabolismo de precursores de azúcares (UDP-glucosa).
    - ***PAP2*:** Fosfatasas integrales de membrana de la familia PAP2. Se desconoce su papel exacto en el contexto de la biosíntesis de polisacáridos bacterianos, pero se postula que puedan desempeñar un papel crucial en el reciclaje del portador lipídico de las unidades de azúcares a través de la membrana para la polimerización capsular.
- **Segunda unidad transcripcional:** Contiene genes esenciales para el procesamiento y transporte del polímero capsular. Algunos de estos genes están altamente conservados, mientras que otros suponen la región variable del clúster biosintético del CPS, que proporciona la elevada diversidad genética y fenotípica de la cápsula.

  Región conservada:
    - ***wzi*:** Codifica una proteína de membrana externa que es crucial para el anclaje de la cápsula a la superficie celular. Es uno de los genes más conservados y se utiliza como marcador para la tipificación molecular (tipificación por *wzi*).

- ***wza*:** Codifica una lipoproteína que forma un poro en la membrana externa, que permite la exportación del polisacárido al medio extracelular.

- ***wzb*:** Una fosfatasa que defosforila a Wzc.

- ***wzc*:** Codifica una tirosina quinasa autofosforilable de la membrana interna, que regula el proceso de polimerización y translocación, controlando la longitud de la cadena de polisacáridos.

- ***gnd*:** Gen conservado, que codifica la gluconato-6-fosfato deshidrogenasa, y localizado al final de la segunda unidad transcripcional, tras la región variable.

Región variable:

- **Glicosiltransferasas:** En esta región encontramos distintas glicosiltransferasas que transfieren azúcares específicos desde nucleótidos-azúcar al lípido portador. La glicosiltransferasa inicial (generalmente codificada por *wcaJ* o *wbaP*) cataliza el primer paso, uniendo el primer azúcar al lípido undecaprenil-fosfato en la cara citoplasmática de la membrana interna.

- **Enzimas modificadoras de azúcares:** También podemos encontrar diversas acetiltransferasas, polimerasas de piruvato etc.

- ***wzx*:** Se trata de una flipasa; proteína de membrana responsable de translocar la unidad repetitiva del

oligosacárido unida al lípido desde el citoplasma al periplasma.

- ***wzy*:** Enzima que polimeriza las unidades repetitivas en el periplasma para formar la cadena larga del polisacárido antes de su exportación.

- **Tercera unidad transcripcional:** Contiene genes involucrados en el metabolismo central de azúcares como el gen conservado ***ugd*** (que codifica para UDP-glucosa deshidrogenasa). Pero también, dependiendo del tipo capsular, esta región puede albergar genes específicos para la síntesis de manosa, como ***manC*** y ***manB***, o ramnosa (***rmlBADC***).

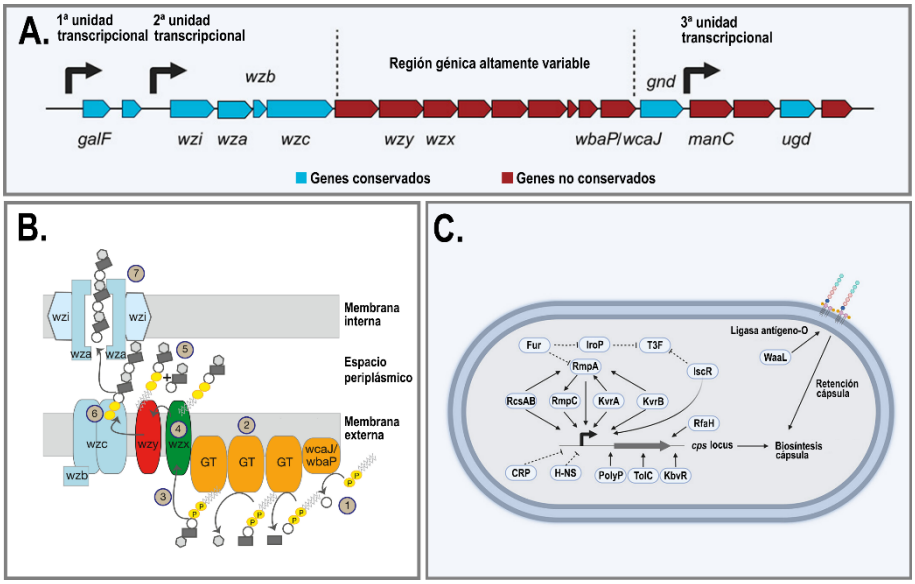


Figura I.1. Organización genética y mecanismo de biosíntesis del polisacárido capsular. A. Estructura del clúster genético cps, mostrando la división en tres unidades transcripcionales y los genes principales. **B.** Esquema de la maquinaria de biosíntesis y exportación (ruta Wzx/Wzy),

detallando las proteínas implicadas y la secuencia de pasos del proceso (1-7). **C.** Red de regulación de la cápsula. Las líneas continuas señalan a los reguladores que actúan directamente sobre el locus cps, mientras que las líneas discontinuas representan mecanismos de regulación indirecta. Las puntas de flecha indican una regulación positiva (activación), mientras que las líneas terminadas en barra plana denotan regulación negativa o inhibición de la transcripción. Figura adaptada de [10,11].

A esta elevada variabilidad en los genes estructurales se suma una compleja red de regulación transcripcional. La bacteria dispone de numerosos factores que controlan la expresión del clúster *cps* de manera directa o indirecta. Entre ellos destacan reguladores globales como CRP (mediado por los niveles de AMPc) o IscR, el sistema de dos componentes Rcs (específicamente RcsA y RcsB), factores propios de *Klebsiella* como KvrA y KvrB, y reguladores de la elongación transcripcional como RfaH [10] (**Figura I.1.C**).

La importancia de la cápsula para la supervivencia bacteriana y como principal determinante de virulencia hace que la presión de selección actúe fuertemente sobre el clúster *cps*. Esta región génica es un punto caliente de diversidad genética. Históricamente, mediante serología tradicional, se definieron alrededor de 77 serotipos capsulares (tipos K) [12–14]. Sin embargo, los grandes avances en el campo de la genómica han permitido el análisis *in silico* de la región *cps*, y la identificación de más de 180 tipos capsulares distintos asociados al locus capsular (tipos KL) [14–16]. Además, la presencia de regiones conservadas flanqueantes en bloques de genes como *wzi-wzc* facilita eventos de recombinación entre diferentes cepas. Esto promueve el “intercambio de cápsula” (*capsule swap*), mediante el cual, una cepa puede adquirir un bloque central variable

completamente nuevo de otra cepa mediante transferencia horizontal de genes, cambiando radicalmente su serotipo [17–19]. Todo esto hace de la cápsula un antígeno y elemento de virulencia altamente diverso que confiere a la bacteria una extraordinaria capacidad de adaptación a las distintas presiones de selección impuestas por el entorno.

2. Bacteriófagos: los virus de *Klebsiella*

Los bacteriófagos (fagos) constituyen la entidad biológica más abundante del planeta, con estimaciones que sitúan el número total de fagos en 10^{31} partículas. A pesar de su tamaño nanométrico, su gran abundancia hace que su contribución a la biomasa global sea muy considerable [20,21]. Son entidades presentes en todos los ecosistemas, desde ambientes acuáticos y terrestres, hasta entornos extremos [22–24]. Debido a ello, juegan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrógeno y fósforo), regulan la estructura de las comunidades microbianas mediante la lisis de sus hospedadores, evitando el monopolio de nichos ecológicos [25,26]. Asimismo, muestran una elevada diversidad genómica (ADN o ARN, mono o bicatenario), y una elevada diversidad morfológica. Se clasifican generalmente en fagos sin cola y fagos con cola. Estos últimos, agrupados en la clase *Caudoviricetes*, representan la fracción mayoritaria y más compleja. Dentro de este grupo destacan tres morfologías principales: miovirus (cola larga y contráctil), sifovirus (cola larga no contráctil), y podovirus (cola larga y no contráctil) [27–29].

2.1 La cápsula como receptor y como barrera para los fagos

Para iniciar la infección, los fagos dependen estrictamente de la adsorción física a estructuras específicas expuestas en la envoltura bacteriana, tales como proteínas de membrana externa (OMP) (como porinas), componentes del LPS, ácidos teicoicos de la pared celular, flagelos, fimbrias (o pili), y cápsulas polisacarídicas [30] (**Figura I.2**).

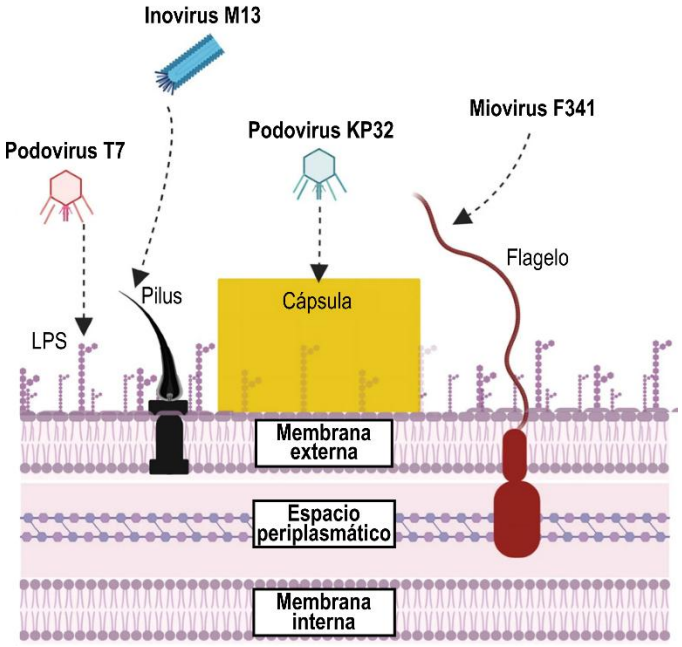


Figura I.2. Principales receptores de superficie implicados en la adsorción de bacteriófagos en gram-negativas. Se ilustran las distintas estructuras diana junto con ejemplos de fagos modelo capaces de reconocerlas. Figura adaptada de [30].

Si bien cualquiera de estas estructuras puede ser utilizada como receptor, la gran mayoría de los fagos aislados contra *K. pneumoniae*

ha evolucionado para reconocer específicamente los azúcares de los distintos tipos capsulares, e iniciar el proceso de adsorción. Debido a la alta diversidad estructural de cápsulas, los fagos de *Klebsiella* suelen presentar un rango de hospedador extremadamente reducido. Un estudio reciente de nuestro laboratorio, en el que se generó y caracterizó una colección de fagos frente a los 77 tipos capsulares de referencia, demostró esta elevada especificidad: el 84.88% de los fagos aislados infectaba únicamente entre 1 y 3 cepas [31].

No obstante, también existen fagos capaces de reconocer estructuras como el LPS o las OMP. En el caso del LPS, dado que la diversidad del antígeno O en *K. pneumoniae* es limitada y muy inferior a la de la cápsula (12 serotipos O principales, con O1, O2 y O3b representando el 80% de los aislados clínicos), los fagos presentan potencialmente un rango de hospedador mucho más amplio [32]. Sin embargo, en cepas mucosas y con cápsulas espesas, el LPS puede hallarse oculto bajo la densa matriz capsular, siendo físicamente inaccesible para estos fagos. En estas situaciones, la cápsula actúa como barrera impidiendo la infección, por lo que estos fagos resultan principalmente efectivos contra variantes que han perdido la cápsula (acapsulares) o presentan defectos en su biosíntesis [32].

2.2 Estructura y función de las depolimerasas

En el caso de los fagos que infectan bacterias con cápsula, la unión inicial al CPS es un proceso reversible, que precede a la unión irreversible a los receptores localizados bajo la gruesa matriz de polisacáridos y la consecuente inyección del material genético. Para ello, el fago necesita degradar localmente esta barrera física. A lo largo

de la evolución, se han desarrollado estructuras especializadas con actividad enzimática denominadas depolimerasas [33].

Estas enzimas son proteínas estructurales integradas que forman parte del aparato de adsorción y reconocimiento del virión, ubicándose típicamente en las *tail fibers* o en las *tail spikes*. Desde un punto de vista enzimático, estas proteínas actúan como glicosidasas (hidrolasas o liasas) altamente específicas. Reconocen y rompen enlaces glicosídicos específicos dentro de la unidad repetitiva del polímero capsular, fragmentando el polisacárido en oligosacáridos de menor peso molecular [33]. Esta actividad enzimática es la responsable de la formación de los característicos halos translúcidos que rodean las calvas de lisis en los cultivos en placa, indicando la degradación de la cápsula más allá de la zona de muerte celular [34].

A nivel molecular, estas proteínas suelen organizarse como homotrímeros con una arquitectura modular relativamente conservada, dividida en tres dominios [35] (**Figura I.3**):

- **Dominio N-terminal (anclaje):** Es la región más conservada estructuralmente. Su función es estructural, encargándose de anclar la proteína a la placa base del fago, uniendo el virión a la estructura de reconocimiento.
- **Dominio central (catalítico y reconocimiento):** Constituye la región funcional y más variable de la proteína. Adopta generalmente una conformación de β-hélice paralela que confiere estabilidad, y que además contiene el sitio catalítico, lo que determina la especificidad por el tipo de azúcar o enlace capsular concreto.

- **Dominio C-terminal (chaperona y trimerización):** Esta región es crítica para el correcto plegamiento de la proteína. Actúa frecuentemente con función de chaperona, permitiendo la oligomerización de la proteína en un homotrímero funcional.

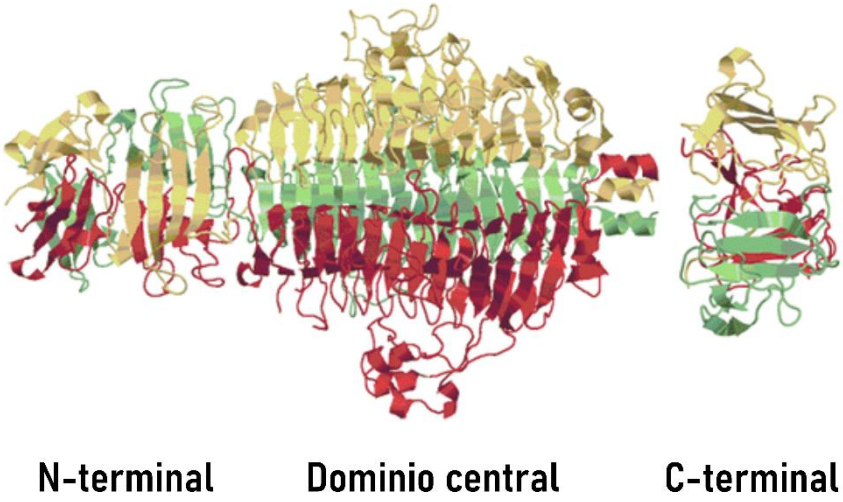


Figura I.3. Estructura de la depolimerasa (*tail spike*) del fago P22. Se muestran los dominios N-terminal, central, y C-terminal. Cada monómero del homotrímero de la proteína se muestra con un color distinto (amarillo, verde y rojo). Figura adaptada de [36].

3. Resistencia a fagos mediada por pérdida de cápsula: un compromiso evolutivo

La presión selectiva ejercida por la constante exposición a los bacteriófagos ha impulsado una carrera armamentística que ha dado lugar al desarrollo de diversos y sofisticados sistemas de defensa bacterianos. Estos mecanismos pueden actuar en distintas fases del

ciclo de infección del fago: bloqueando la adsorción a la superficie celular, mediante la modificación de receptores; inhibiendo la inyección del material genético en el interior de la célula, como los sistemas de exclusión de la superinfección (SIE) de los profagos bacterianos; degradando el material genético del fago, mediante los sistemas de restricción-modificación (R-M), o los sistemas CRISPR-Cas; e incluso promoviendo el suicidio celular para detener la propagación viral y proteger a la población bacteriana, como los sistemas de infección abortiva (Abi) [37,38].

De todos ellos, la modificación de los receptores de superficie empleados por los fagos constituye la primera línea de defensa y el mecanismo de resistencia más prevalente observado *in vitro*. En el caso de *K. pneumoniae*, la pérdida o modificación de cápsula se ha descrito principalmente asociada a mutaciones (deleciones, inserciones o SNP) o a la movilización de elementos transponibles (IS) que disrumpen genes estructurales o genes regulatorios de la biosíntesis del CPS [39,40]. Por ejemplo, en un estudio reciente con la cepa SCNJ1 se mostró que 36/37 clones resistentes fago, poseían al menos una mutación relacionada con la biosíntesis de CPS. Algunos de los genes afectados fueron *wcaJ*, *wzi* o *wzc* [41].

Las alteraciones en los genes de biosíntesis de CPS dan lugar a fenotipos de pérdida o reducción de cápsula. Si bien esta modificación confiere resistencia frente a la infección por fago, también conlleva un elevado coste biológico que compromete la virulencia y la supervivencia de la bacteria [41,42]. Existen numerosos estudios que muestran cómo las células acapsulares muestran una susceptibilidad mucho mayor al sistema del complemento y a la opsonización por

anticuerpos para la fagocitosis, además de ver comprometida su capacidad para la adhesión y la formación de biofilms [43,44].

El elevado coste biológico que conlleva la acapsularidad, se hace todavía más significativo al considerar que las mutaciones que la confieren son estables y difícilmente reversibles a corto plazo. Este compromiso evolutivo entre la resistencia a fagos y la virulencia plantea una pregunta clave: ¿existen mecanismos de regulación de cápsula más dinámicos que no comprometan la supervivencia bacteriana de forma permanente? En este contexto, sería lógico pensar que la bacteria disponga de sistemas reversibles que permitan dejar de producir cápsula temporalmente, asegurando la supervivencia, sin recurrir a mutaciones permanentes, lo que se conoce como resistencia fenotípica.

De hecho, esta capacidad de modificar dinámicamente los receptores está bien documentada en otros patógenos gramnegativos bajo el concepto de variación de fase [45,46]. Este fenómeno abarca tanto mecanismos genéticos, como la mutación de loci hipervariables en *Haemophilus influenzae* [47], como mecanismos epigenéticos, destacando la regulación del antígeno O del LPS en *Salmonella* spp. [48,49]. Ambas estrategias confieren a la bacteria una elevada plasticidad fenotípica que, mediante cambios rápidos y reversibles en la superficie celular, permite evadir eficazmente la depredación viral.

A diferencia de lo observado en estos modelos, en *K. pneumoniae* no se ha descrito formalmente un mecanismo de variación de fase vinculado de manera específica a la resistencia a fagos. Aunque este patógeno se caracteriza por tener una inmensa diversidad de tipos capsulares, las alteraciones en la producción de la

cápsula han sido tradicionalmente descritas asociadas exclusivamente a mutaciones genéticas. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la plasticidad fenotípica es mucho mayor de lo estimado [50,51]. Se ha documentado que la pérdida de cápsula puede ser un fenómeno altamente frecuente debido a la inserción de IS. Sin embargo, su reversibilidad es un proceso considerablemente más lento, que puede requerir periodos prolongados *in vivo* [52]. Por otro lado, se ha demostrado que pequeños ARN no codificantes (ARNnc), actúan reprimiendo la producción de cápsula y la hipermucoviscosidad, lo que sugiere la existencia de mecanismos postranscripcionales capaces de modular la superficie bacteriana de manera altamente dinámica [53].

En conjunto, esto sugiere que *K. pneumoniae* podría explotar la plasticidad fenotípica como una estrategia clave, que le permita resistir transitoriamente a la infección por fago sin comprometer su virulencia y supervivencia de forma irreversible.

4. Dinámica coevolutiva fago-bacteria

La interacción entre las poblaciones bacterianas y sus fagos es un proceso continuo de adaptación recíproca conocido como coevolución antagonista [54]. Dada la elevada presión selectiva que ejercen los fagos y la consecuente respuesta de las bacterias para sobrevivir a la infección, ambas entidades se ven inmersas en una constante carrera armamentística. En este escenario, la aparición de un mecanismo de resistencia bacteriano selecciona variantes del fago capaces de superarlo, lo que a su vez impulsa la selección de nuevas

defensas en el hospedador, promoviendo así un ciclo evolutivo continuo [55,56].

Tal y como se ha descrito previamente, las bacterias modifican o enmascaran sus receptores, como la cápsula en el caso de *K. pneumoniae*, para evitar la adsorción. Como respuesta, los fagos responden acumulando mutaciones principalmente en genes que codifican sus RBP, gracias a su relativa elevada tasa de mutación [57,58]. Esto les permite incrementar su rango de hospedador adaptándose rápidamente a las cepas resistentes [59,60].

Desde una perspectiva ecológica, esta interacción puede explicarse mediante dos modelos teóricos: la dinámica de la carrera armamentística, caracterizada por una escalada evolutiva direccional mediante la adquisición y acumulación de mutaciones, o la selección fluctuante, en la que las frecuencias de fago y bacteria oscilan según su abundancia relativa [61,62]. Esta última dinámica se vuelve particularmente importante en escenarios donde coexisten fagos con distintos tropismos [60,62]. En estos casos, por ejemplo, la presión de un fago dependiente de cápsula puede seleccionar variantes resistentes acapsulares. Sin embargo, la pérdida de cápsula puede exponer receptores secundarios, volviendo a la bacteria susceptible a un segundo fago. Esto hace que la población bacteriana oscile entre fenotipos, promoviendo a su vez la fluctuación de las poblaciones de fago en función de la disponibilidad de su hospedador.

De este modo, se establece un equilibrio dinámico que garantiza la coexistencia a largo plazo de fagos y hospedadores, preservando la diversidad biológica del sistema.

Objetivos

Los principales objetivos de la presente tesis son:

1. Caracterizar fenotípica y molecularmente los mecanismos de resistencia de *K. pneumoniae* frente a un fago específico de tipo capsular.
2. Diseñar y evaluar combinaciones de fagos para el control de la resistencia en *K. pneumoniae*.
3. Explorar la dinámica coevolutiva entre *K. pneumoniae* y una combinación de fagos.

Metodología

1. Cultivo y caracterización bacteriana

1.1 Bacteria y condiciones de cultivo

La cepa bacteriana usada en este estudio fue *Klebsiella pneumoniae* NCTC5054 (CABDWB010000000), considerada la cepa de referencia del serotipo capsular K1, y perteneciente a la colección del Statens Serum Institute (Copenhague, Dinamarca). El cultivo de esta cepa y derivados se realizó rutinariamente en medio LB suplementado con 3.78 mM de $CaCl_2$, a 37 °C y con agitación.

1.2 Tinción y visualización de cápsula al microscopio

Para determinar la presencia de cápsula en los cultivos bacterianos, se realizó una tinción de contraste con cristal violeta y nigrosina. Cultivos en medio líquido, con una concentración mínima recomendada de 10^9 UFC/mL, se fijaron durante 20 min con formaldehído al 2.5% en presencia de 100 mM de lisina. El agente fijador se eliminó mediante centrifugación y lavado con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, se mezclaron 25 – 40 µL del cultivo fijado con una pequeña gota de nigrosina al 10% sobre un portaobjetos, que se extendió a lo largo del mismo y se esperó hasta su secado. A continuación, se cubrió la preparación con cristal violeta al 1% y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se enjuagó cuidadosamente con agua destilada, se dejó secar al aire y se examinó al microscopio óptico.

1.3 Cuantificación de cápsula mediante el método del ácido urónico

La producción de cápsula se cuantificó mediante el método del ácido urónico. Los cultivos bacterianos se lavaron dos veces con PBS.

Para la extracción de cápsula, 500 µL de la suspensión bacteriana se mezclaron con 100 µL de ácido cítrico 500 mM y 1% de Zwittergent 3-10. Tras una incubación de 20 min a 56 °C, se centrifugó (14 000 × g, 5 min) para sedimentar los restos celulares, y el sobrenadante se mezcló con etanol (concentración final 80% v/v), incubándose 30 min a 4 °C para promover la precipitación de la cápsula. Los tubos se centrifugaron (14 000 × g, 20 min, 4 °C), se dejaron secar al aire, se resuspendieron en agua y se incubaron 2 h a 56 °C.

Para cuantificar la cápsula, se añadió 1.2 mL de solución de bórax al tubo con la cápsula precipitada y se incubó a -4 °C durante 10 min, seguido de 10 min a 95 °C. Posteriormente, las muestras se incubaron nuevamente a -4 °C durante 10 min. Finalmente, se añadieron 20 µL de 3-hidroxibifenilo en 0.5% NaOH como agente colorimétrico para cuantificar el ácido urónico presente en cada muestra, utilizando una curva estándar con ácido glucurónico como referencia.

2. Aislamiento y caracterización de fagos

2.1 Aislamiento de fagos a partir de muestras de aguas residuales

Para el aislamiento de fagos se utilizaron muestras de aguas residuales procedentes del área metropolitana de Valencia (España). Las muestras se centrifugaron a 4 °C, 4000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0.22 µm. Posteriormente, 800 µL del sobrenadante se mezclaron con 200 µL de cultivo bacteriano en fase estacionaria. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, se combinó con 3.5 mL de agar LB semisólido y se vertió sobre placas de agar LB. Tras una incubación

de 16 h a 37 °C, se seleccionaron unidades formadoras de placas (UFP), que fueron resuspendidas en 4 µL y purificadas mediante un mínimo de tres pases consecutivos de placa a placa, siguiendo el mismo procedimiento. Los lisados de cada pase se centrifugaron para sedimentar las bacterias, y los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C. Finalmente, para generar las preparaciones definitivas de fagos, se amplificaron en medio líquido (LB + $CaCl_2$) a 37 °C. Tras 3 h de incubación, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se filtró por 0.22 µm, para ser almacenado a -70 °C.

2.2 Titulación de fago mediante recuento de UFP

Para determinar la concentración de fago presente en una muestra (titulación viral), se realizaron diluciones seriadas de dicha muestra. De cada dilución, se cogieron 10 µL que se añadieron a un tubo con 3.5 mL de agar semisólido. Al mismo tubo se añadieron 200 µL de cultivo bacteriano en fase estacionaria (≈ 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)). La mezcla se homogeneizó mediante agitación con vórtex y se vertió sobre placas de agar sólido. Tras una incubación de mínimo 16 h a 37 °C, se contaron UFP para calcular la concentración de fagos en la muestra original, considerando las diluciones realizadas y el volumen inoculado en la placa.

2.3. Microscopía electrónica de transmisión

Lisados de fago fueron filtrados a través de 0.22 µm y concentrados mediante centrifugación de alta velocidad (80000 × g, 2 h, 4 °C) para alcanzar un título mínimo de 10^{10} UFP/mL. El sedimento se resuspendió en tampón SM y se envió al servicio de microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe para su procesado y visualización. Brevemente, las muestras se depositaron sobre rejillas

de cobre con mallas de 300 recubiertas con Formvar y carbono. A continuación, las preparaciones se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% y se observaron mediante un microscopio electrónico Jeol JEM-1010.

3. Ensayos de infectividad y resistencia

3.1 Ensayos de infectividad

3.1.1 Capacidad replicativa del fago

Para evaluar la capacidad replicativa del fago, se realizaron infecciones en líquido (por triplicado) utilizando tubos de 2 mL. Para ello, se inoculó una concentración final de bacteria de aproximadamente 3.33×10^7 UFC/mL, con fago a la concentración deseada, en un volumen final de 500 µL. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación durante 3 h. Finalizada la incubación, los tubos fueron centrifugados a 10000 × g durante 3 min, y el sobrenadante se tituló para determinar la concentración de fago tras la infección.

3.1.2 Técnica del *spot*

La técnica del *spot* se emplea para evaluar la capacidad lítica de los fagos sobre distintas cepas bacterianas. Consiste en generar un césped bacteriano sobre el que se deposita una pequeña gota de suspensión de fago, que producirá una zona de lisis si el fago es capaz de infectar a la bacteria.

Para ello, se mezclaron 200 µL de cultivo bacteriano en fase estacionaria (≈ 10^9 UFC) con 3.5 mL de agar semisólido, y la mezcla se vertió sobre una placa de agar sólido. Una vez solidificado, se añadieron gotas de 4 µL de fago a una concentración de 5×10^7

UFP/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante al menos 16 h, y se evaluaron los resultados (todos los ensayos se hicieron por triplicado). El nivel de resistencia se determinó en función del tipo de lisis observada, siguiendo el siguiente criterio: 2 (lisis completa o *spot* claro), 1 (*spot* turbio, lisis parcial) y 0 (ausencia de *spot*, sin lisis).

3.1.3 Curvas de crecimiento bacteriano e infección

Las infecciones en medio líquido, y su seguimiento mediante medición de la densidad óptica a 620 nm (OD_{620}) permiten obtener una representación cuantitativa y dinámica del proceso de infección. Para ello, en placas de 96 pocillos, se inoculó una concentración final de bacteria de aproximadamente 3.33×10^7 UFC/mL junto con el fago a la concentración deseada en función de la multiplicidad de infección (MOI), en un volumen final de 150 µL (cada condición experimental se analizó por triplicado). Posteriormente, se realizó la incubación durante 16 h a 37 °C con agitación de fondo y la medición de la OD_{620} de manera automatizada usando el lector de placas Multiskan FC.

3.2. Estudio de la resistencia a fagos

3.2.1 Selección y aislamiento de cultivos resistentes a Cap62

La cepa de *K. pneumoniae* NCTC5054 sin infectar (denominada WT) se inoculó con el fago Cap62 y se incubó hasta la emergencia de variantes resistentes. El cultivo resultante se designó como población resistente (RP). Este cultivo corresponde a una población heterogénea que contiene múltiples variantes resistentes surgidas tras la infección con Cap62, y en la que se mantuvo intencionadamente la presencia del propio fago para conservar el fenotipo resistente.

Para aislar clones resistentes libres de fago, los cultivos resistentes se lavaron tres veces y se sembraron en placas de agar. Posteriormente, se realizaron al menos tres pases secuenciales de colonia a colonia con el fin de eliminar posibles restos de fago residual. Las colonias individuales se seleccionaron, se cultivaron en medio LB + $CaCl_2$ hasta alcanzar la fase estacionaria. Finalmente, estos cultivos se conservaron en glicerol al 20% a -70 °C.

3.2.2 Evaluación cuantitativa de la resistencia

Para evaluar la resistencia bacteriana a la infección por fago se desarrollaron tres métricas complementarias, adaptadas a los objetivos específicos de cada estudio:

- **Tiempo de aparición de resistencias**

A partir de las curvas de infección en medio líquido se calculó el tiempo de aparición de resistencias como la diferencia entre la pendiente máxima del cultivo sin infectar y del cultivo infectado, según la fórmula:

$$m = \frac{OD_{n+1} - OD_n}{T_{n+1} - T_n}$$

donde *OD* representa la OD_{620} y *T* el tiempo (h).

- **Cálculo de la resistencia integrada**

La resistencia bacteriana frente a Cap62 se evaluó mediante dos enfoques complementarios: la técnica del *spot* y las infecciones en medio líquido.

Para ello, se integró el *Tiempo de aparición de resistencias* descrito previamente (tomando el valor del cultivo WT como referencia

mínima (0%)), y normalizado con los resultados cualitativos de la técnica del *spot*: si la sensibilidad en *spot* era alta (puntuación de 2), el valor de resistencia en líquido se ponderó negativamente con un factor de 0.5.

Este cálculo permitió obtener un índice de resistencia integrado, que combina la sensibilidad observada tanto en medio sólido como en medio líquido, ofreciendo una estimación más robusta de la resistencia bacteriana.

- **Índice de Retraso de Resistencias (RDI)**

Para comparar la capacidad de las variantes evolucionadas de retrasar la aparición de resistencias, se calculó un Índice de Retraso de Resistencia (RDI, del inglés *Resistance Delay Index*) a partir de las curvas de infección, utilizando la siguiente fórmula:

$$RDI = 1 - \left(\frac{OD_{final}}{OD_{inicial} \times T_{bmax}}\right)$$

donde OD_{final} representa la OD_{620} al final del experimento, $OD_{inicial}$ la OD_{620} inicial del cultivo, y T_{bmax} el tiempo (h) en el que la curva de crecimiento alcanza su máxima pendiente. De este modo, valores más altos de RDI indican una mayor capacidad de los fagos para suprimir el crecimiento bacteriano.

3.3 Análisis de susceptibilidad a nivel de célula única mediante citometría de flujo

Para analizar la susceptibilidad de las células individuales de los cultivos bacterianos a los fagos Cap62 y CuaHET1, se realizaron al menos 5 lavados del cultivo con PBS 1× para eliminar trazas de medio

y cualquier posible presencia residual de fago (como en el caso del cultivo RP). Los cultivos lavados se resuspendieron en PBS 1× a una concentración final de 10^5 UFC/mL.

Las muestras se procesaron en un citómetro (BD FACSAria™ Fusion, nivel de bioseguridad 2), y células individuales fueron aisladas en placas de 96 pocillos (una célula por pocillo) que contenían distintos tratamientos: LB, fago, Cap62, fago CuaHET1, o el cóctel de ambos fagos. Las concentraciones de fago se mantuvieron muy elevadas (10^8 – 10^9 PFU/mL) para asegurar que únicamente las bacterias resistentes pudieran crecer. Tras 48 h de incubación a 37 °C, se cuantificó el número de pocillos con crecimiento bacteriano. El número de pocillos con crecimiento en LB se consideró como crecimiento máximo (100%), y el crecimiento en presencia de fago se normalizó respecto a esta condición para estimar la resistencia relativa frente a cada fago. Las diferencias en la proporción de pocillos con crecimiento entre LB y cada tratamiento con fago se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Para analizar el efecto de la presión selectiva del fago en el mantenimiento del fenotipo acapsular, se realizó un primer pase aislando células individuales de la población RP en pocillos con LB o Cap62 (10^8 – 10^9 PFU/mL). Tras 48 h de incubación a 37 °C, se efectuó un segundo pase mediante un nuevo aislamiento de células individuales en las mismas condiciones (LB o Cap62). En ambos pases, las células aisladas fueron posteriormente expuestas a los tratamientos de LB, fago Cap62 y fago CuaHET1 (10^8 – 10^9 PFU/mL), incubadas y cuantificadas como se describió anteriormente.

3.4 Ensayo con medio condicionado

Para determinar si el fenotipo acapsular podía ser inducido por moléculas de señalización secretadas por las bacterias resistentes en presencia del fago, se centrifugaron (10000 × g, 3 min, 4 °C) los cultivos crecidos en fase exponencial tardía, y los sobrenadantes se filtraron dos veces a través de un filtro de 0.05 µm para garantizar la eliminación total del fago, conservando al mismo tiempo las posibles moléculas de señalización. A continuación, estos sobrenadantes condicionados fueron empleados para el crecimiento de cultivos frescos, incubados a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial tardía. Finalmente, se evaluó la presencia de cápsula mediante microscopía, siguiendo el protocolo de la sección **Metodología: *1.2 Tinción y visualización de cápsula al microscopio***.

4. Ensayos de evolución experimental

4.1 Coevolución fago-bacteria

Los experimentos de coevolución se llevaron a cabo propagando la cepa ancestral de *K. pneumoniae* K1 con fagos bajo diferentes condiciones: (i) bacterias infectadas con el fago Cap62 a una MOI de 0.1; (ii) bacterias infectadas con el fago CuaHET1 a una MOI de 0.1; (iii) bacterias infectadas simultáneamente con ambos fagos, Cap62 y CuaHET1 (cóctel), con una MOI combinada de 0.2; (iv) y bacterias cultivadas sin fagos como control. Cada condición evolucionó por triplicado, obteniéndose tres linajes evolutivos independientes para cada condición.

Los cultivos se propagaron en un volumen final de 2.5 mL, y en cada pase se inoculó 100 µL del cultivo previo en medio fresco. Se

realizó un total de 20 pases. La densidad de las poblaciones de fago y bacteria se cuantificaron durante los primeros 10 pases mediante titulación de partículas virales y de células bacterianas, respectivamente. De cada pase, se conservaron alícuotas a -70 °C para el posterior análisis de secuenciación genómica de fagos y bacterias.

4.2 Aislamiento y purificación de fagos evolucionados

A partir del pase 20 de la condición del cóctel, se obtuvieron aislados individuales para cada uno de los tres linajes evolutivos. Los cultivos se centrifugaron (8000 × g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se utilizó para recuperar los fagos por separado mediante el uso de hospedadores selectivos. Tras una incubación de 16 h a 37 °C, se seleccionaron aleatoriamente cinco UFP de cada fago. La purificación de cada aislado se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de purificación descrito en la sección Metodología: *2.1 Aislamiento de fagos a partir de muestras de aguas residuales*. Finalmente, los fagos purificados se amplificaron en sus hospedadores respectivos y se almacenaron a -70 °C.

5. Análisis genómico, transcriptómico y funcional

5.1 Extracción de ADN, secuenciación y análisis genómico de fagos

El lisado de fago se filtró a través de filtros de 0.22 µm y se concentró utilizando la pipeta automática Concentrating Pipette Select (Innovaprep) hasta alcanzar un título mínimo de 10^{10} UFP/mL. A partir del lisado concentrado se extrajo el ADN de las cápsides virales

mediante un protocolo automatizado utilizando el instrumento Maxwell RSC (Promega). La biblioteca de ADN se preparó con el kit Illumina Nextera XT (lecturas emparejadas de 2 × 150 pares de bases (pb) o 2 × 250 pb) y la plataforma Illumina MiSeq se empleó para generar las lecturas de secuenciación utilizando el iSeq Reagent Kit v2.

La calidad de las lecturas se evaluó con FastQC [63] y el genoma se ensambló de novo con SPAdes v3.15.4 [64] en un único contig. La anotación del genoma de fago se realizó con Pharokka [65]. Los genes se clasificaron en grupos funcionales según la asignación de PHROGs [66] y se generó un gráfico comparativo de los genomas utilizando gggnomes [67].

Para la clasificación taxonómica de los fagos, se realizó alineamientos de los genomas contra bases de datos utilizando la herramienta BLASTn [68]. Según los criterios del ICTV, fagos con ≥ 95% identidad y buena cobertura se consideran de la misma especie, mientras que aquellos con ≥ 70% de identidad y cobertura adecuada se agrupan dentro del mismo género. VIRIDIC [69] se utilizó para estimar la similitud intergenómica entre fagos, y las herramientas BACPHLIP [70] y PhageLeads [71] se emplearon para predecir el estilo de vida del fago.

La identificación de proteínas con potencial actividad depolimerasa se llevó a cabo utilizando DepoScope [72], Phage DPO [73] y DePP [74]. Se consideraron como candidatas aquellas proteínas predichas por las tres herramientas con una probabilidad superior al 90%.

5.2 Modelización estructural y visualización de proteínas estructurales de fagos

La estructura tridimensional de las *tail fiber proteins* de los fagos Cap62 (CDS 0007) y CuaHET1 (CDS 0087) se predijo utilizando AlphaFold 3 [75], a través del Protein Structure Prediction Server (https://alphafoldserver.com/). Ambas proteínas se predijeron como complejos triméricos. Los archivos PDB resultantes se visualizaron y analizaron con PyMOL v3.0.5 (Schrödinger, LLC). Para representar los cambios aminoacídicos se representaron las estructuras de las proteínas ancestrales y se destacaron con puntos las posiciones correspondientes a las mutaciones detectadas en las variantes evolucionadas.

5.3 Extracción de ADN, secuenciación y análisis genómico bacteriano

Los cultivos bacterianos se crecieron hasta la fase estacionaria y se extrajo ADN genómico utilizando el kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Se prepararon bibliotecas libres de PCR con lectura pareada de 150 pb mediante el NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, y la secuenciación se realizó en la plataforma Illumina NovaSeq6000. La calidad de las lecturas se evaluó con FastQC [63]. El genoma de la cepa WT se ensambló mapeando sus lecturas contra el genoma de referencia (CABDWB000000000) utilizando bwa-mem2 [76].

Para identificar variantes de nucleótido único (SNVs) en los aislados resistentes, las lecturas de RP, CL4 y CL13 se mapearon sobre el genoma ensamblado de WT como referencia, y se procedió al “llamado” de variantes mediante tres herramientas independientes: Snippy [77], LoFreq [78] y Breseq [79], usando los parámetros predeterminados. Para detectar cambios genómicos de mayor tamaño

e inserciones de elementos genéticos móviles que no fueran capturados por los detectores de SNVs, todos los aislados se analizaron también con Breseq [79]. Solo se consideraron las variantes detectadas de manera consistente por las tres herramientas. Las variantes candidatas se confirmaron adicionalmente mediante remapeo y revisión manual con IGV [80].

Además, para descartar falsos positivos en la detección de variantes, se extrajeron los recuentos de nucleótidos de cada alelo a lo largo del genoma y se compararon entre WT y la población resistente mediante una prueba exacta de Fisher, aplicando una corrección por tasa de descubrimiento falso (FDR) con el método Benjamini-Hochberg para datos discretos, implementado en el paquete DiscreteFDR (v2.0.0) de R [81–83].

La detección de regiones de origen profágico en el genoma bacteriano se llevó a cabo utilizando la herramienta PHASTEST [84].

5.4 Extracción de ARN, secuenciación y análisis transcriptómico bacteriano

El ARN total de cultivos en fase exponencial (tres réplicas biológicas para cada condición) se extrajo utilizando RNAzol RT (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó mediante un fluorímetro Qubit (Thermo Scientific), mientras que su calidad e integridad se evaluaron con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) y un analizador 2100 Bioanalyzer (Agilent). Antes de la construcción de la biblioteca de ADNc, se realizó la depleción del ARN ribosomal. La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina NextSeq 500 (2 × 75 pb).

Las lecturas obtenidas se alinearon frente al genoma de la cepa WT utilizando HISAT2 [85], y los recuentos totales de lecturas por cada característica genómica se obtuvieron con featureCounts [86]. El análisis de transcripción diferencial entre las muestras se realizó con DESeq2 [87] a partir de los recuentos de lecturas. La normalización de los datos se efectuó mediante la función de transformación estabilizadora de la varianza (VST), y la significatividad estadística de los valores de Log_2FC se evaluó mediante una prueba de Wald.

La variabilidad global en los perfiles de expresión génica entre las muestras se evaluó mediante análisis de componentes principales (PCA) en R [81,82]. Para explorar patrones de expresión y relaciones entre las muestras, se generó un mapa de calor con su dendrograma asociado mediante ggplot2 (v3.5.1) [88] y ggdendro [89], mientras que los cambios de expresión diferencial se visualizaron mediante gráficos de volcán en R.

La expresión relativa de diversos operones de los cultivos resistentes, en comparación con la cepa WT, se representó mediante gráficos de barras utilizando el paquete ggplot2 (v3.5.1) [88].

Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de cultivos de *K. pneumoniae* resistentes a un fago específico del tipo capsular K1

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en:
Mora-Quilis, L., Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2025). Reversible phenotypic resistance to phage infection via capsule downregulation in Klebsiella pneumoniae. *Iscience*, *28*(12).
https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.114107

En este capítulo exploramos la capacidad de *K. pneumoniae* de escapar a la infección por un fago dependiente de cápsula, utilizando el cultivo de *K. pneumoniae* de referencia, del tipo capsular K1.

1. Aislamiento y caracterización del fago Cap62

1.1 Aislamiento del fago Cap62 a partir de muestras de aguas residuales

Con el objetivo de aislar un fago capaz de infectar y lisar cultivos de *K. pneumoniae* del tipo capsular K1, se utilizaron diversas muestras de aguas residuales procedentes de estaciones depuradoras situadas en los alrededores de la provincia de Valencia. Tras varios procesos de centrifugado y filtrado para eliminar contaminantes de origen biológico (como células bacterianas y otros microorganismos), las muestras se incubaron con la cepa bacteriana durante un mínimo de 12 horas.

Posteriormente, se observó la formación de UFP o calvas de lisis. Se seleccionó una de las calvas que presentaba características típicas de lisis por fagos: tamaño considerable, morfología circular concéntrica y presencia de halo indicando posible actividad de depolimerización capsular (**Figura 1.1**). Con el objetivo de seleccionar una única variante, y para confirmar su naturaleza replicativa y descartar que se tratara de una lisis espontánea o provocada por compuestos citotóxicos presentes en las muestras ambientales, se realizaron tres pases seriados de purificación mediante la técnica del picado de calvas. Una calva de lisis aislada del tercer pase de purificación fue seleccionada para la amplificación del fago en medio

líquido, garantizando la selección de una única variante viral, para minimizar la heterogeneidad genotípica. A este fago se le asignó el nombre Cap62.

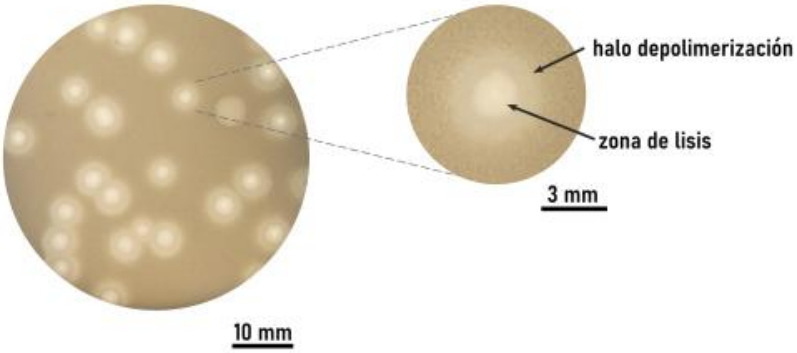


Figura 1.1. Calvas de lisis del fago Cap62. A la izquierda se muestra como ejemplo una placa de cultivo bacteriano K1 inoculado con fago Cap62. Las calvas de lisis indican la susceptibilidad al fago. A la derecha, se muestra en detalle una calva con un núcleo de lisis y un halo concéntrico más turbio, característico de actividad depolimerasa.

1.2 Caracterización morfológica y genómica de Cap62

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión muestran que Cap62 presenta una morfología de podovirus, caracterizada principalmente por la presencia de una cápside icosaédrica sin envuelta, de aproximadamente 50 nm de diámetro, asociada a una corta cola no contráctil, de la que emergen seis fibras subterminales cortas (**Figura 1.2**).

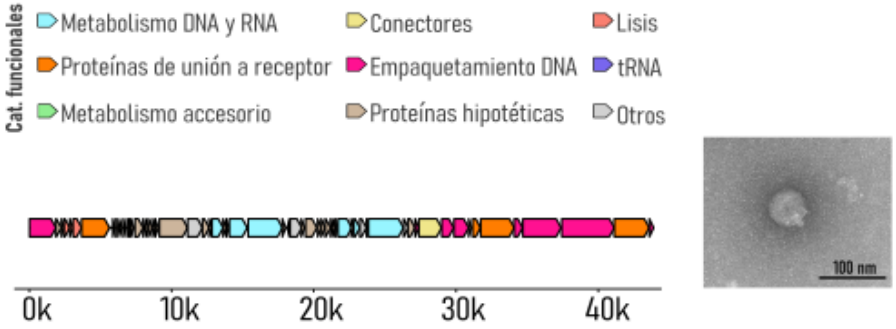


Figura 1.2 Caracterización genómica y morfológica del fago Cap62. Izquierda: organización genómica y categorías funcionales del fago Cap62, donde cada flecha representa una secuencia codificante. **Derecha:** micrografía electrónica de transmisión mostrando la morfología de Cap62. La barra representa 100 nm.

Los resultados de la secuenciación completa del genoma confirmaron que Cap62 es un virus de ADN bicatenario, sin envuelta, perteneciente a la clase *Caudoviricetes*, concretamente a la familia *Autographiviridae* y al género *Drulisvirus*. Su genoma tiene una longitud de 43906 pb, un contenido GC del 54%, y contiene 61 secuencias codificantes predichas (**Figura 1.2**), todas ellas con potencial para codificar proteínas. Cabe destacar la identificación de tres proteínas estructurales con potencial actividad depolimerasa, predicha por tres herramientas diferentes con valores superiores al 90% **(Tabla 1.1).** De ellas, la codificada por el CDS 007 (*tail fiber protein*) presenta una elevada homología (95.70% identidad, 100% cobertura, BLASTp) con otra proteína descrita previamente en la literatura como responsable de la depolimerización específica del tipo capsular K1 [90]. Además, en el genoma no se encontraron genes asociados a resistencia a antibióticos ni a otros factores de virulencia, y los análisis de predicción confirmaron que se trata de un fago

estrictamente lítico (probabilidad del 100%, BACPHLIP y PhageLeads). El genoma completo del fago Cap62 está depositado en la base de datos GenBank bajo la referencia PQ741857.

Tabla 1.1. Predicción de actividad depolimerasa. Se muestran las tres CDS del fago Cap62 con una probabilidad de predicción > 0.9 para los tres predictores empleados.

Fago	CDS	Nombre	DepoScope	PhageDPO	DePP
Cap62	007	*Tail fiber protein*	1.00	0.99	0.94
	056	*Tail protein*	1.00	0.91	0.98
	060	*Tail fiber protein*	1.00	1.00	0.96

1.3 Caracterización de las propiedades infectivas de Cap62

Para evaluar las propiedades infectivas del fago Cap62, se realizaron ensayos de rango de hospedador, y se evaluó su potencial lítico en la cepa de origen, K1.

Los ensayos de rango de hospedador mostraron que el fago Cap62 es capaz de producir *spots* y calvas de lisis en 2 de los 77 tipos capsulares de referencia del género *Klebsiella* spp., concretamente en los tipos capsulares K1 (cepa original de aislamiento), y K54. Además, mediante la inoculación de Cap62 en cultivos de K1 (*de aquí en adelante, llamada "WT"*) en medio líquido, se observó que el fago tiene capacidad de lisar y suprimir el crecimiento bacteriano durante al menos 3 horas postinfección (hpi), tras lo cual, emergen bacterias potencialmente resistentes al fago (**Figura 1.3.A**).

2. Selección y caracterización fenotípica de cultivos bacterianos resistentes a Cap62

El siguiente objetivo fue seleccionar y aislar cultivos bacterianos resistentes a la infección por Cap62, para su posterior caracterización fenotípica y molecular. Para ello, se realizaron infecciones independientes en medio líquido, modificando distintas condiciones experimentales como la MOI y la fase de crecimiento, con el propósito de maximizar la diversidad de los aislados. En total, se aislaron 151 clones resistentes a Cap62.

2.1 Perfil de resistencia de los clones seleccionados frente a Cap62

La resistencia de cada uno de los clones seleccionados por el fago Cap62 se evaluó mediante la técnica del *spot*. Los resultados (**Datos S1.1**) mostraron que la mayor parte de los aislados mantenían, al menos parcialmente, la susceptibilidad a Cap62 (82.78%, clones marcados con 1 o 2), y únicamente un 17.22% presentaba una resistencia total (clones marcados con 0). Además, se observó que la proporción de clones completamente resistentes no aumentó al modificar la MOI. A pesar de utilizar distintas MOIs teóricas: MOI 0.05 (clones CL4-CL62 y CL78-CL82), MOI 0.50 (clones CL63-CL72 y CL83-CL130), y MOI 5.00 (clones CL73-CL77), no se evidenció ninguna correlación clara entre la MOI y los perfiles de resistencia obtenidos. Por defecto, los clones se seleccionaron en fase estacionaria, tras alcanzar la OD_{620} máxima, excepto los clones CL93-CL100, seleccionados en fase exponencial para comprobar si esta condición podía favorecer la recuperación de variantes resistentes. No

obstante, esto tampoco incrementó la frecuencia de clones resistentes.

Para comprobar si el medio en el que se evaluaba la resistencia podía influir en el resultado, se analizó la resistencia en medio líquido de 74 clones mediante la estimación del tiempo de aparición de la resistencia (**Datos S1.1**). Los resultados mostraron un resultado mucho más variable que en *spot*. Con el fin de obtener una estimación de la resistencia más completa, se integraron ambas aproximaciones y los resultados se relativizaron tomando como referencia la resistencia del cultivo WT, establecida como el valor mínimo (0%). En conjunto, los resultados mostraron que la mayoría de los aislados presentaban un nivel intermedio de resistencia (31-50%), mientras que 8 clones mostraron un nivel de sensibilidad cercano o superior al del cultivo WT (≤ 10% resistencia), y únicamente 2 aislados alcanzaron niveles de resistencia superiores al 90%. Estos resultados evidencian la complejidad de aislar cultivos con un alto grado de resistencia frente a Cap62.

2.2 La presencia de Cap62 como determinante de la resistencia total

Al analizar en detalle los casos en los que la resistencia combinada (*spot* y líquido) superaba el 90%, se detectó la presencia residual del fago Cap62 en las muestras. Del mismo modo, en aquellos aislados que mostraban resistencia máxima en *spot* (valor 0), también se confirmó sistemáticamente la persistencia del fago. Este fenómeno se explicó por el hecho de que los tres pases de purificación de colonia no fueron suficientes para eliminar completamente el fago, el cual, tras

el recrecimiento de los cultivos para los ensayos, volvió a replicarse alcanzando títulos detectables.

Este hallazgo evidenció que la presencia activa de Cap62 en los cultivos permitía el crecimiento bacteriano y favorecía un fenotipo de resistencia total. Con el fin de obtener un cultivo representativo de esta situación, se infectó el cultivo WT con Cap62, conservando posteriormente la población resultante (en la que se mantuvo el fago presente) bajo la denominación de "Población Resistente" (RP). Este cultivo, caracterizado como una población no clonal y altamente resistente a Cap62, constituyó un elemento clave para los análisis posteriores.

2.3 Selección de cultivos candidatos y caracterización fenotípica

Para comprender mejor las bases de la resistencia en K1, se seleccionaron 4 cultivos representativos. Se escogió el cultivo WT como control de un cultivo sin infectar, sensible a Cap62. Se seleccionó al cultivo RP como población resistente de naturaleza no clonal que puede integrar potencialmente múltiples variantes. Y además se seleccionaron dos clones individuales libres de fago: el clon CL4, que mostraba una gran sensibilidad en *spot* (marcado con 2), aunque cierta resistencia en líquido (0.78 ± 0.11 h), con un nivel conjunto de resistencia del 31.51%. Y el clon CL13, como representante de un clon de relativa alta resistencia en *spot* (marcado con 1), y alta resistencia en líquido (-0.05 ± 0.31 h), en conjunto 83.65% resistencia (**Figura 1.3.B y Datos S1.1)**.

A continuación, se analizó la presencia de cápsula mediante microscopía (**Figura 1.3**): mientras que los cultivos WT y CL4 presentaban cápsula, los cultivos RP y CL13 demostraron ser

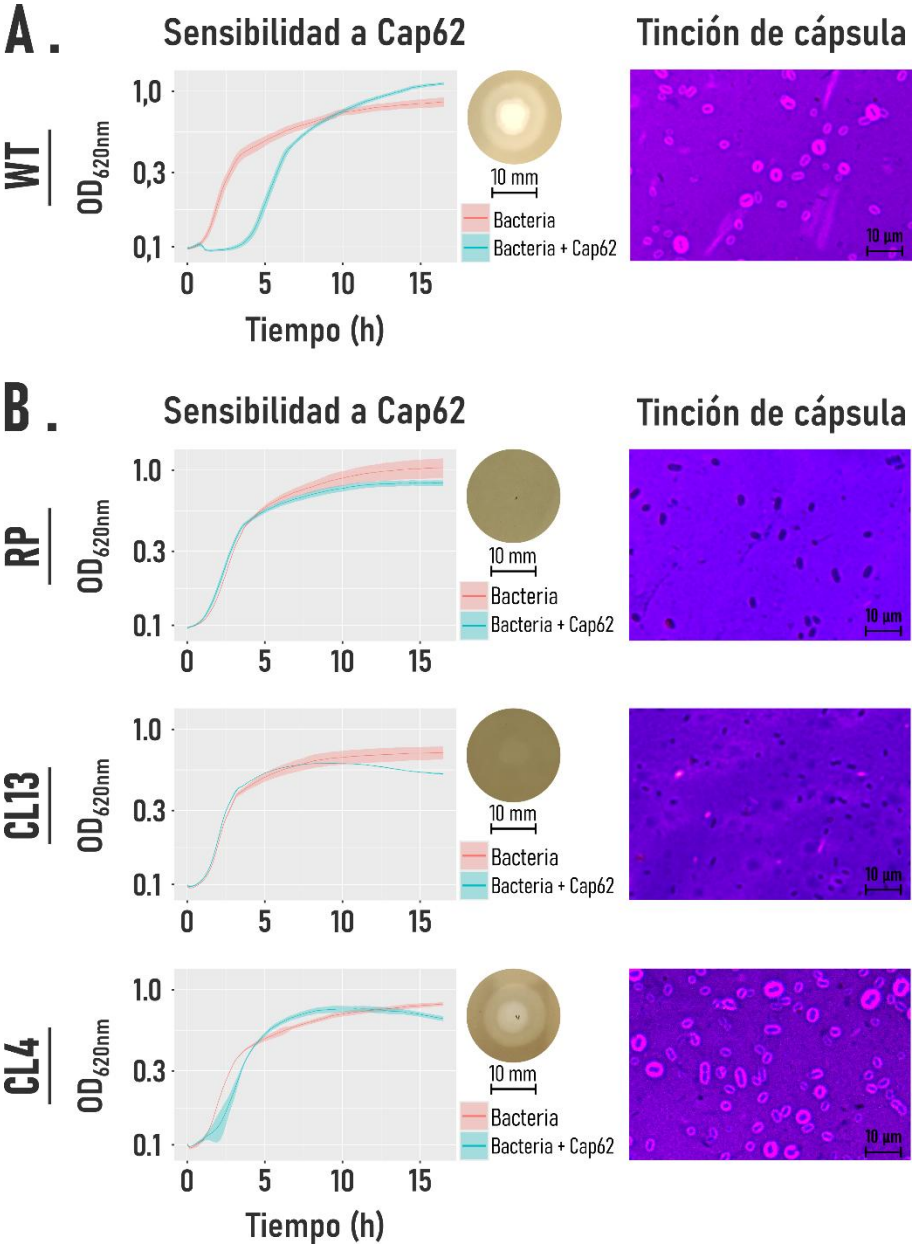


Figura 1.3. Sensibilidad a Cap62 y caracterización microscópica de los cultivos bacterianos. **A.** Cultivo WT. **B.** Caracterización de los cultivos resistentes a Cap62 (RP, CL4 y CL13). En ambos paneles, la parte izquierda muestra el crecimiento en medio líquido, en ausencia (salmón) y presencia (azul) de Cap62. La OD_{620} se midió durante 16 h. Las áreas sombreadas

indican el error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard Error of the Mean*). Imagen circular: ensayo en *spot* mostrando la sensibilidad a Cap62 (barra: 10 mm). A la derecha, se muestran micrografías de los cultivos resistentes teñidos con cristal violeta y nigrosina para la visualización de cápsula (barra: 10 µm).

claramente acapsulares. Para evaluar de manera más cuantitativa la abundancia de exopolisacáridos se cuantificó la presencia de ácido urónico, un componente importante de la cápsula bacteriana (**Figura 1.4**). De acuerdo con los resultados de microscopía, el cultivo WT presentaba la mayor cantidad de cápsula (relativizado como 100%), seguido de CL4 (85.58 ± 7.84%). En contraste, RP y CL13, ambos acapsulares bajo el microscopio, mostraron una reducción significativa en la cantidad de cápsula respecto al WT: 40.02 ± 10.53% ($p < 0.005$,

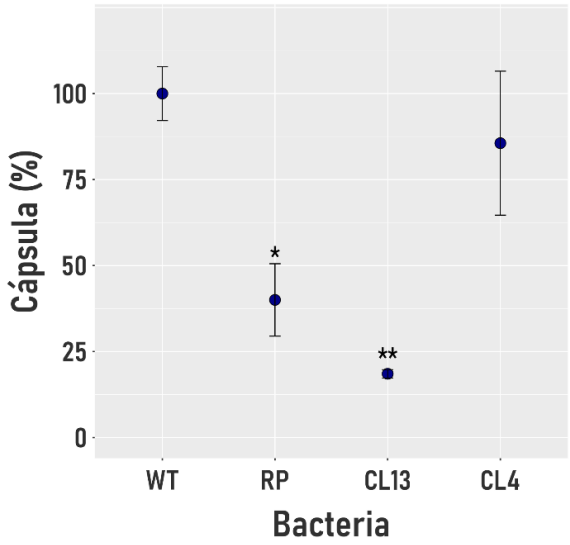


Figura 1.4. Cuantificación de cápsula mediante el método del ácido urónico. Los puntos azules muestran la media de tres réplicas técnicas, y las barras el SEM (n = 3) (* $p < 0.005$, ** $p < 0.001$, prueba t de Student frente a WT).

prueba t de Student frente a WT), y 18.53 ± 1.21% ($p < 0.001$, prueba t de Student frente a WT), respectivamente. Estos resultados, si bien no coinciden exactamente con los niveles de resistencia, dado que RP muestra una resistencia mayor que CL13, sí que sugieren una tendencia clara: la presencia de cápsula se asocia a una mayor susceptibilidad al fago, mientras que la acapsularidad se relaciona con una mayor resistencia.

Por último, se evaluó la capacidad replicativa de Cap62 en los clones CL4 y CL13. No obstante, no se evaluó en RP, ya que la concentración basal del fago en este cultivo es demasiado alta para permitir su cuantificación. Los resultados demostraron que, mientras Cap62 puede alcanzar títulos de $2.16 \times 10^8 \pm 9.29 \times 10^6$ UFP/mL en el cultivo WT, en los clones resistentes el título viral fue significativamente más bajo, con una reducción de 0.65 $\log_{10}$ en CL4 ($p < 0.05$, prueba t de Welch frente a WT), y de 1.13 $\log_{10}$ en CL13 ($p < 0.001$, prueba t de Welch frente a WT) (**Figura 1.5**).

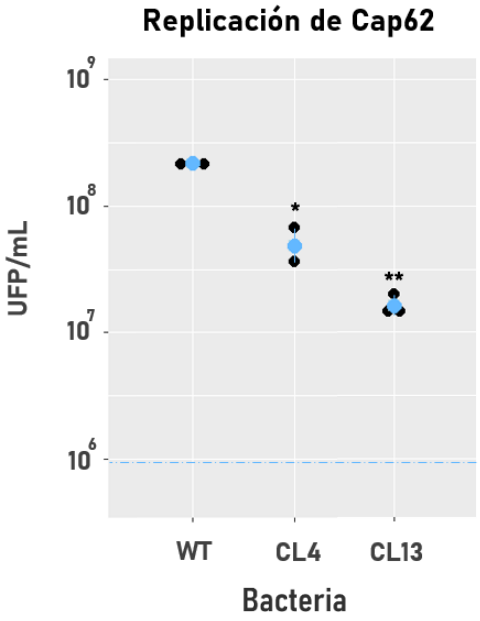


Figura 1.5. Capacidad replicativa de Cap62. Replicación de Cap62 (UFP/mL) en los clones resistentes CL4 y CL13, en comparación con el cultivo WT. La replicación de Cap62 en RP no pudo evaluarse debido a la elevada concentración de fago basal en la muestra. Los puntos negros indican los valores de tres réplicas biológicas por condición, el punto azul representa la media, y las barras verticales azules muestran el SEM (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.001, prueba t de Welch, frente a WT). La línea horizontal azul discontinua indica el título inicial de fago.

2.4 Implicación de moléculas de señalización en la pérdida de cápsula

Para profundizar en el mecanismo responsable de la resistencia, se evaluó si la pérdida de cápsula podía estar mediada por la comunicación intercelular. El objetivo era determinar si el entorno generado durante la infección, caracterizado por la presencia del fago, productos de lisis celular y potenciales moléculas de señalización,

podía inducir por sí mismo la transición fenotípica en células sensibles. Para ello, se hicieron crecer cultivos WT en fase exponencial utilizando medio condicionado obtenido de cultivos infectados, los cuales fueron previamente filtrados para garantizar la ausencia total de viriones activos. Este diseño permitió simular el ambiente extracelular del cultivo RP, evaluando el efecto de los factores secretados de forma aislada a la infección viral directa. El análisis microscópico no reveló cambios evidentes en la biosíntesis de cápsula, mostrando que las bacterias mantenían su fenotipo original (**Figura S1.1**).

3. Caracterización molecular de los cultivos resistentes a Cap62

3.1 Secuenciación y análisis genómico

Con el fin de comprender las bases moleculares de la resistencia, se realizó la secuenciación completa de los genomas bacterianos. Tras el filtrado de calidad de las lecturas, las correspondientes al cultivo WT fueron mapeadas frente al genoma de referencia presente en las bases de datos (número de acceso del proyecto: CABDWB000000000). Mediante esta aproximación se consiguió reconstruir el cromosoma bacteriano completo (5042546 pb; 99.17% total del genoma; cobertura promedio de 213.37 ×), así como uno de los plásmidos bacterianos (100261 pb; 100% del plásmido; cobertura promedio: 182.23 ×). Para favorecer el ensamblaje de otros plásmidos y de posibles regiones no mapeadas, las lecturas no alineadas con el genoma de referencia se ensamblaron *de novo* empleando SPAdes y plasmidSPAdes. Sin embargo, solo se obtuvieron *contigs* de baja fiabilidad (longitud < 250 pb, baja cobertura, y alto contenido en repeticiones). Análisis posteriores con BLASTn

revelaron que la región del cromosoma no cubierta por las lecturas de la muestra WT correspondía a un profago distinto al presente en la cepa de referencia (CABDWB000000000), aunque localizado en la misma posición. Esta diferencia se confirmó mediante un ensamblaje *de novo* de las lecturas de WT.

Para evaluar la presencia de cambios polimórficos en el genoma de los cultivos resistentes, se mapearon las lecturas frente al genoma recién ensamblado del cultivo WT y se hizo un análisis de variantes utilizando tres herramientas (Snippy, LoFreq y Breseq). Tras descartar aquellas mutaciones también presentes en la muestra WT, únicamente se identificó una mutación en el gen *rfaH*, detectada de forma consistente por los tres predictores en el clon CL13 (**Tabla 1.2**). Además, para analizar variaciones estructurales también se empleó Breseq, que no detectó ningún cambio respecto al cultivo WT en ninguno de los tres cultivos resistentes.

Tabla 1.2. Predicción de la mutación en el gen *rfaH* en el clon CL13. Se presentan los resultados obtenidos con los tres predictores de variantes (Snippy, LoFreq, y Breseq).

Predictor	Localización	Posición (pb)	Variante	Frec. (%)	Profundidad
Snippy	Cromosoma	4719068	del (GTT)	100	145
LoFreq	Cromosoma	4719068	del (GTT)	100	182
Breseq	Cromosoma	4719068	del (GTT)	100	192

3.1.1 Análisis de frecuencias alélicas en el cultivo RP

Si bien el fenotipo acapsular y resistente de CL13 podría ser debido a la mutación observada en *rfaH*, resultó inesperada la ausencia de mutaciones consistentes en la muestra RP. Este hallazgo es especialmente llamativo dado que dicho cultivo presenta un fenotipo claramente acapsular y el perfil de resistencia más elevado. Por ello, se decidió realizar un análisis en mayor profundidad comparando las frecuencias alélicas a lo largo de todo el genoma entre la muestra WT y la muestra RP, aplicando un análisis de tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés), con el fin de detectar diferencias significativas entre ambas poblaciones. Este análisis reveló que solo 12 loci presentaban diferencias significativas en la frecuencia alélica ($|\Delta AF| \geq 0.05$, $q < 0.05$, prueba exacta de Fisher con corrección FDR) (**Figura 1.6** y **Datos S1.2**). Dichas variaciones se localizaban en apenas 7 genes, la mayoría de ellos asociados a regiones repetitivas complejas, como transposasas e intrones. Además, aunque las diferencias en las frecuencias eran estadísticamente significativas, no superaron el 19% en términos absolutos para ninguno de los casos, lo cual sugiere que es improbable que estas variaciones constituyan la causa única o principal del fenotipo resistente.

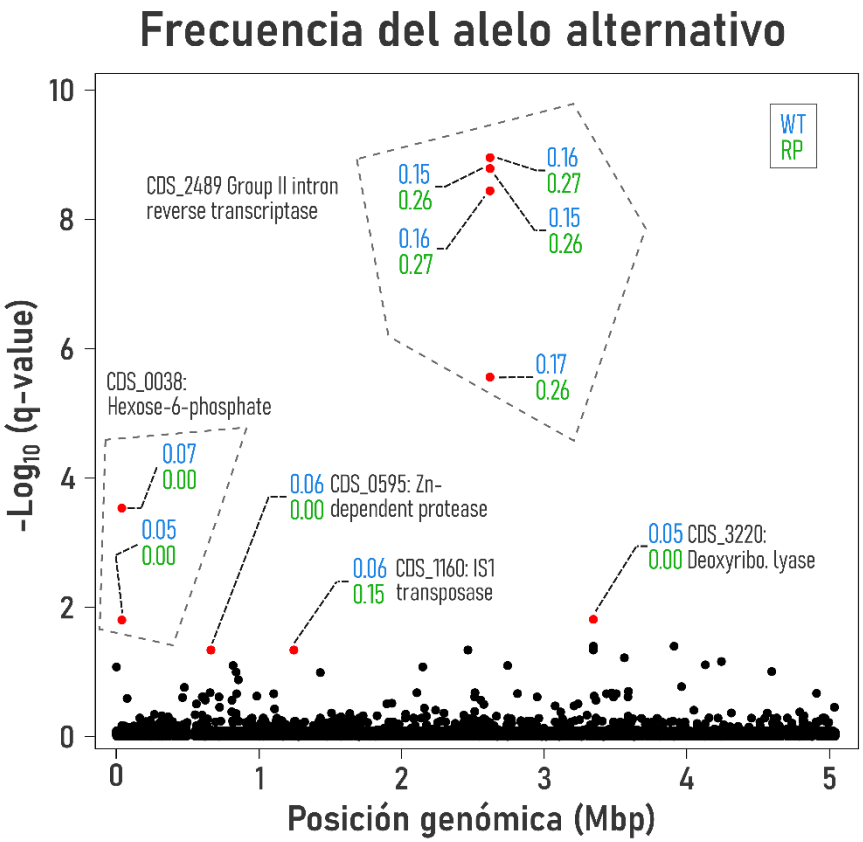


Figura 1.6. Comparación de la frecuencia de nucleótidos alternativos entre WT y RP. Cada punto representa el valor *q* obtenido en un análisis de tasa de falsos descubrimientos (FDR). Los puntos rojos indican valores $q < 0.05$. Para cada posición significativa se especifica el gen correspondiente y su secuencia codificante (CDS). Los valores en azul representan la frecuencia de nucleótidos alternativos en WT, mientras que los valores en verde corresponden a RP. Las líneas grises discontinuas agrupan posiciones dentro de un mismo gen.

3.1.2 Mutación en *rfaH* en CL13

La mutación detectada en CL13 consistió en una deleción de tres nucleótidos (GTT) que conllevaba la pérdida de la valina localizada en

la posición 26 de la proteína, dentro de la región N-terminal. La proteína RfaH es un factor de elongación de la transcripción implicado en la biosíntesis de polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y otros factores de virulencia. Su mecanismo de acción se basa en la interacción, por un lado, con el complejo ARN polimerasa, y por otro con secuencias específicas del ADN, evitando así la terminación prematura de la transcripción. En particular, su dominio N-terminal es el encargado de reconocer la señal *ops* (operón supresor de la polaridad) en el ADN. Esta secuencia actúa como un sitio de pausa donde, en ausencia de RfaH, se produce el cese de la transcripción. La predicción de la estructura terciaria reveló que la deleción de *rfaH* en CL13 provoca un acortamiento en la hélice α de la región N-terminal (**Figura 1.7**), lo que podría comprometer la interacción con la señal *ops* y explicar el fenotipo acapsular observado.

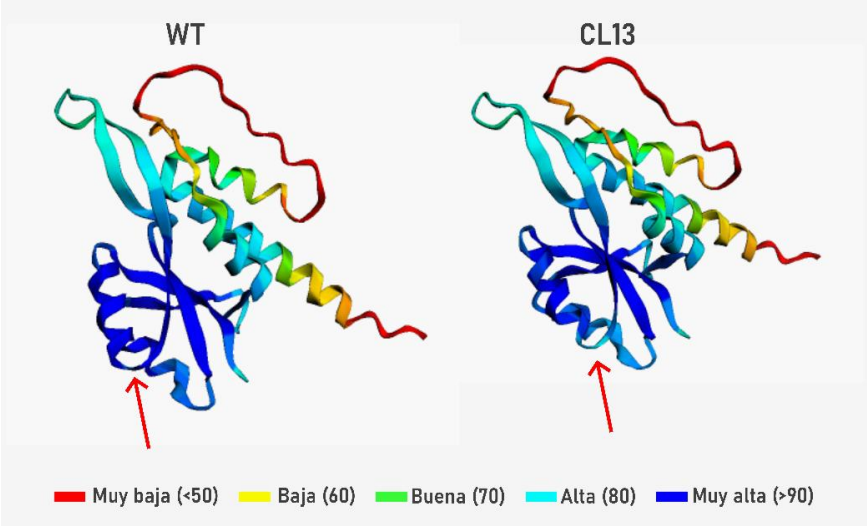


Figura 1.7. Estructura terciaria de la proteína RfaH. Estructuras predichas por AlphaFold de RfaH en el cultivo WT y en el clon CL13 (deleción de Val26 en el extremo N-terminal). Los colores indican los valores de confianza

pLDDT (del inglés, *predicted Local-Difference Distance Test*). La flecha roja señala la región afectada por la mutación.

3.2 Análisis transcriptómico de los cultivos

Con el objetivo de identificar genes potencialmente implicados en el fenotipo resistente en ausencia de mutaciones, especialmente dado el fenotipo acapsular y altamente resistente de RP, se llevó a cabo la secuenciación del ARN total de cada cultivo. Tras el filtrado de calidad, las lecturas se mapearon frente al genoma WT y se obtuvieron los recuentos de expresión génica para cada muestra.

El análisis de componentes (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) mostró que los cultivos WT y CL4 formaban grupos claramente separados e independientes, mientras que RP y CL13, aunque con una mayor dispersión, tendían a agruparse entre sí (**Figura.1.8.A**). El análisis en mayor profundidad de los genes con mayor contribución a la varianza, junto con la clusterización jerárquica de los perfiles de expresión, confirmó esta tendencia: RP y CL13 se relacionan más entre sí, al igual que WT y CL4, en concordancia con sus fenotipos acapsular y capsular, respectivamente, y su nivel de resistencia (**Figura 1.8.B** y **Datos S1.3**)

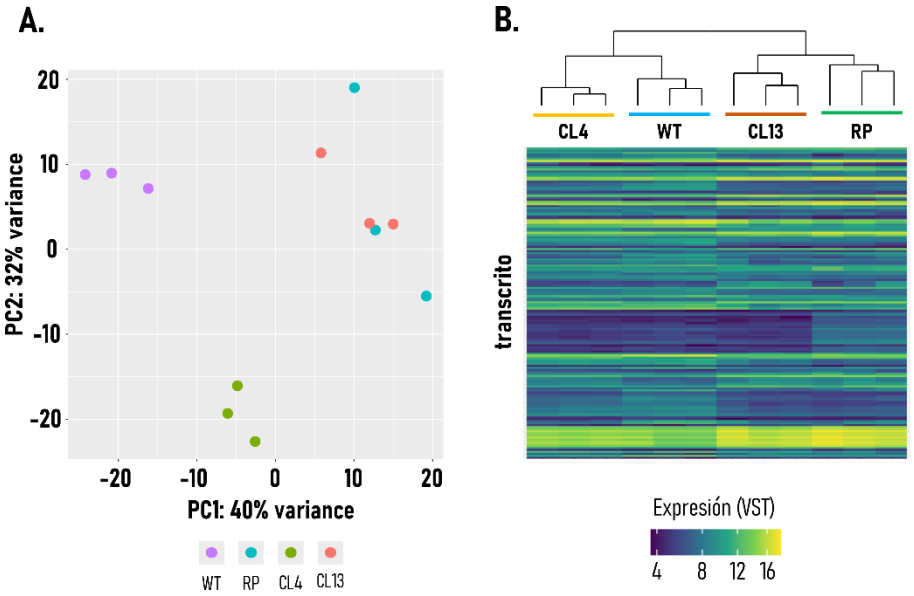


Figura 1.8. Análisis transcriptómico comparativo de los cultivos WT, RP, CL4 y CL13. A. Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles de expresión génica. **B.** Mapa de calor de los genes diferencialmente expresados $|Log_2FC| > 2$, $q \leq 0.05$). Los colores indican valores de expresión normalizados mediante la transformación estabilizadora de la varianza (VST), y la clusterización jerárquica reflejando la relación entre perfiles transcriptómicos.

3.2.1 Análisis de expresión diferencial

Para profundizar en el estudio de la respuesta transcripcional, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial de los cultivos RP, CL4 y CL13, en comparación con el cultivo WT (**Figura 1.9.A y Datos S1.4**). Los resultados mostraron que un número relativamente bajo de genes presentó una expresión diferencial marcada ($|Log_2FC| > 3$), con un rango de 17 a 20 transcritos por cultivo (**Figura 1.9.B**). Este número aumentó sustancialmente al considerar cambios más moderados

($|Log_2FC| > 2$), alcanzando entre 113 y 124 transcritos, y entre 254 y 282 para $|Log_2FC| > 1.5$.

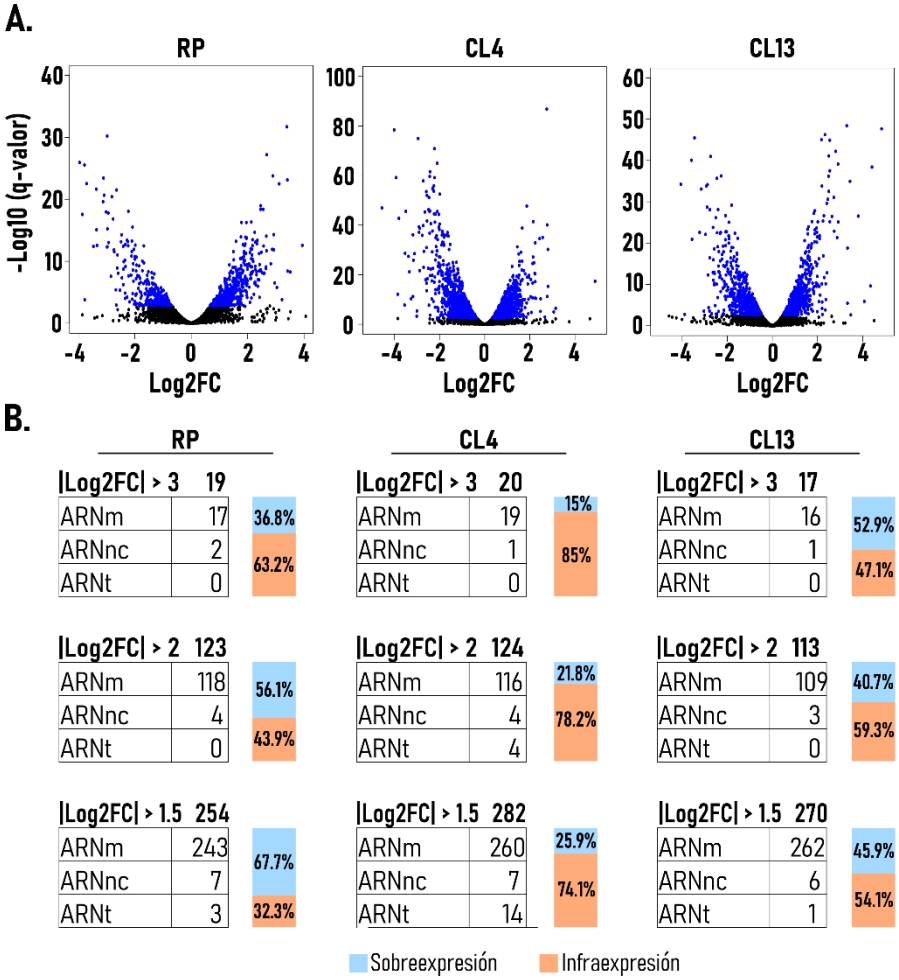


Figura 1.9. Análisis de la expresión diferencial de ARN en los cultivos RP, CL4 y CL13 respecto al cultivo WT. A. Gráfico de volcán de los genes diferencialmente expresados (-Log10 (q-valor)) y el cambio en expresión génica (Log_2FC). En azul se representan los genes con diferencias significativas (*q-valor* < 0.05). **B.** Número de transcritos codificantes (ARNm), no codificantes (ARNnc) y de transferencia (ARNt) con $|Log_2FC| > 3$, $|Log_2FC| > 2$ y $|Log_2FC| > 1.5$. Los porcentajes totales de transcritos sobreexpresados (en azul) e infraexpresados (naranja) se indican para cada cultivo en comparación con WT.

En todos los casos, la mayor parte de los transcritos correspondieron a ARN mensajero (ARNm). No obstante, ya entre los genes con mayor cambio de expresión ($|Log_2FC| > 3$) se detectó al menos un ARN no codificante (ARNnc), cifra que aumentó hasta 7 ARNnc para valores $|Log_2FC| > 1.5$. Además, mientras que en CL4 se observaron transcritos de ARN de transferencia (ARNt) diferencialmente expresados a partir de $|Log_2FC| > 2$, en RP y CL13 estos aparecieron únicamente para valores de $|Log_2FC| > 1.5$.

CL4 se caracterizó por una clara tendencia a la infraexpresión en todos los umbrales analizados, con entre un 74.1% y un 85% de los transcritos mostrando una reducción de su expresión respecto al cultivo WT. En contraste, en los cultivos RP y CL13 los cambios en la expresión génica fueron más heterogéneos, sin evidenciar una tendencia predominante hacia la sobreexpresión o la infraexpresión.

Para evaluar el impacto de la expresión diferencial en los fenotipos de los cultivos bacterianos se cuantificó el porcentaje de transcritos perteneciente a las categorías COG (Clúster de Genes Ortólogos). En primer lugar, se consideraron los transcritos con $|Log_2FC| > 1.5$ respecto del WT (**Figura 1.10, barras**), lo que proporcionó una visión global del perfil transcriptómico. En todos los cultivos, la mayoría de los transcritos no estaban asignados a una categoría COG. Entre los transcritos clasificados, destacaron los asociados a la traducción y al metabolismo de iones inorgánicos en RP, al metabolismo de carbohidratos y lípidos en CL4, y al metabolismo de aminoácidos e iones inorgánicos en CL13. Sin embargo, esta aproximación más amplia podía enmascarar la contribución de genes con cambios de expresión mayores.

Por ello, se evaluaron los transcritos con $|Log_2FC| > 3$ (**Figura 1.10, asteriscos**). En este caso, el número de categorías COG con transcritos diferencialmente expresados se redujo drásticamente (únicamente 7-10 categorías por cultivo), permitiendo identificar focos más claros de expresión diferencial. En RP muchos de los transcritos no se asignaron a ninguna categoría (30%), pero de entre los clasificados, predominaron genes relacionados con energía (20%), aminoácidos (15%), coenzimas (10%) y algunos con función general (10%). De forma similar, en CL13, de entre los transcritos clasificados, destacaron los relacionados con aminoácidos (22.22%), algunos con función general (11.11%), y otros relacionados con el metabolismo de carbohidratos (5.56%), energía (5.56%), lípidos (5.56%), transducción de señales (5.56%) y transcripción (5.56%). En CL4, el cambio en expresión más sustancial se concentró en lípidos (20%) y transcripción (20%), seguida de energía (15%), carbohidratos (15%) y aminoácidos (10%).

En conjunto, este análisis revela que, mientras el perfil global ($|Log_2FC| > 1.5$) refleja cierta heterogeneidad, los cambios más acusados ($|Log_2FC| > 3$) se concentran en funciones centrales como la obtención y conversión de energía, y el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, sugiriendo que la remodelación transcripcional en estos cultivos no es aleatoria, sino que apunta a rutas metabólicas clave.

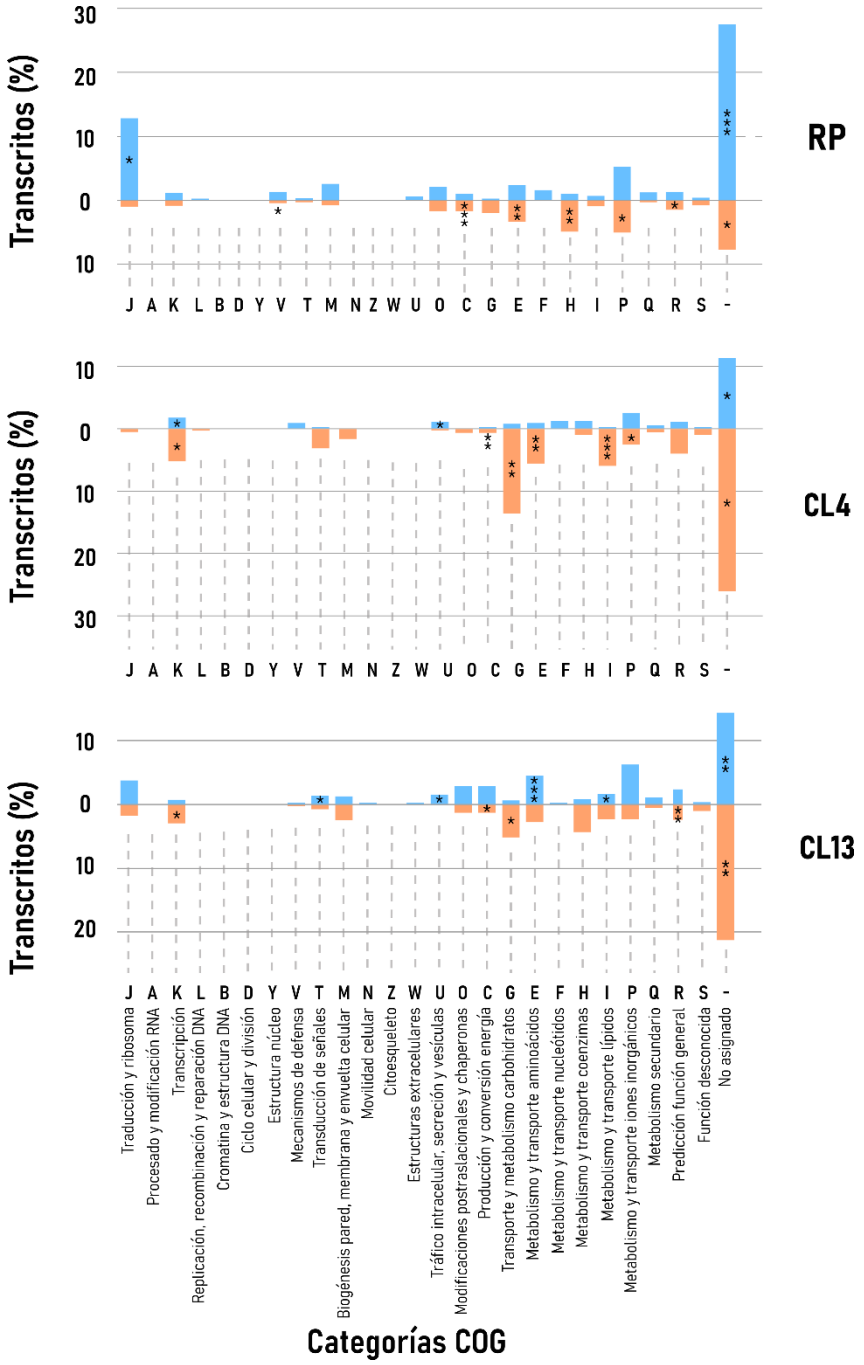


Figura 1.10. Distribución funcional de los genes diferencialmente

expresados según categorías COG (Clústers de Genes Ortólogos). Se muestra el porcentaje (%) de transcritos asignados a cada categoría funcional en los cultivos RP, CL4, y CL13 respecto al WT. Las barras indican la dirección del cambio: sobreexpresión (azul; $Log_2FC > 1.5$) o infraexpresión (naranja; $Log_2FC < -1.5$). Los asteriscos indican categorías que contienen transcritos con cambios de alta magnitud ($Log_2FC > 3$ o $Log_2FC < -3$), donde el número de asteriscos refleja la proporción de genes en cada categoría: * (> 0%); ** (> 10%); *** (> 20%).

3.2.2 Análisis de expresión génica en el clúster biosintético de la cápsula y genes relacionados

El análisis transcriptómico del clúster de genes implicados en la biosíntesis de cápsula (clúster *cps*) mostró una marcada tendencia a la infraexpresión en comparación con el cultivo WT (**Figura 1.11.A**). La primera unidad transcripcional del clúster *cps*, conformada por los genes *galF* y *PAP2*, mostró una sobreexpresión tanto en CL4 como en CL13 y RP ($Log_2FC > 0.95$, *q-valor* < 0.00001). Sin embargo, tanto la segunda como la tercera unidad transcripcional mostraron una considerable infraexpresión en los tres cultivos resistentes.

En el caso específico de CL13, la infraexpresión de la segunda unidad transcripcional refleja claramente la disrupción del gen *rfaH*. La mutación de este regulador impide la elongación eficiente, provocando una reducción progresiva de la transcripción a lo largo del operón capsular, tal y como se observa desde *wzc* hasta *wcaJ*, donde los valores de expresión alcanzaron niveles de $Log_2FC < -3.5$ (*q-valor* = 4.34×10^{-38}) (**Figura 1.11.A**). Asimismo, los valores de expresión de la tercera unidad transcripcional en CL13 fueron los más bajos de los tres cultivos resistentes, alcanzando valores de $Log_2FC < -1.80$ (*q-valor* = 7.65×10^{-28}) para *manC* en comparación con el WT.

En el caso de RP y CL4 el escenario resultó más complejo. En ambos cultivos, la expresión de los genes de biosíntesis de cápsula fue significativamente inferior a la del WT. Esto, podría explicar el fenotipo acapsular de RP, pero no de CL4, que mantiene la cápsula. De hecho, paradójicamente, la expresión de genes como wza y wzc en CL4 fue incluso significativamente inferior a la de RP ($Log_2FC < -1.1$, *q-valor* < 0.001) (**Figura 1.11.A**). El único gen con una expresión significativamente inferior en RP que en CL4, que pueda explicar la diferencia en fenotipo, es manC ($Log_2FC < -0.8$, *q-valor* < 0.0005), localizado en la tercera unidad transcripcional. Adicionalmente, al analizar los reguladores transcripcionales implicados en la síntesis de CPS, se observó que *iscR* presentaba una infraexpresión significativa en RP respecto a CL4 ($Log_2FC < -1.1$, *q-valor* < 0.005) (**Figura 1.11.B**), lo cual también podría contribuir a explicar la diferencia fenotípica observada. Por el contrario, el análisis del regulador de hipermucoviscosidad *rmpA* mostró una sobreexpresión significativa en RP respecto a CL4 ($Log_2FC < 2.25$, *q-valor* < 9.58×10^{-16}) (**Figura 1.11.B**).

Sin embargo, más allá del clúster biosintético de la cápsula, el análisis diferencial destacó la notable infraexpresión del operón *glpABC* en el cultivo RP. Los genes *glpC* y *glpB* se posicionaron como el segundo y tercer gen con mayor diferencia de expresión de todo el transcriptoma de RP ($Log_2FC < -3.9$, *q-valor* < 1.40×10^{-23}), y el gen *glpA* ocupó el sexto lugar ($Log_2FC = -3.7$, *q-valor* < 1.54×10^{-20}). Por el contrario, en CL4 sus niveles mantuvieron comparables al WT (**Figura 1.11.C**). Este operón participa en el catabolismo anaerobio

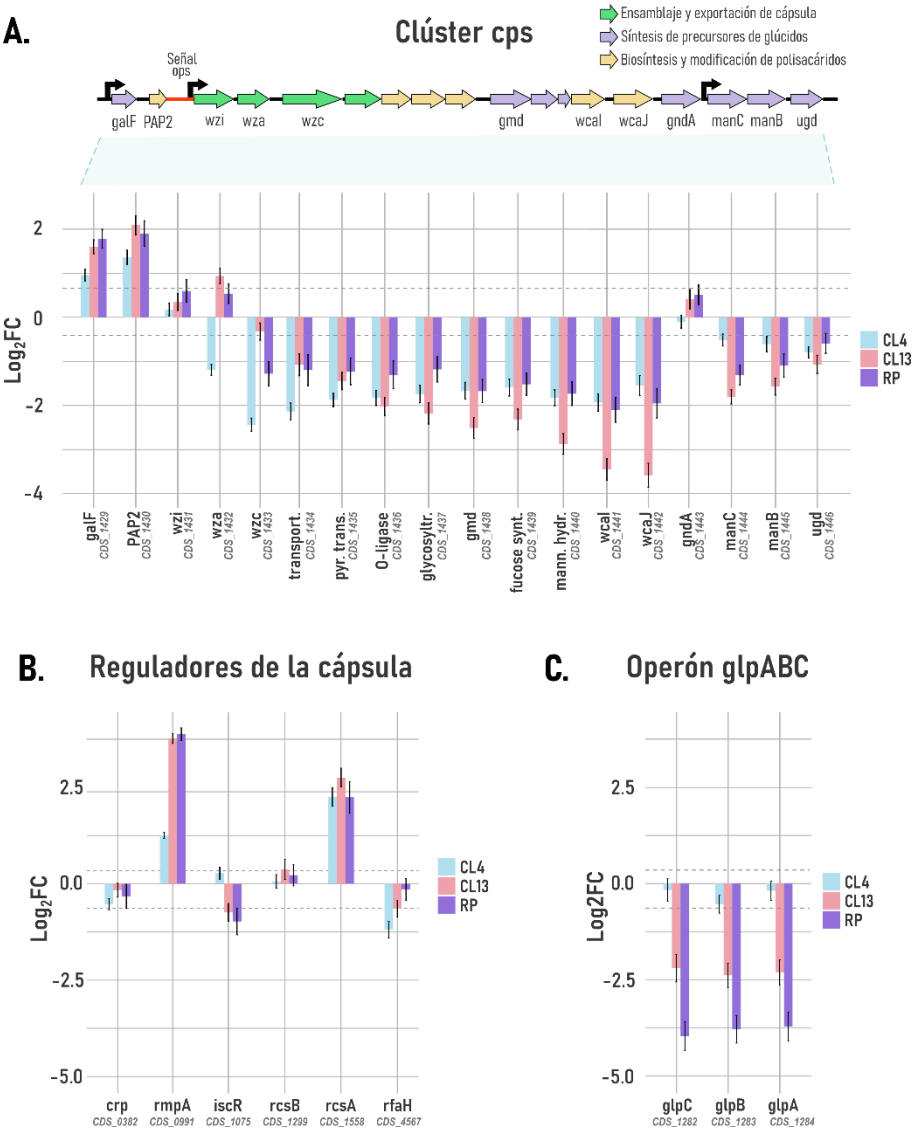


Figura 1.11. Perfil de expresión de genes relacionados con la síntesis de cápsula. A. Genes del clúster biosintético de cápsula. Se muestra un esquema del operón capsular de la cepa K1. Las barras muestran los valores de expresión (Log_2FC) de los genes (nombre y CDS) relativos al cultivo WT. Las barras de error indican el error estándar del Log_2FC (n = 3). Los valores de expresión situados por debajo de la línea discontinua no son

estadísticamente significativos (*q-valor* > 0.05). **B.** Expresión de algunos reguladores de la biosíntesis de cápsula. **C.** Expresión del operón del catabolismo anaeróbico del glicerol (*glpABC*).

del glicerol, y su desregulación en RP podría contribuir a un estado energético reducido que limite la síntesis de estructuras costosas, como la cápsula, favoreciendo así el fenotipo acapsular observado en este cultivo.

3.2.3 Análisis de expresión génica en el clúster biosintético del antígeno O del LPS

De manera análoga al estudio del clúster *cps*, se analizó la expresión de los genes implicados en la biosíntesis del LPS, al tratarse de otra estructura de superficie esencial y un factor de virulencia clave en patógenos gramnegativos. El clúster biosintético del núcleo (*core*) del LPS no mostró alteraciones en su expresión respecto al cultivo WT (**Figura 1.12.A**). Sin embargo, resulta destacable que el clúster del antígeno O, localizado inmediatamente aguas abajo del locus *cps*, sí exhibió una sobreexpresión significativa en CL4 y, más acusadamente, en RP. En este último, se alcanzaron valores de $Log_2FC > 1.50$ (*q-valor* = 1.67×10^{-5}) para el gen *rfbA* (**Figura 1.12.B**), que codifica una proteína de transporte del antígeno O. Por el contrario, el clon CL13 mostró un perfil de expresión opuesto, con una marcada infraexpresión de diversas glicosiltransferasas localizadas en las proximidades del operón del antígeno O, alcanzando valores de $Log_2FC < -2$ (*q-valor* = 2.71×10^{-25}). Estas diferencias en los niveles de expresión sugieren la existencia de distintas conformaciones del LPS entre los distintos cultivos resistentes.

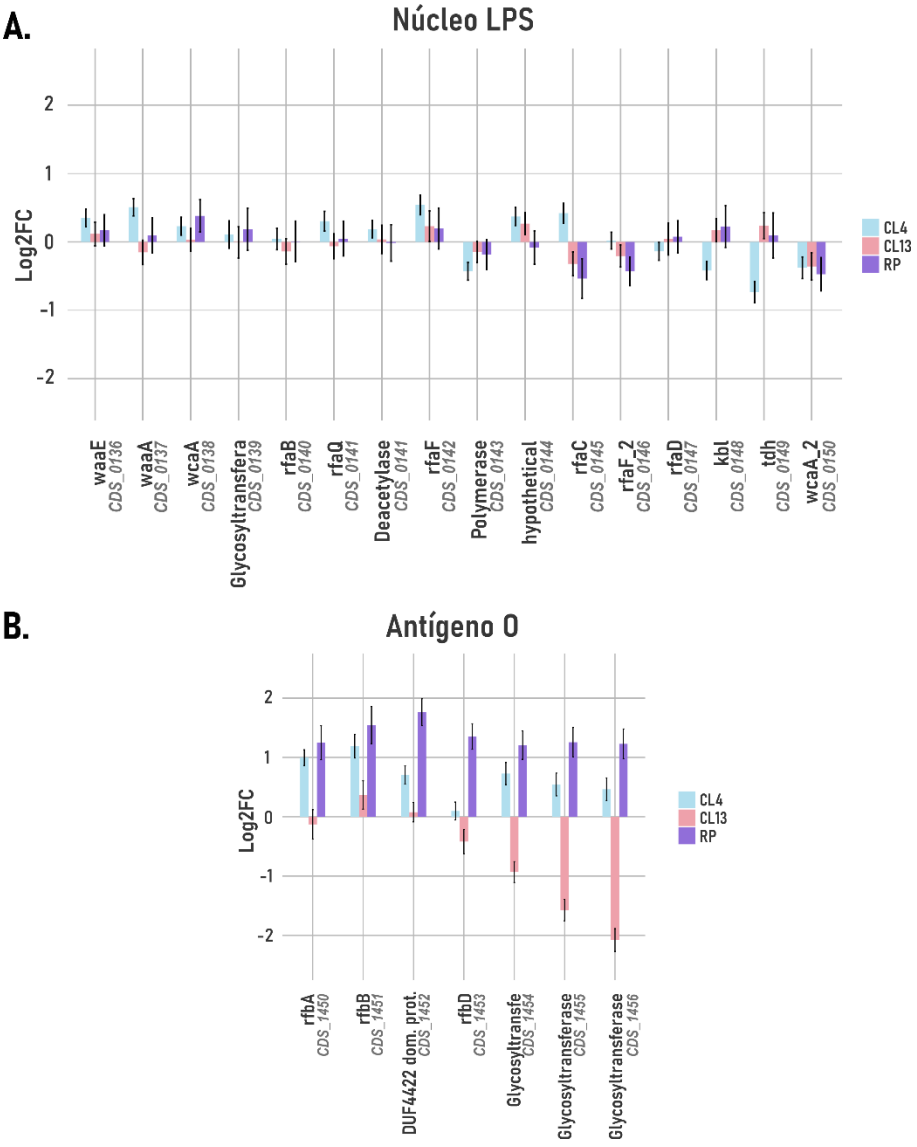


Figura 1.12. Perfil de expresión de genes implicados en la biosíntesis de lipopolisacárido (LPS). A. Expresión de genes del clúster biosintético del núcleo del LPS. **B.** Expresión de genes del clúster biosintético del antígeno O. Las barras muestran los valores de expresión (Log_2FC) de los genes (nombre y CDS) relativos al cultivo WT. Las barras de error indican el error estándar del Log_2FC (n = 3).

3.2.4 Análisis de expresión génica de otros clústers de genes con cambios de expresión

Al analizar los 17 – 20 transcritos con un cambio en la expresión génica de $|Log_2FC| > 3$ (**Figura 1.10**), se observó que pertenecían a diversos clusters metabólicos, con alteraciones particularmente marcadas en el cultivo RP.

Uno de los más destacados fue el cluster de biosíntesis de vitamina B_{12}, que presentó una clara desregulación en RP y CL13 (**Figura S1.2**), alcanzando valores en RP de hasta $Log_2FC = -3.37$ (*q-valor* = 1.04×10^{-19}). Se ha descrito que algunas proteínas asociadas al transporte de vitamina B_{12} también pueden actuar como receptores de fagos, lo que sugiere que esta desregulación podría estar relacionada, directa o indirectamente, con las diferencias en susceptibilidad a fagos observadas entre RP y CL4, más allá del papel de la cápsula.

Asimismo, se detectaron alteraciones en rutas de metabolismo de aminoácidos y compuestos nitrogenados. En RP, genes del metabolismo de la lisina como *pTR2* y *cadA* presentaron una fuerte infraexpresión ($Log_2FC < -3$, *q-valor* < 2×10^{-21}) (**Figura S1.2**). De manera similar, genes relacionados con el metabolismo del nitrato, como *narI*, mostraron una notable reducción de la expresión en CL13, y de forma aún más pronunciada en RP ($Log_2FC = -3.36$, *q-valor* = 1.38×10^{-13}). También se observaron cambios en genes vinculados a la adquisición de hierro y transporte de metales, incluyendo operones relacionados con molibdeno y zinc (**Figura S1.2**).

Finalmente, se evaluaron los ARNnc con cambios de expresión diferencial $|Log_2FC| > 1.5$ (**Figura 1.10**). Entre ellos destacaron *t44*

($Log_2FC > 3.41$, *q-valor* = 4.76×10^{-21}), de función desconocida, y *ryhB* ($Log_2FC > 3.94$, *q-valor* = 2.52×10^{-11}) (**Figura S1.2**), cuya expresión se ha asociado con la regulación de la cápsula mediada por la proteína Fur. Aunque *ryhB* mostró niveles elevados en RP, también lo hizo en CL4 y CL13 en comparación con el WT, lo que no se corresponde directamente con los fenotipos observados. No obstante, estudios previos sugieren que *ryhB* puede estar vinculado a estados de persistencia en bacterias resistentes a antibióticos, lo que abre nuevas hipótesis sobre su posible papel en la resistencia a fagos.

Capítulo 2. Diseño y caracterización de combinaciones de fagos para el control de la resistencia en *K. pneumoniae*

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en:
Mora-Quilis, L., Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2025). Phenotypic Heterogeneity Shapes Phage Resistance and Cocktail Efficacy in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, e02261-25. https://doi.org/10.1128/spectrum.02261-25

Mora-Quilis, L., & Domingo-Calap, P. (2025). Single-Cell Sorting to Assess Phage Sensitivity in Heterogeneous Bacterial Populations. En *Single-Cell Omics in Microbiome Research: Exploring Microbial Diversity Across Ecosystems* (pp. 125-135). Cham: Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-032-07527-7_8

En este capítulo exploramos el aislamiento y caracterización de nuevos fagos con actividad lítica frente a las variantes resistentes a Cap62. Evaluamos su potencial para retrasar la aparición de resistencias mediante su acción combinada con Cap62, y analizamos la dinámica fago-hospedador para comprender las bases del proceso.

1. Aislamiento de fagos contra cultivos resistentes a Cap62

El aislamiento de los nuevos fagos se llevó a cabo a partir de muestras de aguas residuales, que fueron incubadas junto con los cultivos resistentes a Cap62 (**Figura 2.1**). Usando el clon acapsular CL13 se aislaron los fagos CuaMUT1 y CuaMUT2, mientras que a partir del clon capsular CL4 se aislaron los fagos CuaREV1 y CuaREV2.

De manera totalmente novedosa, empleamos el cultivo RP, que mantiene la presencia del fago Cap62, para aislar fagos capaces de infectar la población con resistencia fenotípica. Esta estrategia permitió aislar los fagos CuaHET1 y CuaHET2. Debido a la coexistencia de Cap62 en la muestra, la purificación de los nuevos fagos requirió una selección diferencial; es decir, la búsqueda de una cepa refractaria a la infección por Cap62, pero sensible a los nuevos fagos aislados. La cepa de *K. pneumoniae* K60, permitió segregarlos eficazmente y constituyó su hospedador para la amplificación.

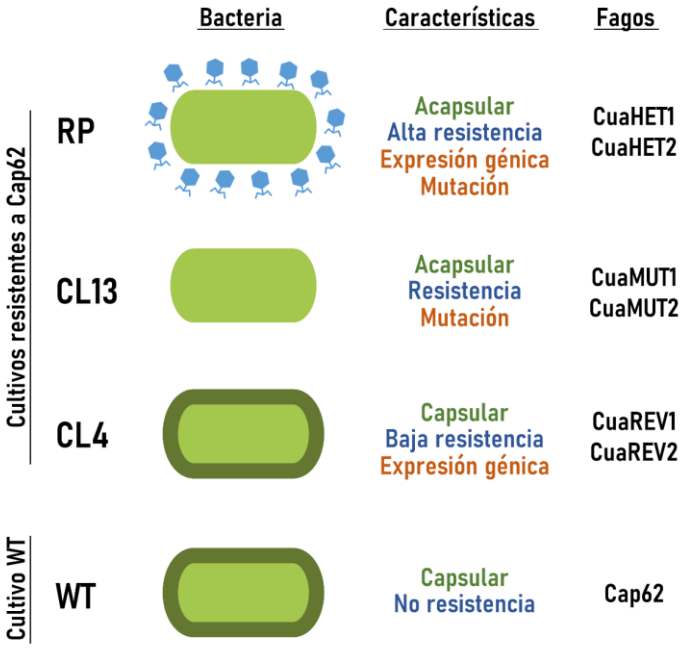


Figura 2.1. Cultivos bacterianos empleados para el aislamiento de nuevos fagos. Esquema ilustrativo de los cultivos bacterianos empleados para el aislamiento de nuevos fagos (cultivo WT y cultivos resistentes a Cap62: RP, CL13 y CL4). Las células bacterianas se representan en verde, con un contorno verde oscuro indicando la presencia de cápsula en el WT y en CL4. El fago azul presente en la población RP representa a Cap62, destacando su papel esencial en el mantenimiento del fenotipo acapsular. Se indican las características clave de cada cepa: presencia de cápsula (verde), grado de resistencia a Cap62 (azul) y tipo de resistencia (naranja). Además, se especifican los fagos aislados en cada una de ellas.

2. Caracterización genómica y taxonómica de los nuevos fagos

La secuenciación del genoma completo de los fagos reveló que los fagos CuaHET1, CuaHET2 y CuaMUT2 pertenecen al género *Jiaodavirus* (91.8 – 97.4% similitud intergenómica) (**Figura 2.2**, y **Figura S2.1**). Estos fagos presentan genomas relativamente grandes (166306 pb, 165914 pb, y 166709 pb, respectivamente) y contienen un elevado número de CDS (290, 287 y 298, respectivamente). Morfológicamente, presentan la clásica estructura de miovirus. Además, muy notablemente, los tres fagos codifican 15 genes de ARNt. Por su parte, el fago CuaMUT1 es el único perteneciente al género *Teetrevirus*, con un genoma de 37770 pb, 56 CDS y morfología clásica de podovirus. Finalmente, los fagos CuaREV1 y CuaREV2 pertenecen al género *Drulisvirus*, igual que el fago Cap62 (85.1 – 99.9% similitud intergenómica). Estos fagos presentan un genoma de 44025 pb y 44282 pb, respectivamente, y presentan 61 CDS y 62 CDS.

La predicción del tipo de ciclo viral mediante BACPHLIP determinó que todos los genomas presentaban un estilo de vida lítico (predicción del 96.2 - 100%; **Tabla S2.1**). Además, utilizando las herramientas DepoScope, PhageDPO y DePP, se predijo que únicamente los fagos pertenecientes al género *Drulisvirus*, y el fago CuaMUT1 poseen genes con potencial actividad depolimerasa (**Tabla S2.2**). De entre ellos, los *Drulisvirus* presentan hasta tres proteínas con potencial actividad depolimerasa, de las cuales la *tail fiber protein* (CDS 007) ha sido previamente demostrada y confirmada como depolimerasa activa frente al tipo capsular K1 [90]. En contraste, CuaMUT1 presenta únicamente la CDS 046 como proteína con potencial actividad depolimerasa. Para profundizar en los

determinantes genéticos del rango de hospedador entre los fagos del género *Jiaodavirus*, comparamos sus proteínas estructurales. El análisis reveló que mientras que los fagos CuaHET1 y CuaHET2 codifican una *tail fiber protein* completa, y una supuesta adhesina (correspondientes a las secuencias CDS 0087 y 0088 en CuaHET1), el fago CuaMUT2 carece del gen de la adhesina y presenta un truncamiento en el dominio C-terminal de la *tail fiber protein*.

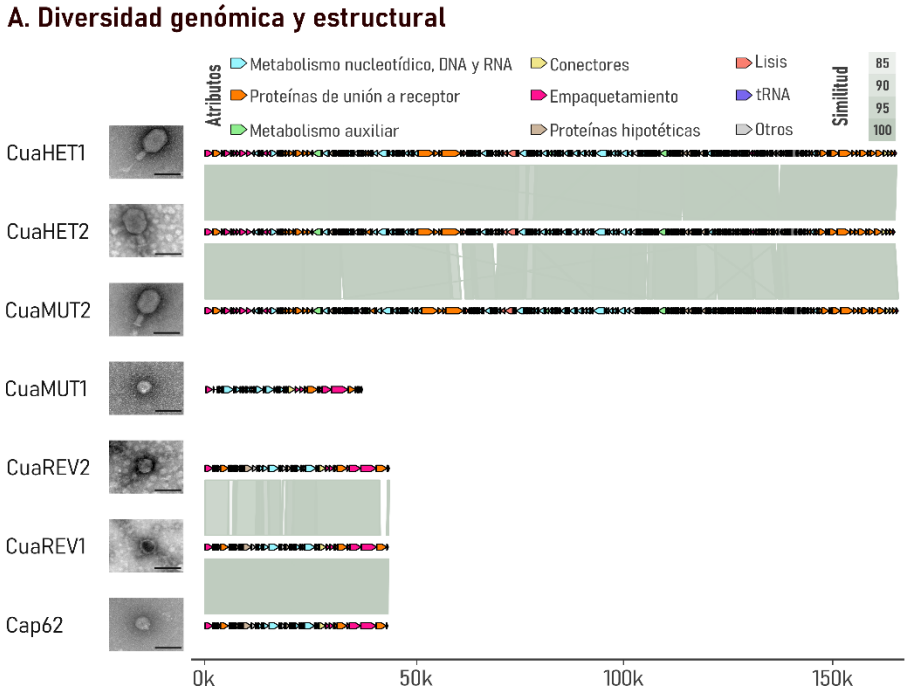


Figura 2.2. Diversidad genómica y estructural de los fagos. Izquierda: imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los fagos. La escala representa 100 nm. Derecha: Representación lineal de la organización genómica de los fagos. Las flechas representan CDS y están coloreadas según su grupo funcional. La escala de grises indica el porcentaje de similitud intergenómica. La escala genómica se muestra en pares de bases.

3. Propiedades infectivas de los nuevos fagos frente a cultivos resistentes a Cap62

3.1 Ensayos de rango de hospedador

Para determinar el rango de hospedador de los nuevos fagos y evaluar su potencial para controlar la aparición de resistencias, se analizó su capacidad de lisar los cultivos resistentes a Cap62 mediante ensayos de *spot* y de formación de placas de lisis (UFP) (**Figura 2.3**).

En general, ambos métodos ofrecieron resultados concordantes cuando la lisis fue clara. En los casos de lisis turbia, el *spot* mostró una mayor sensibilidad, detectando débiles positivos que no siempre se tradujeron en formación de placas. Los resultados muestran que todos los fagos infectan el hospedador del cual fueron aislados, pero que el rango de infección de los fagos no está estrictamente determinado por la similitud intergenómica. Por ejemplo; CuaHET1, CuaHET2 y CuaMUT2, aunque pertenecen al mismo género, presentan rangos distintos (lo cual podría deberse a las variaciones estructurales previamente descritas en sus proteínas de unión al receptor), mientras que CuaMUT1 y CuaMUT2, sin ningún tipo de similitud, infectan a la misma cepa. Además, cabe destacar que solo los *Drulisvirus* (CuaREV1, CuaREV2 y Cap62) mostraron capacidad para infectar los cultivos capsulares WT y CL4, lo que concuerda con la presencia de la *tail fiber protein* (CDS 007) con actividad depolimerasa frente a K1. CuaMUT1, sin embargo, a pesar de codificar una proteína con potencial actividad depolimerasa, no es capaz de infectar estos cultivos. Finalmente, a pesar de que los cultivos CL13 y RP muestran un fenotipo acapsular, su sensibilidad frente a fagos es distinta: mientras que CL13 es sensible a los fagos CuaMUT1 y CuaMUT2, el

cultivo RP es sensible a CuaHET1 y CuaHET2. Esto indica que, más allá del fenotipo acapsular, tienen que haber otras características que determinen la infección diferencial por estos fagos.

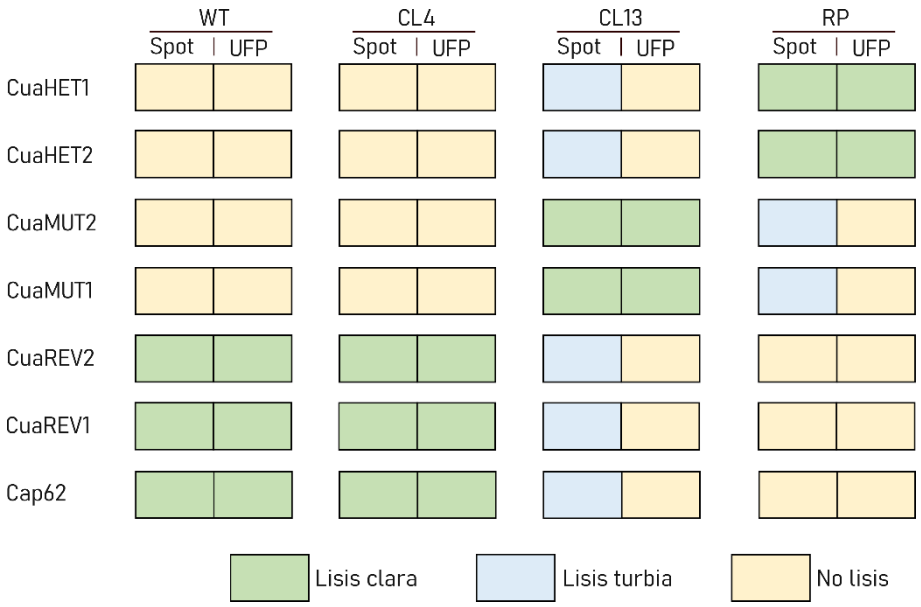


Figura 2.3. Rango de hospedador de los nuevos fagos. La actividad lítica se evaluó como la capacidad para la formación de *spots* o placas de lisis (UFP). El código de colores indica el resultado observado: verde (lisis clara), azul (lisis turbia), y amarillo (ausencia de lisis).

3.2 Capacidad para retrasar la aparición de las resistencias

Para evaluar el potencial de los nuevos fagos para retrasar la aparición de resistencias, cada uno de ellos se combinó con el fago Cap62 (MOI total = 0.5) y se midió su capacidad para inhibir el crecimiento del cultivo WT en medio líquido (**Figura 2.4**). El tiempo de

aparición de resistencias de cada cóctel se comparó con el observado para Cap62 en monoinfección.

Los cócteles compuestos por los fagos CuaREV1 o CuaREV2 con Cap62 no mejoraron el retraso en la aparición de resistencias, mostrando un efecto comparable al de Cap62 por sí solo ($p > 0.05$, ANOVA de un factor con post-hoc de Dunnett). Resulta interesante destacar que únicamente se observó un retraso en la aparición de resistencias cuando se combinó el fago Cap62 con fagos capaces de infectar cultivos acapsulares. Si bien el cóctel que contenía CuaMUT1 mostró solo una tendencia al retraso de la resistencia ($p = 0.09$), la combinación con CuaMUT2 la retrasó significativamente ($p < 0.01$). Sin embargo, el efecto más pronunciado se obtuvo con la combinación de CuaHET1 o CuaHET2 con Cap62 ($p < 0.001$), logrando retrasar la aparición de resistencias más de 8 horas respecto al cultivo no infectado. De forma destacable, aunque los fagos aislados de cultivos acapsulares (CuaHET y CuaMUT) no mostraron capacidad para lisar el cultivo WT por sí mismos, los fagos CuaREV sí que lo hicieron, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de rango de hospedador.

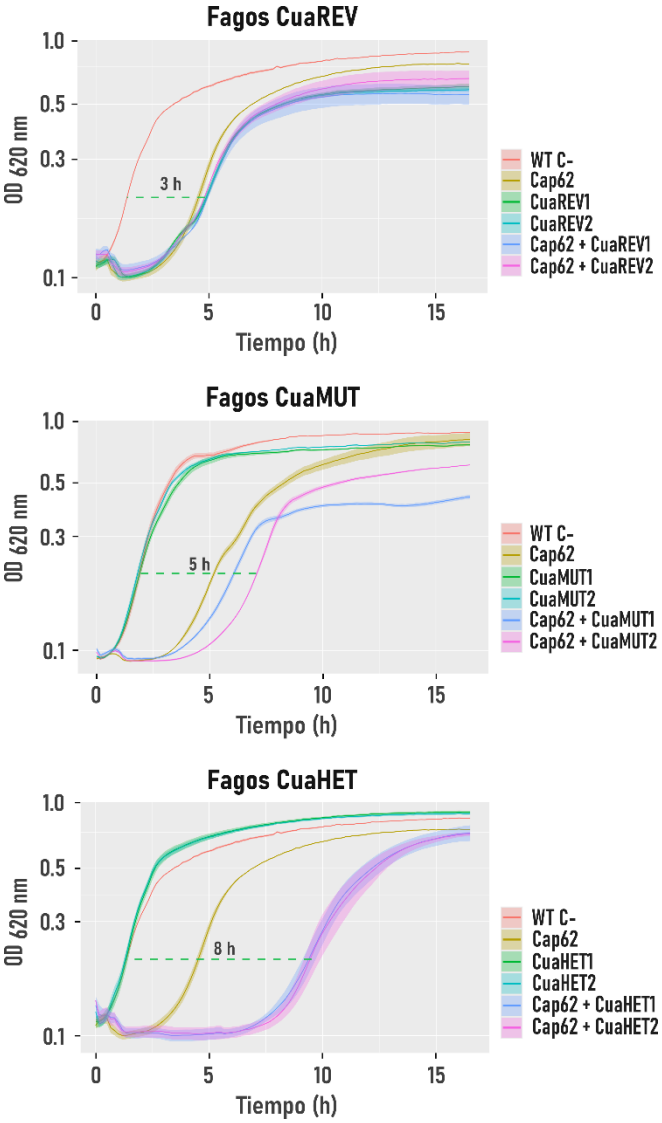


Figura 2.4. Eficacia de las combinaciones de fagos para retrasar la aparición de resistencias. Se midieron las curvas de crecimiento bacteriano por densidad óptica (OD 620 nm) durante 16 h. WT C- representa el crecimiento de bacteria sin fago, mientras que las demás condiciones muestran el crecimiento en presencia de un fago individual o de un cóctel de dos fagos (MOI total = 0.5). Las áreas sombreadas indican el SEM (n = 3).

4. Análisis del efecto complementario del cóctel de fagos mediante ensayos de célula única por citometría de flujo

Las curvas de infección mostraron que los cócteles de fagos retrasan la aparición de resistencias en comparación con la monoinfección por Cap62. Sin embargo, esto no parecía ser debido a un efecto aditivo, dada la incapacidad de los fagos CuaMUT y CuaHET para lisar el cultivo WT por sí solos. Para comprender el mecanismo subyacente, era necesario evaluar la susceptibilidad de las variantes resistentes frente a estos nuevos fagos. No obstante, la naturaleza reversible de la resistencia impedía comprobarlo, ya que la eliminación de Cap62 conlleva a la reversión al fenotipo WT. Por consiguiente, resultaba imposible discernir mediante el uso convencional de cultivos si la eficacia del cóctel se debía a la acción independiente de los fagos CuaMUT y CuaHET sobre la población resistente, o si, por el contrario, su actividad dependía estrictamente de la presencia de Cap62.

4.1 Diseño y desarrollo de la técnica

Para determinar si el retraso en la resistencia causado por el cóctel se debía a una coinfección estricta o a la acción independiente de los fagos sobre distintas poblaciones bacterianas, se diseñó una estrategia experimental basada en citometría de flujo con separación de células individuales. Esta técnica se basa en el aislamiento de células individuales, y en su exposición a distintos tratamientos, como la infección por fago. La separación por citometría de flujo permite aislar por completo las células bacterianas del fago presente en la muestra, y evaluar su susceptibilidad al nuevo fago antes de que las variantes acapsulares reviertan su fenotipo resistente. Para este

ensayo se seleccionó CuaHET1, uno de los fagos que en combinación con Cap62 mostró un mayor retraso en la aparición de resistencias.

La técnica parte del cultivo bacteriano que se desea analizar. En primer lugar, es necesario reducir al máximo la cantidad de fago libre presente en la muestra (si se da el caso, como en el cultivo RP). Para ello, el cultivo se somete a un mínimo de 5 lavados con PBS 1 × mediante centrifugación, procedimiento que permite disminuir la concentración de fago libre hasta aproximadamente 10^5 – 10^6 UFP/mL en *K. pneumoniae*. El cultivo lavado se resuspende en PBS 1 × y se pasa a través del citómetro de flujo para la separación de células individuales, que se distribuyen en placas de 96 pocillos; disponiendo una célula por pocillo (**Figura 2.5.A**). Cada placa contiene un tratamiento distinto: fago Cap62, fago CuaHET1, o el cóctel de ambos fagos, todos a una concentración mínima de 10^8 UFP/mL. Esta concentración elevada permite asegurar que cualquier célula que crezca tras la incubación sea resistente al tratamiento aplicado. Tras esto, las placas se incuban a 37 °C durante 48 h, y posteriormente se procede al recuento de pocillos en los que ha habido crecimiento bacteriano. Este recuento permite estimar la proporción de células resistentes a cada tratamiento, y en conjunto, proporciona una medida directa y cuantitativa de la heterogeneidad poblacional (**Figura 2.5.B**).

La correcta ejecución de esta técnica requiere la implementación de controles experimentales esenciales: (i) Es necesario confirmar que el citómetro es capaz de dispensar células individuales y no agregados. Para ello, además de evitar la selección de agregados celulares en base a los parámetros de dispersión lateral (SSC-H y SSC-A), se pueden depositar células en pocillos con LB y, de manera

inmediata, plaquear el contenido de cada pocillo en agar. Tras la incubación, cada pocillo debe originar 0 o 1 colonia, pero nunca más de dos, lo que confirmaría que no se están aislando dobles o agregados celulares. (ii) En cultivos que pueden contener fagos libres (como RP), es imprescindible determinar si el proceso de aislamiento arrastra partículas de fago junto con las células. Para verificarlo, se pueden depositar células individuales en pocillos que contengan una baja concentración de bacteria susceptibles al fago a analizar. Si durante el evento de aislamiento se arrastra fago residual, este replicará en la población sensible presente en el pocillo, y podría detectarse posteriormente mediante *spot* o plaqueo convencional. (iii) Control estadístico. Para distinguir la ausencia de crecimiento atribuible al tratamiento, de la causada por posibles fallos del citómetro en la dispensación o por falta de viabilidad celular, utilizamos la condición LB como referencia. La proporción de pocillos sin crecimiento en LB refleja el nivel basal de los fallos técnicos o células no viables. Esta proporción se compara con la observada en cada tratamiento mediante una prueba exacta de Fisher, evaluando diferencias en la frecuencia de crecimiento frente a no crecimiento.

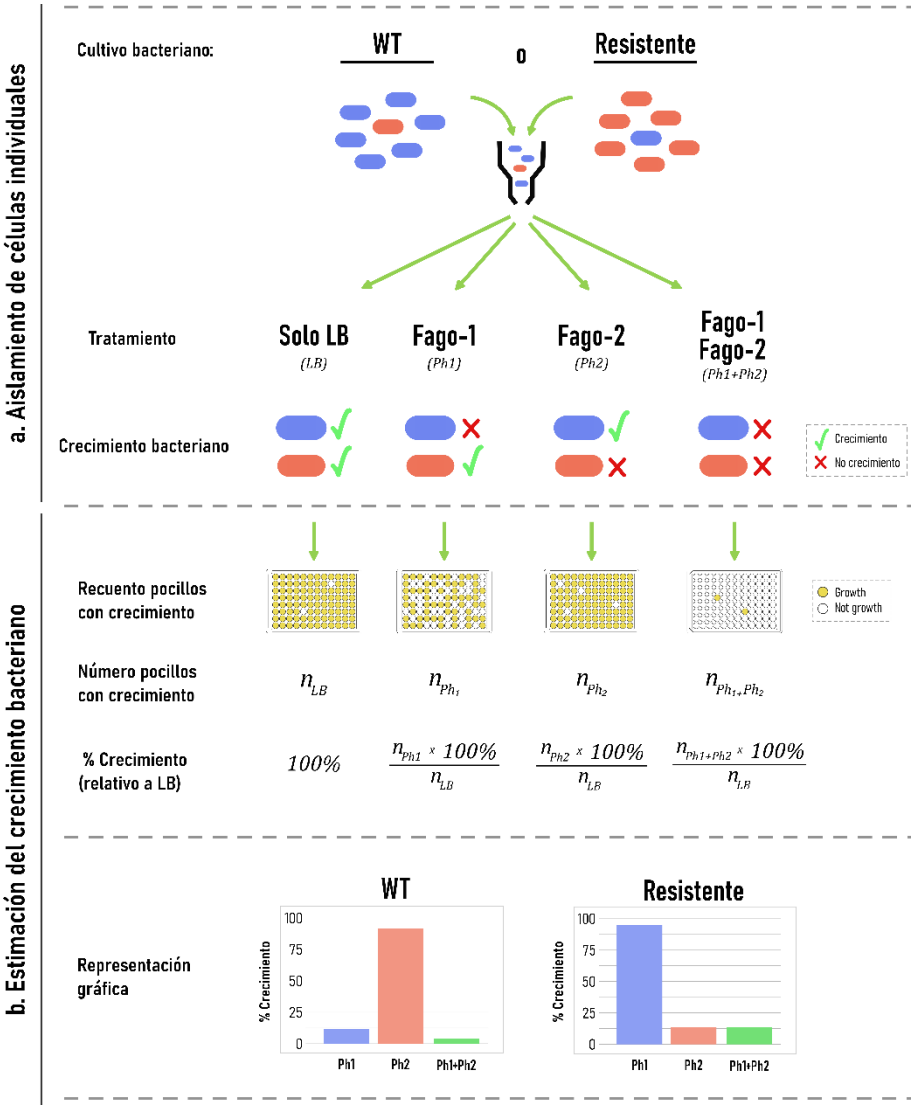


Figura 2.5. Protocolo de separación de células individuales para estimar la heterogeneidad de la población bacteriana. A. Representación esquemática del procedimiento de separación de células individuales, a partir del cultivo WT y del cultivo resistente, en pocillos que contienen distintos tratamientos y evaluando su viabilidad. Las variantes WT (azul) son susceptibles al Fago-1, mientras que las variantes resistentes (rojo) son susceptibles al Fago-2. Nótese que, mediante citometría de flujo, es posible

separar las células del cultivo resistente de cualquier partícula residual de Fago-1 presente en el medio. **B.** Recuento de pocillos con crecimiento bacteriano en placas con los distintos tratamientos. El número de pocillos con crecimiento en cada condición se expresa de forma relativa a la condición control con solo LB, considerada como el 100%.

4.2 Susceptibilidad de células individuales frente a los fagos Cap62 y CuaHET1

En primer lugar, se evaluó la susceptibilidad del cultivo WT a los fagos Cap62 y CuaHET1 a nivel de célula individual, con el objetivo de determinar si en la población original existen subpoblaciones con distinta susceptibilidad a fago (**Figura 2.6, izquierda**). Los resultados mostraron que el cultivo WT es mayoritariamente sensible a Cap62, con solo un 0.3% de pocillos con crecimiento, mientras que presenta una elevada resistencia frente a CuaHET1 (78.4%). En la condición de cóctel no se detectó crecimiento (0%), lo que indica que las variantes resistentes simultáneamente a ambos fagos se encuentran a frecuencias más bajas, no detectables con el número de eventos analizados. A continuación, se analizó el cultivo RP para determinar si su perfil de susceptibilidad difería del WT y, especialmente, si las células acapsulares aisladas de la influencia de Cap62 podían ser infectadas por CuaHET1 (**Figura 2.6, centro**). Los resultados mostraron un incremento notable en la proporción de células resistentes a Cap62 (91.8%), acompañado de una marcada sensibilidad a CuaHET1, con solo un 2.1% de crecimiento. Esto demuestra que CuaHET1 puede infectar eficazmente a las variantes resistentes a Cap62 incluso en ausencia total del virión de Cap62, descartando la coinfección como mecanismo responsable del retraso en la resistencia. La susceptibilidad al cóctel fue comparable a la

observada para CuaHET1 en monoinfección (2.1%). Finalmente, se infectó el cultivo WT con CuaHET1, y las células resistentes resultantes se analizaron por citometría para evaluar su sensibilidad frente a ambos fagos (**Figura 2.6, derecha**). Se observó que la sensibilidad a Cap62 se mantenía alta (0% crecimiento), mientras que la resistencia a CuaHET1 aumentó aún más que en el WT (95.7%). No se detectaron células capaces de crecer en presencia del cóctel (0%).

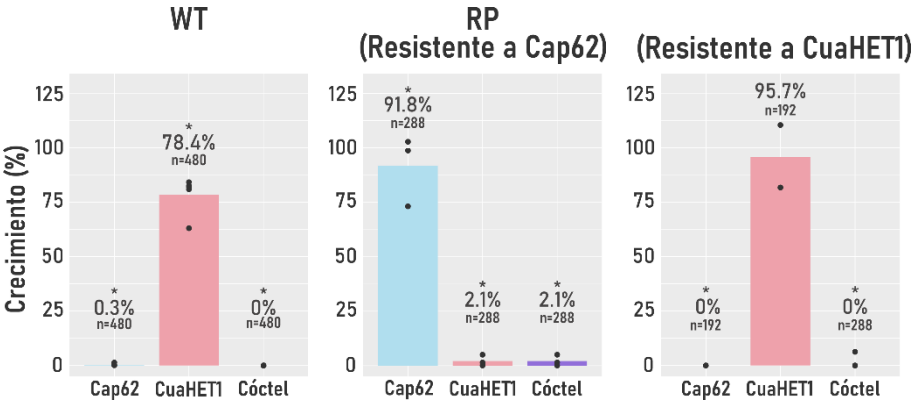


Figura 2.6. Sensibilidad a nivel de célula individual frente a los fagos Cap62 y CuaHET1. Porcentaje de pocillos con crecimiento para los cultivos WT, RP (resistente a Cap62) y resistente a CuaHET1, tras el tratamiento con Cap62, CuaHET1 o el cóctel. Los valores están normalizados respecto al control en LB (100%). Se muestra la media de réplicas independientes (*N* = 2–5, puntos individuales), indicándose el número total de células analizadas (*n*). El 0% indica crecimiento por debajo del límite de detección (< 0.5%). * $p < 0.05$, prueba exacta de Fisher para datos agrupados, relativa a la condición LB.

4.3 Ensayos de recuperación de cápsula mediante experimentos de célula única

La capacidad del cultivo WT para alternar entre sensibilidad y resistencia a distintos fagos destaca la plasticidad de las poblaciones de *K. pneumoniae* bajo presiones selectivas específicas. Por ello, nos planteamos si las células del cultivo RP, caracterizadas por tener un fenotipo acapsular y ser resistentes a Cap62, podrían recuperar la cápsula tras eliminar la presión de selección, y si, por el contrario, la presencia continuada de Cap62 impediría dicha reversión, modulando a su vez, la susceptibilidad al fago CuaHET1. Esto demostraría cómo Cap62 condiciona la infección por CuaHET1, explicando su interdependencia a la hora de retrasar las resistencias.

Para abordar esta cuestión, se aislaron células individuales del cultivo RP mediante citometría de flujo y se distribuyeron en pocillos, en presencia o en ausencia del fago Cap62 (**Figura 2.7.A**). Estas células individuales se dejaron crecer, y el cultivo resultante (pase 1) fue sometido de nuevo a separación por citometría, y se evaluó la susceptibilidad de las células individuales a Cap62 y CuaHET1. Para examinar la estabilidad del fenotipo en el tiempo, los cultivos se sometieron a un pase adicional (pase 2) y se repitió el análisis. Además, se realizó tinción de cápsula para confirmar la recuperación o ausencia de CPS.

Los resultados mostraron que las células que crecieron en ausencia de Cap62 recuperaron la producción de cápsula y restauraron parcialmente la sensibilidad a Cap62, reduciendo los niveles de resistencia al 65.6% en el pase 1 y al 50.9% en el pase 2. Esta recuperación del fenotipo capsular se tradujo en un incremento

notable de la resistencia frente a CuaHET1, con un 44.4% de crecimiento en el pase 1 y un 59.6% en el pase 2 (**Figura 2.7.B**). En cambio, las células que crecieron en presencia de Cap62 mantuvieron un fenotipo acapsular y altamente resistente a Cap62, tanto en el pase 1 (99.4%) como en el pase 2 (93.5%). Consecuentemente, la

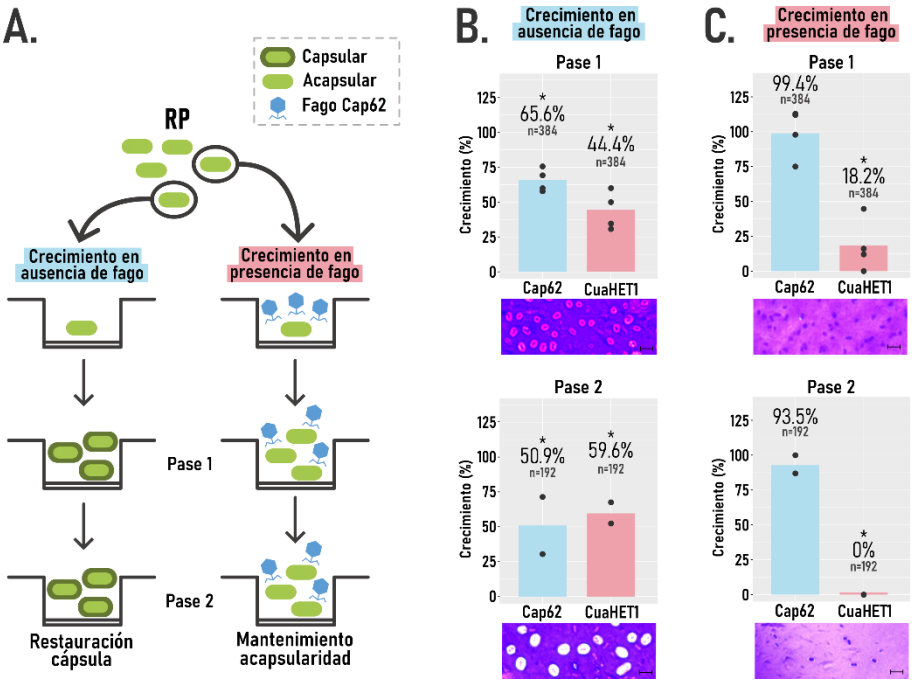


Figura 2.7. Ensayo de recuperación de cápsula a nivel de célula única. A. Esquema experimental. Células acapsulares resistentes del cultivo RP fueron aisladas individualmente por citometría y cultivadas en ausencia (azul) o presencia (salmón) del fago Cap62. **B.** Resultados del crecimiento en ausencia de fago (pases 1 y 2). **C.** Resultados del crecimiento en presencia de fago (pases 1 y 2). En ambos casos se indica el porcentaje de crecimiento relativo a la condición LB (100%). Se muestra la media de réplicas independientes (N = 2–5, puntos individuales), indicándose el número total de células analizadas (n). El 0% indica crecimiento por debajo del límite de detección (< 0.5%). * p < 0.05, prueba exacta de Fisher para datos agrupados, relativa a la condición LB.

preservación del fenotipo acapsular se tradujo en una susceptibilidad relativamente alta al fago CuaHET1, con tan solo un 18.2% de crecimiento en el pase 1, y un 0% en el pase 2 (**Figura 2.7.C**).

En conjunto, estos resultados demuestran que la presencia de Cap62 es indispensable para mantener de forma estable el fenotipo acapsular y resistente en la población bacteriana, habilitando así la infección por CuaHET y promoviendo un retraso en la aparición de resistencias más prolongado.

Capítulo 3. Estudio de la dinámica coevolutiva entre *K. pneumoniae* y una combinación de fagos

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en:
Mora-Quilis, L., & Domingo-Calap, P. (2025). Coevolution of a phage cocktail constrains reversible phenotypic resistance in *K. pneumoniae*. *bioRxiv*, 2025-12. https://doi.org/10.64898/2025.12.19.695413

En este capítulo exploramos el potencial coevolutivo de la combinación de fagos caracterizada en el capítulo anterior frente a su hospedador. El objetivo es mejorar su capacidad para retrasar la aparición de resistencias y analizar la dinámica de la interacción a largo plazo.

1. Coevolución del sistema fago - bacteria

1.1 Diseño experimental de la coevolución

Para el experimento de coevolución se seleccionó la combinación compuesta por los fagos Cap62 y CuaHET1 (*en adelante "Cóctel"*). El fago Cap62 es capaz de reconocer e infectar las variantes capsulares de la cepa K1, mientras que el fago CuaHET1 presenta la capacidad de infectar las variantes acapsulares con resistencia fenotípica frente a Cap62. En conjunto, ambos fagos mostraron tener uno de los mayores efectos en el retraso de la aparición de resistencia (***véase* Figura 2.4**).

La coevolución se llevó a cabo con 4 condiciones experimentales: (1) coinoculación del cóctel de fagos con la bacteria, (2) monoinoculación del fago Cap62 con la bacteria, (3) monoinoculación del fago CuaHET1 con la bacteria, y (4) cultivo bacteriano sin fago. Para cada condición se evolucionaron 3 linajes independientes en paralelo. El experimento se extendió durante 20 pases consecutivos, realizando en cada uno una dilución 1:25 del cultivo del pase anterior (**Figura 3.1.A**).

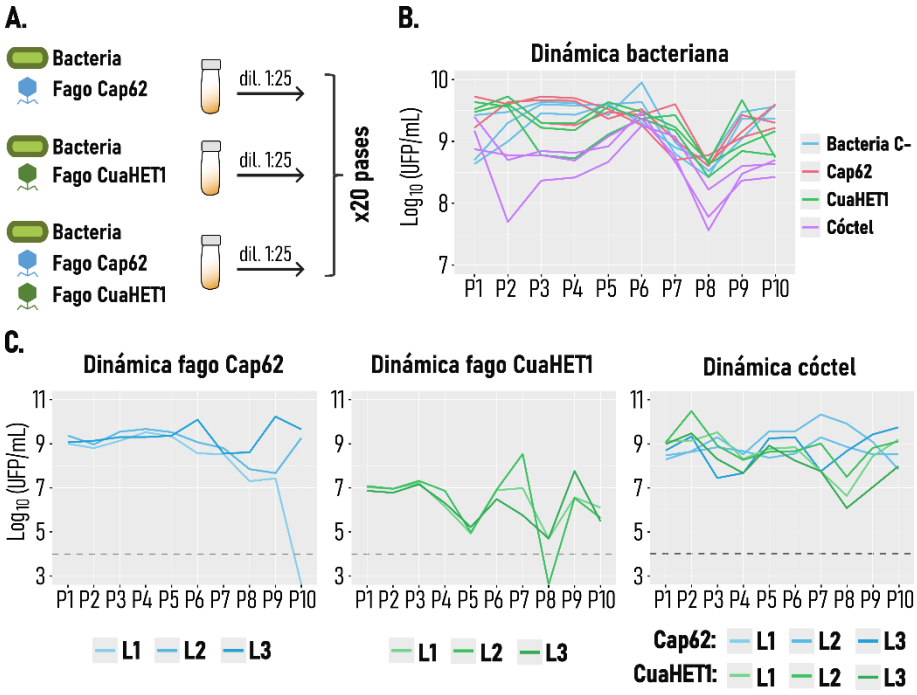


Figura 3.1. Sistema de coevolución bacteria-fago. A. Representación esquemática del experimento de coevolución. Los cultivos se infectaron con los fagos Cap62 y CuaHET1, tanto en monoinoculación como en coinoculación (cóctel), y se propagaron durante 20 pases consecutivos realizando una dilución 1:25 en medio de cultivo fresco. **B**. Dinámica bacteriana de los primeros 10 pases de coevolución, expresada como UFC/mL. Se muestran los datos de tres linajes independientes por condición. **C.** Dinámica de los fagos durante los primeros 10 pases, expresada como UFP/mL. Se muestran los datos de tres linajes independientes. La línea discontinua gris indica el límite de detección.

1.2 Dinámica de fago y bacteria durante la coevolución

Para evaluar la dinámica de la coevolución, se realizó el seguimiento de la densidad bacteriana y de la concentración de fago

durante los primeros diez pases del experimento. A partir del pase 10, simplemente se comprobó de manera rutinaria la presencia de ambas poblaciones hasta la finalización del ensayo.

Tanto la población bacteriana como la población de ambos fagos persistieron durante todo el ensayo. Las densidades bacterianas oscilaron entre 3.67×10^7 UFC/mL y 9.00×10^9 UFC/mL (**Figura 3.1.B**). Notablemente, la bacteria coevolucionada en presencia del cóctel se mantuvo en densidades significativamente menores, con una media de 7.70×10^8 UFC/mL en los tres linajes (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$; prueba de Dunn, $p\text{-}aj < 0.001$).

La densidad de las poblaciones de fago varió entre condiciones. En general, el fago Cap62 se mantuvo en altas concentraciones tanto en monoinoculación como en cóctel, con valores comprendidos entre 2.80×10^7 y 2.17×10^{10} UFP/mL, respectivamente (**Figura 3.1.C**). Por su parte, el fago CuaHET1, aunque persistió durante todo el proceso experimental, mostró un título significativamente menor en la condición de monoinoculación que en el cóctel (1.92×10^7 y 1.73×10^9 UFP/mL, respectivamente; prueba t de Student, $p < 0.001$).

2. Evolución de fago

2.1 Efecto de los fagos evolucionados en el retraso de la aparición de resistencias

2.1.1 Evaluación de las poblaciones evolucionadas de fagos

Para determinar si la evolución de los fagos mejoró su capacidad para retrasar la aparición de resistencia bacteriana, se evaluaron las

poblaciones de fagos obtenidas al final del experimento. Para ello, los sobrenadantes completos del pase 20 se utilizaron para infectar la cepa ancestral, y comparar su efecto con el del cóctel ancestral (**Figura 3.2**). Las curvas de crecimiento mostraron que todos los fagos evolucionados tendieron a retrasar más eficazmente la aparición de resistencia en comparación con sus homólogos ancestrales, siendo este efecto especialmente pronunciado en los fagos evolucionados en cóctel. Si bien se empleó siempre una concentración de fagos

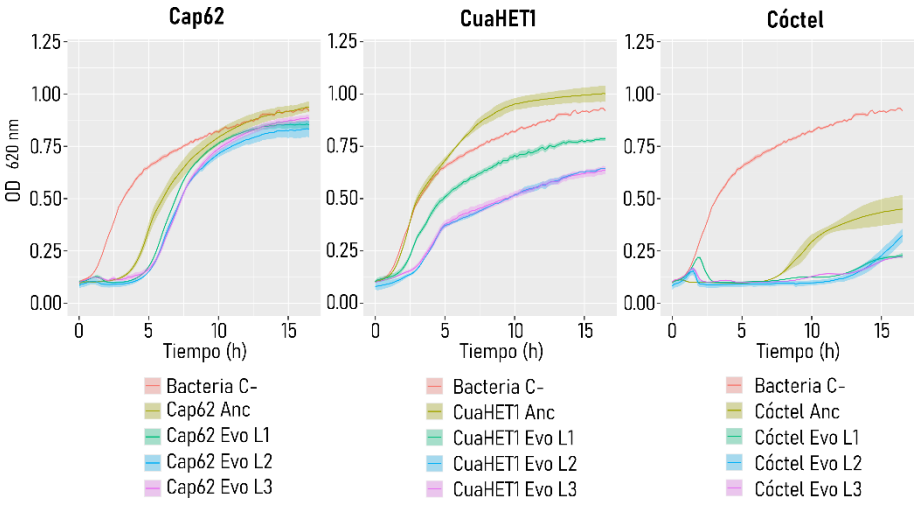


Figura 3.2. Dinámica de infección de las poblaciones de fagos evolucionadas. Curvas de crecimiento bacteriano de la cepa ancestral expuesta a las poblaciones de fagos evolucionadas (linajes L1-L3) del pase 20 de cada condición de evolución (Cap62, CuaHET1, y cóctel), comparadas con sus respectivos fagos ancestrales. Las áreas sombreadas representan el SEM (n = 3).

ancestrales superior a la concentración de los fagos evolucionados, para garantizar que cualquier mejoría observada no fuese debida a diferencias en título, el uso de pases completos no permite ajustar la

concentración de fagos en el cóctel evolucionado. Además, a pesar de realizar diluciones, también es posible arrastrar toxinas u otros productos bacterianos que puedan haber surgido durante la coevolución.

2.1.2 Selección y evaluación de fagos aislados a partir de las poblaciones evolucionadas

Para solucionar este problema, y poder estudiar el efecto mejorado del cóctel evolucionado en mayor detalle, se seleccionaron al azar cinco placas independientes de Cap62 y cinco de CuaHET1, de cada uno de los linajes del cóctel evolucionado. Posteriormente, estos aislados se combinaron en pares Cap62-CuaHET1, mezclando los fagos evolucionados entre sí, pero también con su variante ancestral complementaria. Estas combinaciones se utilizaron para infectar la cepa bacteriana ancestral (MOI total = 1), y se cuantificó su capacidad para retrasar la aparición de resistencia mediante el índice de retraso de resistencia (RDI, del inglés *Resistance Delay Index*).

El efecto de los fagos evolucionados en el retraso de resistencias mostró un patrón diferente entre linajes (**Figura 3.3.A**). En el linaje 1, el RDI osciló entre 0.485 y 0.858, en comparación con la combinación ancestral ($Cap62_{Anc}$ + $CuaHET1_{Anc}$), que presentó un valor de 0.616. De forma similar, en el linaje 3, el RDI varió entre 0.406 y 0.918, mientras que el cóctel ancestral alcanzó únicamente 0.416. En ambos casos, todas las combinaciones que incluían Cap62 y CuaHET1 evolucionados mostraron índices superiores a los del cóctel ancestral, indicando que la coevolución mejoró la capacidad del cóctel para retrasar la aparición de resistencia. En contraste, el linaje 2 mostró una

mejora limitada, con valores entre -0.643 y 0.685, frente al valor de 0.597 de la combinación ancestral.

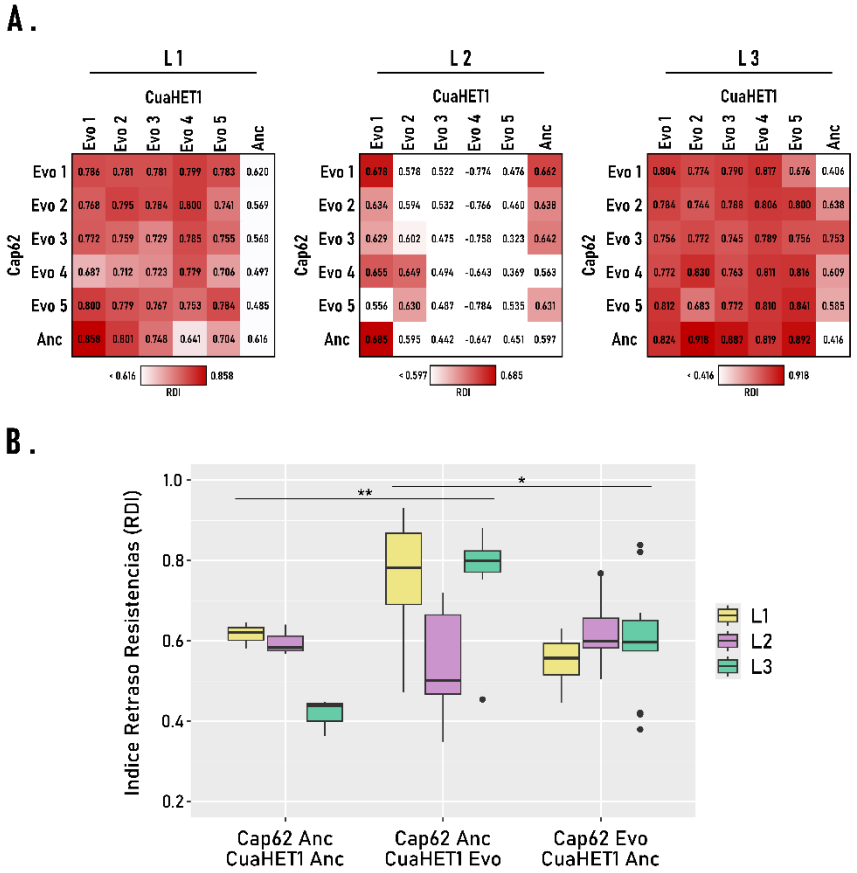


Figura 3.3. Capacidad de los fagos evolucionados Cap62 y CuaHET1 del cóctel para retrasar la aparición de resistencias. A. Combinaciones de los fagos Cap62 y CuaHET1 evolucionados a partir de la condición de cóctel en los tres linajes evolutivos (MOI total = 1), mostrando el índice de retraso de resistencia (RDI) para cada combinación. Evo denota los aislados de fago evolucionado, mientras que Anc se refiere a las variantes ancestrales de los fagos. La escala de color representa el valor de RDI, donde el blanco corresponde al valor mínimo, definido como la combinación de los fagos ancestrales Cap62 y CuaHET1, y el rojo representa el valor máximo de RDI. Los valores iguales o inferiores al mínimo se muestran también en blanco. **B.**

Valores de RDI agrupados según las combinaciones específicas de fagos para cada linaje. La combinación del fago Cap62 ancestral con CuaHET1 evolucionado mostró valores de RDI significativamente más altos que la pareja ancestral y que la combinación de Cap62 evolucionado con CuaHET1 ancestral (prueba de Kruskal-Wallis seguido de prueba *post hoc* de Dunn, *p-aj* < 0.05 (*), *p-aj* < 0.01 (**)). Por claridad, seis valores de RDI correspondientes a la combinación $Cap62_{Anc}$ + $CuaHET1_{Evo4}$ (L2) no se muestran en la figura, pero fueron incluidos en el análisis estadístico.

2.1.3 Contribución relativa de cada fago al retraso de la resistencia

Para determinar la contribución de cada fago a la mejora observada en el retraso de la resistencia, se comparó la eficacia de los fagos evolucionados, combinándolos con la versión ancestral del otro fago. Los valores más altos de RDI se observaron para las combinaciones formadas por $Cap62_{Anc}$-$CuaHet1_{Evo}$, los cuales fueron significativamente superiores a los del par ancestral (Kruskal–Wallis, $p < 0.01$; prueba de Dunn, *p-aj* < 0.05) (**Figura 3.3.B**). En contraste, las combinaciones de $Cap62_{Evo}$-$CuaHet1_{Anc}$ mostraron valores de RDI similares a los del cóctel ancestral. Estos resultados indican que la evolución de CuaHET1 contribuyó de manera más determinante a la mejora del cóctel frente a la emergencia de resistencia bacteriana.

Para ilustrar de manera más clara el impacto de los fagos evolucionados sobre la dinámica bacteriana, se representaron curvas de crecimiento de las combinaciones con mayor eficacia, para cada uno de los tres linajes (**Figura 3.4**). Estas curvas confirmaron visualmente los resultados observados mediante el RDI. Mientras que los fagos del linaje 2 no mostraron mejoras en la capacidad de retrasar la resistencia respecto al cóctel ancestral, las combinaciones de los

linajes 1 y 3 que incluían CuaHET1 evolucionado lograron una supresión más prolongada del crecimiento bacteriano. Notablemente, el efecto más pronunciado se observó al combinar CuaHET1 evolucionado con Cap62 ancestral, lo que prácticamente impidió el crecimiento bacteriano. Por el contrario, las combinaciones que contenían Cap62 evolucionado junto con CuaHET1 ancestral mostraron el peor resultado, con la aparición de resistencia incluso antes que en los cultivos tratados con el cóctel ancestral.

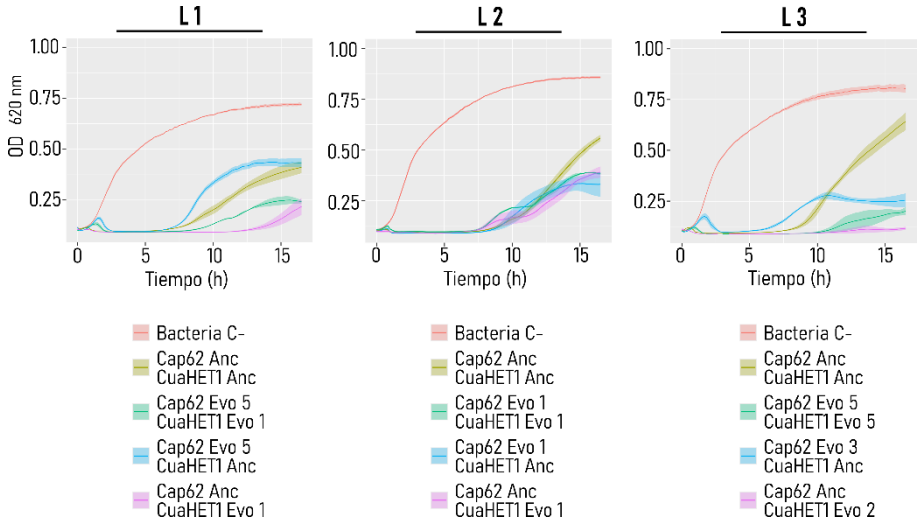


Figura 3.4. Dinámica de infección de las combinaciones más efectivas de fagos Cap62 y CuaHET1 evolucionados en la condición de cóctel. Se muestran las curvas de crecimiento del control (Bacteria C-) y de las infecciones con las combinaciones de Cap62 y CuaHET1 que presentaron el mayor índice de retraso de resistencia (RDI), incluyendo combinaciones de fagos ancestrales (Anc) y evolucionados (Evo). Las áreas sombreadas representan el SEM (n = 3).

2.2 Análisis genómico y estructural de los fagos evolucionados

Para identificar la base genética de la adaptación de los fagos durante el proceso de coevolución, se analizaron los cambios genómicos acumulados tras 20 pases de evolución, tanto para las condiciones de monoinoculación como de coinoculación (**Datos S3.1**). Todas las muestras fueron secuenciadas con éxito, excepto el fago Cap62 del linaje 2 en la condición de cóctel.

El fago Cap62 acumuló cuatro mutaciones idénticas tanto en monoinoculación como coinoculación, localizadas en la *tail fiber protein* (CDS 0007) (frecuencia del alelo alternativo > 80%) (**Figura 3.5.A**), así como una en una proteína hipotética (CDS 0022), cuya función es desconocida según análisis realizados con BLASTp, pero que contiene un dominio tipo LIM según HHPred.

El fago CuaHET1, por su parte, acumuló mutaciones principalmente en genes estructurales y de reconocimiento, como en *hoc-like head decoration* (CDS 0016), el *long tail fiber protein proximal connector* (CDS 0085), la *tail fiber adhesin* (CDS 0088), la *baseplate wedge subunit* (CDS 0280) y la proteína hipotética (CDS 0229) (frecuencia > 70%, en al menos dos linajes). El único gen con mutaciones tanto para la condición de monoinoculación como para la de cóctel en los tres linajes fue la *tail fiber protein* (CDS 0087), que presentó una sustitución C → T en la posición 60709 (monoinoculación) (frecuencia = 100%), y una sustitución G → T en la posición 61128 (coinoculación) (frecuencia = 100%) (**Figura 3.5.B**). La *tail fiber adhesin* (CDS 0088) también mostró mutaciones en monoinoculación y cóctel en al menos dos linajes, con una frecuencia > 92%.

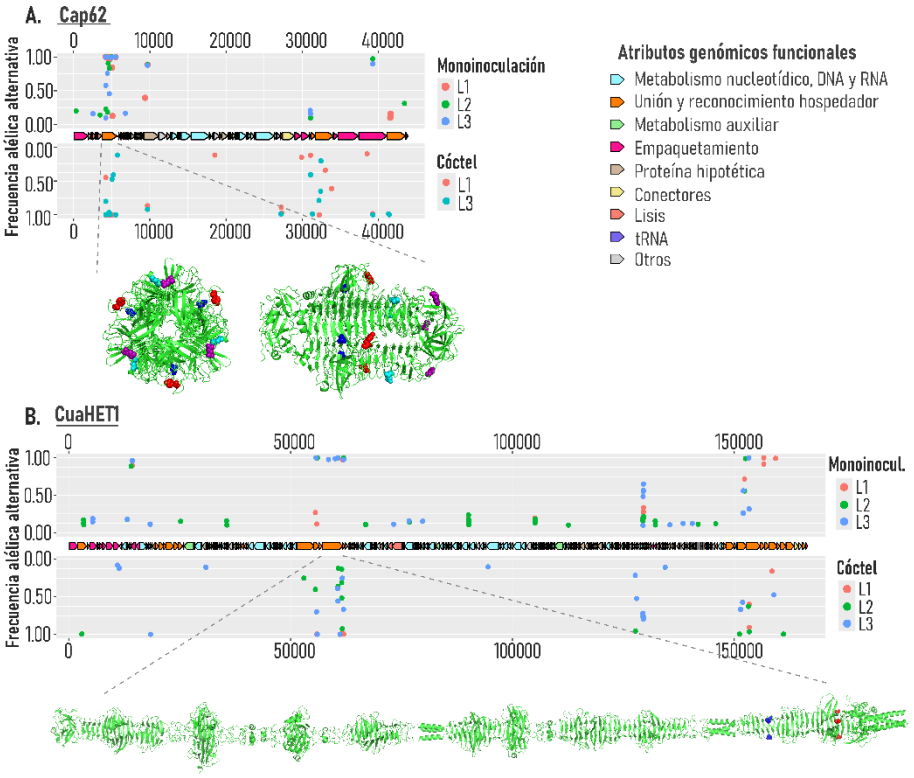


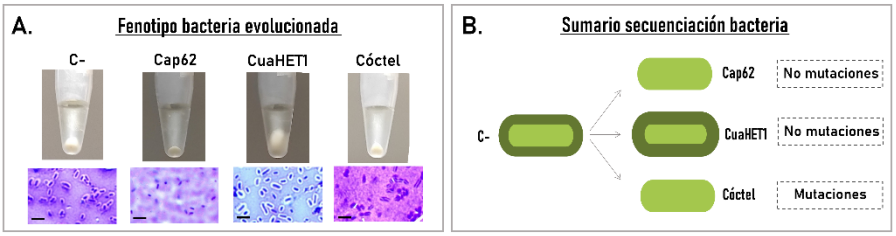
Figura 3.5. Cambios genómicos y estructurales en los fagos Cap62 y CuaHET1 evolucionados. Frecuencia de los alelos alternativos a lo largo del genoma de los fagos Cap62 **(A)** y CuaHET1 **(B)** en los tres linajes independientes evolucionados bajo condiciones de monoinoculación y cóctel. Las categorías funcionales genómicas se representan mediante recuadros de colores. Debajo, se muestran las representaciones estructurales de la *tail fiber protein* de Cap62 (CDS 0007) en vista transversal **(izquierda)** y longitudinal **(derecha)**, destacando los cambios de aminoácidos detectados idénticamente en monoinoculación y cóctel. En el caso de CuaHET1, se muestra la estructura longitudinal de la proteína de la *tail fiber protein* (CDS 0087), indicando las mutaciones compartidas entre ambas condiciones.

3. Evolución bacteriana

3.1 Caracterización fenotípica de la adaptación

Para evaluar la adaptación de la población bacteriana frente a las distintas presiones de selección impuestas en cada condición, se analizaron los cambios fenotípicos tras 20 pases de coevolución. Para ello, se evaluó la presencia de cápsula mediante microscopía óptica, y se analizó la consistencia del *pellet* bacteriano tras la centrifugación de los cultivos.

Las poblaciones bacterianas coexistieron con los fagos durante todo el experimento, aunque sus fenotipos variaron en función de la condición bajo la cual evolucionaron. Las poblaciones evolucionadas únicamente en LB, así como aquellas evolucionadas en monoinoculación con CuaHET1 conservaron el fenotipo capsular, adquiriendo incluso, en este último caso, una apariencia más mucoviscosa (**Figura 3.6.A**). En contraste, las bacterias evolucionadas en presencia de Cap62, tanto en monoinoculación como en cóctel, desarrollaron un fenotipo acapsular y una apariencia notablemente menos mucosa.



C. Mutaciones bacteria evolucionada en Cóctel

	Pos. genoma	Mutación	Cambio	Frecuencia	Gen	Producto
L1	-	-	-	-	-	-
L2	138396	ins	T ‣ TG	2:344	*waaE* (CDS 0136)	Glicosiltransferasa LPS biosíntesis
	1244482	snp	T → C	0:357	*amiA* (CDS 1159)	Amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina
	3077562	snp	A ‣ G	0:188	*tRNA-ligase* (CDS 2969)	Ligasa asparagina-tRNA
	3711388	ins	G → GC	5:270	*iciR* (CDS 3555)	Regulador transcripcional DNA
	4244419	snp	T → C	0:230	*emrA* (CDS 4071)	Bomba eflujo resistencia antibióticos
L3	148446	del	C → -12nt	2:391	*hypoth. prot.* (CDS 0145)	Putativa glucosiltransferasa (HHPRED)

Figura 3.6. Evolución bacteriana. A. Fenotipos bacterianos evolucionados. Aspecto mucoso de los pellets bacterianos tras centrifugación para bacteria evolucionada en LB (C-), en monoinoculación (Cap62 o CuaHET1) y en coinoculación (cóctel). Las imágenes de microscopía muestran la presencia de cápsula en las condiciones C- y CuaHET1. Las barras de escala representan 5 µm. **B.** Sumario de la secuenciación genómica bacteriana. Se detectaron mutaciones únicamente en la condición del cóctel. **C.** Mutaciones acumuladas en bacterias evolucionadas en la condición del cóctel. Se indican el linaje (L1, L2, L3), la posición genómica (pb) y el tipo de mutación (ins: inserción; snp: polimorfismo de un solo nucleótido; del: deleción). Se muestran los cambios de nucleótido y su frecuencia relativa al alelo consenso. También se indica el gen, el CDS correspondiente y nombre del producto proteico.

3.2 Análisis genómico de la bacteria evolucionada

Con el fin de identificar las bases genéticas de la adaptación bacteriana a las distintas presiones de selección ejercidas por el fago, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo de las poblaciones bacterianas evolucionadas bajo cada condición experimental.

El análisis genómico reveló que las poblaciones bacterianas coevolucionadas con Cap62 o con CuaHET1 en monoinoculación no presentaron mutaciones detectables, mientras que únicamente aquellas evolucionadas en presencia del cóctel acumularon mutaciones en dos de los linajes (**Figura 3.6.B**). En el linaje 2, se identificaron mutaciones en seis genes con funciones diversas (**Figura 3.6.C**), incluyendo genes relacionados con la resistencia a fármacos mediada por bombas de eflujo (*emrA*), la regulación del metabolismo del carbono (*icIR*), el remodelado de la pared celular (*amiA*) y la biogénesis del ARNt. Pero destaca sobre todo la detección de una mutación en el gen *waaE* (CDS 0136), una glucosiltransferasa implicada en la biosíntesis del núcleo interno del LPS. Además, en el linaje 3 se identificó una mutación en una proteína hipotética (CDS 0145) con putativa actividad sialiltransferasa, localizada inmediatamente adyacente a *rfaC* (CDS 0146) y *rfaF* (CDS 0147), dentro del clúster biosintético del LPS. La proximidad y el contexto funcional de estas mutaciones sugieren que el cóctel de fagos ejerce una presión selectiva sobre la estructura del LPS, favoreciendo la aparición de variantes de resistencia asociadas a este componente.

Discusión

Resistencia fenotípica y reversibilidad: nuevos retos y estrategias metodológicas

Uno de los principales hallazgos de la tesis ha sido que la resistencia en *K. pneumoniae* no siempre sigue el modelo clásico de mutaciones estables, sino que puede derivar en fenotipos reversibles y transitorios. Esta inestabilidad fenotípica ha condicionado significativamente su caracterización y su utilización para el aislamiento de nuevos fagos. En contraste, la literatura previa documenta mayoritariamente la selección de cultivos resistentes caracterizados por mutaciones estables en genes biosintéticos de estructuras de superficie, tales como la cápsula o el lipopolisacárido [41,43,44,91]. En el caso de la cápsula, estas alteraciones pueden interrumpir la síntesis o exportación del polisacárido capsular, generando variantes acapsulares resistentes a la infección [9]. Si bien existen casos puntuales en los que se ha descrito resistencia incompleta, como en los mutantes ZM9 y ZR7 tras la infección con el fago SCNJ1-Z [41], la resistencia parcial o transitoria ha recibido escasa atención.

En contraste con el paradigma clásico, la selección de variantes resistentes en nuestro modelo presentó una notable complejidad, debido a la prevalencia de la resistencia incompleta. La búsqueda de un fenotipo de resistencia total obligó a ampliar el cribado inicial de una decena de clones hasta los 130 aislados, de los cuales, la mayoría presentaba todavía una sensibilidad al fago relativamente alta. Cabe destacar que, aunque se ha descrito que el aumento de la MOI puede favorecer la selección de mutantes resistentes en *K. pneumoniae* [92–94], en nuestro sistema la modificación de la MOI en un rango de 0.05

a 5 no alteró el perfil de resistencia, sugiriendo que el fenotipo resistente no dependía de la carga viral inicial. El análisis posterior reveló que esta resistencia incompleta se trataba, en realidad, de un fenómeno de resistencia reversible. Mientras que algunos clones altamente resistentes, como CL13, eran acapsulares, los clones con resistencia intermedia, como el CL4, habían restaurado la producción de cápsula. Esta recuperación del fenotipo capsular sugirió la existencia de un mecanismo de resistencia no genético y reversible, consistente con la pérdida de resistencia observada tras el protocolo de aislamiento, el cual implicaba múltiples lavados y pases de purificación destinados a eliminar el exceso de fago Cap62. Esta hipótesis se confirmó con un hallazgo determinante: la mayoría de los cultivos altamente resistentes conservaban el fago en el medio. Esto demostró que la presión selectiva continua, ejercida por Cap62, es indispensable para mantener el fenotipo resistente en estas variantes, lo que fundamentó el uso de la población RP (en la que ese preserva el fago) como modelo de estudio principal, permitiendo establecer una comparativa con la cepa WT y los aislados clonales CL13 y CL4.

De la misma manera, la naturaleza reversible y transitoria de la resistencia en la mayoría de los clones seleccionados representó un obstáculo significativo para el aislamiento de nuevos fagos capaces de infectar los cultivos resistentes. La estrategia convencional se basa en el uso de resistentes estables [39,43,95,96], como ilustra el aislamiento de los fagos ΦKR1 y ΦKR18 a partir de mutantes de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 [97]. En nuestro caso, utilizando el mutante CL13 pudimos aislar los fagos CuaMUT1 y CuaMUT2. Por el contrario, el uso de aislados con fenotipos inestables, como CL4, resultó problemático: la rápida reversión al fenotipo capsular tras su

purificación condujo inevitablemente al aislamiento de fagos redundantes con Cap62, como los fagos CuaREV1 y CuaREV2.

Ante esta limitación, una de las principales aportaciones metodológicas de esta tesis ha sido la implementación del cultivo RP como plataforma de aislamiento. Uno de los factores más importantes para el éxito de esta estrategia radicó en la capacidad de la población RP para formar un césped bacteriano lo suficientemente homogéneo como para permitir la selección de calvas de lisis, y la subsecuente purificación de los nuevos fagos. Es fundamental destacar que la presencia continua de Cap62 fue determinante, ya que su eliminación habría conducido a la readquisición de la cápsula, y consecuentemente, al aislamiento de fagos redundantes tipo CuaREV.

Finalmente, fue necesario desarrollar un protocolo que permitiera evaluar la resistencia de la población RP en ausencia de Cap62 antes de que ocurriera la reversión. Para ello, la citometría de flujo se propuso como una herramienta idónea, ya que permitía exponer células individuales al tratamiento y evaluar su susceptibilidad. Sin embargo, a pesar de la eficacia demostrada por esta técnica, es necesario considerar sus limitaciones: el límite de detección (condicionado por el tamaño muestral y típicamente entre 10^{-2} y 10^{-3}) puede enmascarar variantes minoritarias, y la ausencia de crecimiento celular no siempre implica susceptibilidad lítica, pudiendo deberse también a paradas de crecimiento por estrés [98–100] o al fenómeno de "lisis desde fuera" (lisis celular por adsorción múltiple de fagos sin replicación) si la MOI es excesiva [101].

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia crítica de desarrollar metodologías que permitan estabilizar fenotipos

fluctuantes para estudiar la compleja heterogeneidad bacteriana. Asimismo, estas estrategias pueden ser extensibles al estudio de la sensibilidad frente a antibióticos y otros tratamientos.

Resistencia mediada por receptores: más allá de la mutación

En la literatura científica se ha documentado extensamente que la evasión de la infección por fagos se produce mayoritariamente mediante la modificación de receptores de superficie, como CPS, LPS u OMP [102], un fenómeno atribuido generalmente a mutaciones estables en genes biosintéticos de dichas estructuras, o en sus reguladores transcripcionales [39,103–105]. Podemos encontrar numerosos ejemplos: en *Escherichia coli*, mutaciones en los genes *lamB* u *ompC* bloquean el reconocimiento inicial por parte del fago Bp7 [106]; en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se han identificado mutaciones en genes implicados en la síntesis de pili tipo IV, que actúa como receptor para fagos [107]; y en el caso de *K. pneumoniae* la interrupción de genes estructurales, como la glicosiltransferasa inicial *wcaJ*, o el regulador *rcsB* que controla la transcripción del ácido colánico, da lugar a variantes acapsulares resistentes a la infección [43,51]. De la misma manera, en nuestro estudio, la deleción en *rfaH* del clon CL13 confirma el que la bacteria puede eludir la infección por Cap62 mediante la adquisición de mutaciones. Sin embargo, esto contrasta con el fenotipo transitorio observado en la mayoría de los clones seleccionados. El análisis genómico exhaustivo de la población RP permitió descartar la presencia de mutaciones convencionales (SNP, indels o transposiciones) y, además, la aplicación del análisis FDR, en el que se compararon directamente las lecturas de RP frente

a las del WT, permitió minimizar la detección de falsos positivos, reforzando la hipótesis de que, la resistencia en nuestro modelo se debe estrictamente a cambios en la expresión génica.

Un mecanismo que puede explicar la ausencia de mutaciones es la variación de fase, que permite a números patógenos gramnegativos alterar dinámicamente sus estructuras de superficie, mediante mecanismos genéticos como epigenéticos [45,46]. Entre estos últimos, destacan la regulación epigenética del operón *pap*, responsable de la biosíntesis de pili P en *E. coli* [108], o la regulación del antígeno O del LPS en *Salmonella* spp. En el caso de *Salmonella*, la regulación del operón *opvAB* controla la longitud del antígeno O mediante la metilación diferencial en la región promotora de operón, que determina la unión del regulador transcripcional OxyR [109,110]. En condiciones normales, el operón se encuentra reprimido. Sin embargo, su expresión se activa de manera estocástica, con una frecuencia de 6.1×10^{-5} por célula y generación, dando lugar a un antígeno O acortado, que confiere resistencia a fagos como P22, a costa de una menor virulencia [110,111]. Aunque en nuestro estudio no se ha determinado experimentalmente si las alteraciones fenotípicas observadas pueden estar mediadas por mecanismos epigenéticos, estudios recientes han demostrado que cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* presentan patrones de metilación diferencial mucho más elevados en genes de biosíntesis de cápsula y virulencia [112].

Alternativamente, estos cambios podrían responder a señales extracelulares mediante *quorum-sensing*, un sistema de comunicación usado por bacterias que permite regular procesos fisiológicos

dependientes de la densidad poblacional, como la formación de biofilm, la motilidad celular, e incluso la regulación de estructuras de superficie y resistencia a fagos [113]. En *Staphylococcus aureus*, la infraexpresión de *luxS* incrementa la transcripción de la cápsula, un efecto que se revierte mediante la adición exógena del autoinductor AI-2 [114]. Este sistema de señalización LuxS/AI-2 está presente también en *K. pneumoniae*, donde se ha vinculado a la secreción de exopolisacáridos durante la síntesis de LPS [115]. Además, existen estudios que relacionan el *quorum-sensing* con la resistencia a fagos [116]. Sin ir más lejos, en *K. pneumoniae* se ha demostrado que una deficiencia en SdiA, un receptor de autoinductores, incrementa la sensibilidad al fago [117]. Basándonos en que la infección por fagos desencadena respuestas de estrés (ppGpp) [118,119] que pueden estar potencialmente vinculadas al *quorum-sensing*, y en estudios previos en los que se ha demostrado que sobrenadantes derivados de la infección del fago phi3T en *Bacillus subtilis* inducen la lisogenia, debido a la presencia de péptidos señalizadores [120], evaluamos si el medio condicionado por la infección con Cap62 podía inducir la pérdida de cápsula en bacterias no infectadas. Si bien no detectamos cambios fenotípicos, la inestabilidad inherente de moléculas señalizadoras como el AI-2 [121], podría haber limitado su detección en nuestras condiciones experimentales, impidiendo descartar esta vía definitivamente.

Una explicación alternativa se fundamenta en la selección de variantes fenotípicas surgidas por fluctuaciones estocásticas en la expresión génica. Este ruido transcripcional, genera una heterogeneidad fenotípica sustancial incluso dentro de poblaciones clonales [122]. En nuestro modelo, esto implicaría la existencia de una

subpoblación minoritaria de células que, por azar, expresen niveles reducidos de cápsula. Existen estudios que relacionan las fluctuaciones en la expresión génica con la resistencia a fagos; en *E. coli* se ha demostrado que subpoblaciones con una producción reducida o retardada del receptor viral ven incrementada su supervivencia, ante una elevada presión selectiva por el fago λ, garantizando la persistencia del cultivo [123,124]. El valor de esta estrategia reside en su naturaleza reversible y transitoria; tras el cese de la presión selectiva, la distribución de la expresión génica se reequilibra, permitiendo la reversión al fenotipo original [125]. Cabe destacar que estos cambios estocásticos ocurren con una frecuencia significativamente superior a la tasa de mutación bacteriana, estimada en torno a 10^{-10} mutaciones por nucleótido por generación [126,127], e incluso más bajas que la de variación de fase, que oscila entre 10^{-3} y 10^{-4} [45]. Esto confiere al sistema una elevada plasticidad, facilitando transiciones fenotípicas rápidas y eficaces para la adaptación a entornos fluctuantes.

Finalmente, es crucial considerar el papel de los ARNnc como potenciales ejecutores del cambio fenotípico en ausencia de mutaciones genéticas. Estos reguladores postranscripcionales actúan de manera rápida y versátil, generalmente mediante el emparejamiento de bases con ARNm diana para inhibir su traducción o promover su degradación, modulando así la expresión génica en respuesta a señales ambientales [128]. Un ejemplo es el ARNnc OmrB, que actúa reprimiendo la síntesis de CPS mediante la represión de la traducción de KvrA, regulador del locus *cps* [129].

Bases moleculares de la resistencia: desregulación de cápsula y estrés metabólico

Independientemente del mecanismo responsable de la resistencia, los análisis transcriptómicos revelaron cambios significativos en los niveles de expresión de diversos clústers génicos. Destaca especialmente la marcada infraexpresión del clúster biosintético de la cápsula. Mientras que la primera unidad transcripcional, que incluye *galF* y *PAP2*, mostró valores de expresión más altos en los tres cultivos resistentes que en WT, la segunda unidad, iniciada por *wzi*, destacó especialmente por sus niveles de infraexpresión. Genes críticos para el ensamblaje y la exportación de los polisacáridos capsulares como *wcaI*, *wcaJ*, *gmd*, *wza* y *wzc* [39,51,130] mostraron niveles de expresión significativamente reducidos en comparación con el WT.

En el caso del mutante CL13, este perfil se puede explicar por la deleción en el gen *rfaH*. La pérdida de la valina 26 en el dominio N-terminal de RfaH puede comprometer su interacción con la señal *ops* [131], provocando la terminación transcripcional prematura y la caída progresiva de la expresión a lo largo del operón [132–135]. Por el contrario, en la población RP y el clon CL4, la ausencia de mutaciones sugiere un mecanismo regulatorio. Resulta paradójico que CL4, siendo fenotípicamente capsular, presente niveles de expresión del operón *wzi* tan bajos como los de RP. La clave de esta diferencia fenotípica podría hallarse en la tercera unidad transcripcional, donde *manC*, implicado en la síntesis de GDP-manosa (un precursor esencial para la producción de polisacáridos de superficie) [136], se encuentra significativamente infraexpresado en RP respecto a CL4. Por lo tanto,

dado que *manC* se ha asociado previamente con la acapsularidad y la pérdida de hipermucoviscosidad [137], esta diferencia de expresión podría contribuir a la divergencia fenotípica observada entre RP y CL4.

Para esclarecer el porqué de estos cambios en la expresión del clúster *cps*, evaluamos los principales reguladores de la cápsula. Por un lado, el regulador *rmpA* (asociado a la hipermucoviscosidad) se encontró fuertemente sobreexpresado de manera específica en los cultivos acapsulares RP y CL13 (**Figura 1.11.B**). Este hallazgo resulta especialmente contradictorio dado que RmpA actúa como activador directo de los promotores de *galF* y *manC* [137], por lo que su elevada expresión podría responder a un mecanismo compensatorio para suplir la pérdida de cápsula. Por otro lado, activadores de la expresión de cápsula como *rcsA* [138,139] y el ARNnc *ryhB* [140] mostraron niveles elevados en todos los cultivos resistentes, incluidos RP y CL13, lo que indica que su sobreexpresión no fue suficiente para restaurar el fenotipo capsular. En este contexto, el regulador sensible a hierro *iscR* fue el único que mostró un patrón coherente con el fenotipo observado. Se ha demostrado que mutantes Δ*iscR* en *K. pneumoniae* reducen la expresión de los promotores *galF* y *manC* [141]. En consonancia con esto, nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de *iscR* se encuentran ligeramente, aunque de forma significativa, disminuidos en los cultivos acapsulares CL13 y RP, mientras que en CL4 se mantienen similares a los del WT. Esta diferencia sugiere que la caída en los niveles de IscR podría contribuir a la infraexpresión de *manC* en RP respecto de CL4.

Más allá de la regulación específica de genes biosintéticos de la cápsula, nuestros datos revelan que la resistencia podría estar

enmarcada dentro de una respuesta metabólica global. Para ello, examinamos inicialmente el papel de la proteína CRP (proteína receptora de AMPc), conocida por inhibir la transcripción de los operones *galF*, *wzi* y *manC* en condiciones de baja glucosa, para promover el ahorro energético [142–144]. Si bien en nuestro estudio no detectamos variaciones asociadas al complejo AMPc-CRP, sí que observamos alteraciones muy significativas en otros sistemas del metabolismo energético y obtención de carbohidratos. Concretamente, el operón *glpABC*, responsable del catabolismo anaeróbico del glicerol [145,146], presentó la mayor diferencia entre el perfil transcriptómico de RP y CL4. Mientras que en RP estos genes se encontraron drásticamente infraexpresados, en CL4 los niveles se mantuvieron similares a los del cultivo WT. Aunque no se ha establecido una relación directa entre la desregulación de este operón y la pérdida de cápsula, sí que se ha relacionado con adaptaciones metabólicas frente al estrés [147,148], como el inducido por la infección por fago, lo que se vincula a una reducción general del metabolismo energético que da lugar a la formación de células persistentes. El estado de dormancia característico de estas células limita la disponibilidad de ATP, comprometiendo potencialmente la síntesis de estructuras energéticamente costosas como la cápsula y otros componentes de superficie [149,150]. Esta hipótesis se ve reforzada por evidencias previas donde mutaciones en *glpC* alteran la formación de biofilm [151], lo que posiciona al metabolismo energético como un determinante central en la regulación de la arquitectura de la superficie celular.

En consonancia con esta hipótesis del ahorro energético, también observamos alteraciones significativas en la expresión de

genes para el metabolismo del nitrato y el metabolismo de la lisina. Por un lado, las nitrato reductasas permiten la respiración anaeróbica mediante del uso de nitrato como aceptor de electrones [152,153]. Por otro, la interrupción del metabolismo de la lisina puede comprometer la generación de energía y la homeostasis celular, afectando indirectamente a la biosíntesis de la cápsula. De hecho, existe evidencia previa de que la mutación de *cadA* resulta en una reducción de la producción capsular, fenotipo que se revierte tras su complementación [154].

Como conclusión, si bien es complejo determinar si las alteraciones transcriptómicas son causa o consecuencia de la resistencia, nuestros resultados confirman que la infección por Cap62 selecciona variantes caracterizadas por la represión del clúster biosintético de la cápsula. En este contexto, los datos sugieren que el estado metabólico global podría desempeñar un papel determinante, imponiendo una restricción fisiológica de ahorro energético que consolidaría el fenotipo acapsular.

Dinámica coevolutiva: jerarquía de defensas y coste evolutivo

Los ensayos de coevolución proporcionan un marco experimental idóneo para profundizar en la interacción entre fagos y bacterias. En nuestro estudio, la coevolución del cóctel frente a *K. pneumoniae* no solo potenció la eficacia del tratamiento, sino que redirigió la trayectoria evolutiva de la bacteria. La diferencia observada entre la coevolución con fagos individuales y el cóctel revela una organización jerárquica de las defensas bacterianas, gobernada principalmente por el coste evolutivo [155,156] (**Figura D.1**). Ante la

exposición a fagos individuales, la regulación fenotípica de la cápsula actúa como una primera línea de resistencia, reversible y de bajo coste biológico [157]. Mediante la modulación transitoria de la expresión de la cápsula, la bacteria logra evadir la infección sin comprometer de forma permanente estructuras esenciales de la superficie celular: Mientras que la disminución de la cápsula evita el reconocimiento por fagos dependientes de cápsula [32,158], su sobreexpresión puede enmascarar receptores de superficie alternativos, como el LPS o las OMP, impidiendo la adsorción de fagos que no tienen la cápsula como diana primaria. Por el contrario, la presión selectiva simultánea ejercida por el cóctel hizo insuficiente este mecanismo reversible, forzando la emergencia de mutaciones estables en genes esenciales para la biosíntesis del LPS, como *waaE* [159]. Este patrón es consistente con estudios previos en *Salmonella* spp., que describen la resistencia fenotípica como una barrera transitoria que deriva inevitablemente en mutaciones estables tras la coevolución del fago [160]. Nuestros resultados sugieren que el LPS actúa como receptor para CuaHET1, y que su mutación proporciona una vía de escape alternativa cuando la modulación de la cápsula resulta ineficaz. Sin embargo, estas mutaciones suelen conllevar un alto coste biológico, ya que comprometen la integridad de la membrana externa y alteran la interacción con el entorno [159]. En consecuencia, la bacteria solo recurre a la resistencia genéticamente fijada cuando la vía fenotípica ya no es una opción viable.

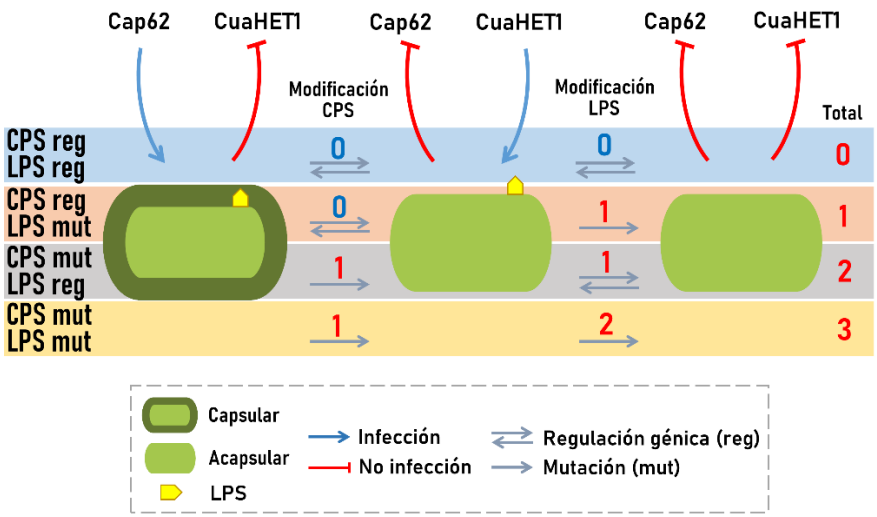


Figura D.1. Modelo conceptual de jerarquía de defensas y coste evolutivo. Esquema de las estrategias de evasión bacteriana frente a la presión combinada de los fagos Cap62 y CuaHET1. Considerando que Cap62 reconoce el CPS y asumiendo que, en base a nuestros resultados, CuaHET1 reconoce el LPS, proponemos que la estrategia óptima es aquella que minimiza el número total de eventos mutacionales acumulados. Por ello, regular tanto el CPS como LPS (estrategia azul) representa la estrategia más favorable (0 mutaciones). Le sigue la estrategia que regula el CPS pero muta el LPS (área naranja) (1 mutación). Sin embargo, mutar el CPS en lugar del LPS (área gris) constituye una estrategia todavía menos favorable, ya que una mutación en CPS precederá siempre a cualquier modificación del LPS, independientemente de la presencia del fago CuaHET1 (2 mutaciones). Finalmente, la estrategia menos favorable consiste en mutar ambas estructuras (área amarilla) (3 mutaciones).

Paralelamente, la adaptación del fago al hospedador suele estar mediada por mutaciones en las RBP, un mecanismo común para modular el rango de hospedador y la eficiencia de infección [58,161,162]. Ejemplos previos en fagos de *P. aeruginosa* [163] y *E. coli* [164] demuestran cómo SNP en las *tail fibers* pueden suprimir la

resistencia bacteriana o mejorar la adsorción. En nuestro caso, las presiones selectivas que dirigieron la evolución de las RBP dependieron fuertemente del fenotipo bacteriano predominante. Para CuaHET1, las mutaciones difirieron notablemente entre la condición de mono-infección y del cóctel, reflejando una adaptación a hospedadores capsulares y acapsulares, respectivamente. Es probable que estos cambios afectaran a RBP implicadas en el reconocimiento del LPS, imponiendo una presión selectiva sobre los genes biosintéticos bacterianos, especialmente en el cóctel, donde la pérdida de cápsula expone dicho receptor. En cambio, Cap62 acumuló mutaciones idénticas en las RBP en ambos escenarios, lo que sugiere una adaptación convergente hacia hospedadores acapsulares o con la misma modificación de cápsula. Estudios previos con el fago λ han demostrado que ciertas mutaciones desestabilizadoras pueden relajar la estructura de la RBP, permitiendo el reconocimiento de nuevos receptores [165,166]. Aunque Cap62 no parece haber llegado al punto de exhibir este cambio de receptor, sus mutaciones podrían reducir la actividad depolimerasa para la adaptación a una cápsula alterada o disminuida, aunque a coste de una menor infectividad frente a la cepa ancestral capsular.

Desde una perspectiva funcional, los cambios adaptativos en Cap62 podrían parecer ineficaces; sin embargo, desde un punto de vista ecológico, su papel fue esencial. Cap62 actuó como una presión selectiva favoreciendo la emergencia de variantes acapsulares y suministrando continuamente hospedadores susceptibles para CuaHET1, el cual explotó este fenotipo dominante. En este sentido, Cap62 modeló el paisaje ecológico, mientras que CuaHET1 se adaptó a él para maximizar su eficacia. La literatura previa indica que los

paisajes adaptativos de los fagos son remodelados continuamente por la adaptación recíproca de las bacterias [167], y que una mayor diversidad genotípica viral puede limitar la carrera armamentística bacteriana en comparación con la coevolución con un único fago [168]. Siguiendo estas observaciones, en nuestro estudio pudimos comprobar que la presencia simultánea de Cap62 y CuaHET1 limitó la capacidad de *K. pneumoniae* para regular la producción de cápsula, forzándola a adoptar mecanismos de resistencia más permanentes y costosos. Esta interacción ilustra la complejidad ecológica de los sistemas multi-fago, donde un virus puede facilitar indirectamente el éxito de otro al reestructurar la población bacteriana [169,170].

Implicaciones terapéuticas de las combinaciones de fagos: diseño de cócteles para la supresión de la resistencia

La fagoterapia se define como la administración de fagos líticos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Dada la elevada diversidad y especificidad de los fagos, se postula como una de las principales alternativas al uso convencional de los antibióticos [171]. Sin embargo, su éxito clínico depende de su capacidad para evitar la aparición de resistencias bacterianas. Para abordar este desafío, el uso y diseño de cócteles de fagos (combinaciones de virus con distintos rangos de hospedador) es una de las estrategias de referencia [172,173]. Tradicionalmente, para el diseño de cócteles se recurre a dos estrategias principales: el cribado de bancos de fagos preexistentes o el aislamiento dirigido (*de novo*) empleando las propias cepas resistentes [172]. El uso de colecciones permite una evaluación rápida de candidatos previamente caracterizados, que cumplan con

los criterios necesarios. En este sentido, nuestro grupo cuenta con una colección de referencia que cubre los 77 serotipos capsulares de *Klebsiella* spp. [31]. No obstante, un inconveniente de las colecciones de fagos es que la evaluación masiva de centenares de fagos presentes en la colección a veces puede resultar tediosa, y en muchos casos no garantiza el hallazgo de fagos eficaces. Si nos hubiésemos limitado a seleccionar fagos de colección capaces de infectar mutantes acapsulares estables (como los fagos CuaMUT sobre CL13), la eficacia frente a la población RP habría sido limitada. En este sentido, el aislamiento dirigido utilizando los propios cultivos resistentes como plataforma puede resultar más eficaz. La inmensa diversidad genómica de los virus y su alta especificidad permiten seleccionar fagos con una adaptación óptima para los receptores específicos, garantizando un reconocimiento más eficiente.

Una de las estrategias más eficaces para el diseño de cócteles líticos se basa en la combinación de fagos que reconozcan distintos receptores [173–175]. Estudios recientes han demostrado que la combinación de cinco fagos dirigidos a dianas diversas, como la cápsula, el lipopolisacárido y las proteínas de membrana externa OmpC y FhuA3, logra suprimir la emergencia de resistencias en *K. pneumoniae* MH258 durante 16 horas [176]. Nuestros resultados corroboran que la complementariedad de receptores es un factor crítico para combatir la resistencia. Los fagos CuaREV1 y CuaREV2, pese a haber sido aislados de cepas resistentes, mantienen la cápsula como receptor principal, lo que genera un solapamiento en el rango de hospedador con Cap62. Esta redundancia funcional impide que, en conjunto, logren retrasar eficazmente la aparición de resistencias. En nuestro modelo, el éxito en la supresión de variantes resistentes se

observó exclusivamente al combinar Cap62 con fagos aislados de cultivos acapsulares (CuaMUT y CuaHET). Estos fagos, independientes del reconocimiento capsular, explotan estructuras alternativas como el LPS o proteínas de membrana. Un hallazgo particularmente notable fue la especificidad diferencial entre los fagos aislados en CL13 (CuaMUT) y en RP (CuaHET): A pesar de generar spots turbios en ambos cultivos acapsulares, la formación de calvas de lisis y spots claros se restringió a su cepa de aislamiento. Esto sugiere la existencia de barreras más allá de la simple ausencia de cápsula, que podrían ser explicadas por las diferencias genómicas y transcriptómicas entre CL13 y RP. Se sabe que RfaH, además de promover la síntesis de cápsula, regula la elongación del LPS [177]. En el mutante CL13, observamos una reducción significativa en la expresión de glicosiltransferasas del operón *rfb*, responsables de la síntesis del antígeno O. Esta infraexpresión, consistente con descripciones previas de mutantes Δ*rfaH* [178], sugiere la producción de un LPS con el antígeno O truncado, lo cual se ha asociado con una menor susceptibilidad a la infección por fago [179]. Por el contrario, en el cultivo RP, los genes de biosíntesis del antígeno O se encuentran significativamente sobreexpresados respecto al WT y, de forma aún más acusada, respecto a CL13. Estas discrepancias en la expresión podrían traducirse en diferencias estructurales del antígeno O que modulen el reconocimiento por parte de los fagos, hipótesis que podría validarse mediante la caracterización del perfil de LPS [180,181]. Aunque el análisis específico de los receptores excedía el alcance de este estudio, esta heterogeneidad de superficie justificaría el distinto tropismo observado. En consonancia con ello, el análisis genómico reveló una divergencia estructural significativa en los módulos de

unión al receptor de estos fagos; concretamente, la pérdida de una supuesta adhesina y el truncamiento del dominio de unión al receptor de la *tail fiber protein* en CuaMUT2. Es probable que estas adaptaciones virales reflejen la especialización hacia las distintas arquitecturas de superficie de las poblaciones de las que fueron aislados.

Otro aspecto clave es entender por qué los fagos CuaHET son superiores a los CuaMUT a la hora de retrasar las resistencias. Esta diferencia parece ser atribuible a la composición de la población bacteriana. Dado que en el cultivo resistente predominan las variantes transitorias, la eficacia de los fagos CuaMUT se ve comprometida al quedar su acción restringida a las variantes tipo CL13, minoritarias en la población. Por el contrario, los fagos CuaHET, al ser capaces de infectar a las resistentes fenotípicas, que suponen la fracción mayoritaria de la población, contribuyen de manera mucho más efectiva al efecto del cóctel.

Finalmente, una de las observaciones más trascendentes de nuestro estudio para la terapia de fagos radica en la reversibilidad del fenotipo resistente. Existe un debate abierto sobre el uso de fagos de manera simultánea (en cócteles) o de manera secuencial. Un factor crítico en esta distinción es la respuesta inmune: mientras que en los cócteles la producción de anticuerpos neutralizantes podría comprometer a todos los fagos simultáneamente, la administración secuencial podría dilatar la ventana terapéutica al exponer los fagos de manera progresiva [182,183]. Sin embargo, desde la perspectiva de la dinámica poblacional, el cóctel presenta ventajas sustanciales. Su administración busca una supresión drástica de las distintas

subpoblaciones simultáneamente, impidiendo que las variantes resistentes, inicialmente en baja frecuencia, proliferen y ocupen el nicho ecológico liberado tras la eliminación de la variante ancestral [184,185]. Podría argumentarse que, dado que muchas variantes resistentes como las acapsulares presentan una virulencia atenuada [42–44], el sistema inmune del hospedador sería suficiente para eliminarlas sin necesidad de fagos adicionales [186,187]. No obstante, esta premisa no es válida en pacientes inmunocomprometidos ni en aplicaciones abióticas (como entornos industriales o biocontrol), donde la ausencia de defensas obliga a que la fagoterapia sea autosuficiente para erradicar la infección. Es precisamente en estos escenarios donde nuestro hallazgo sobre la resistencia fenotípica cobra especial relevancia. En un escenario de administración secuencial, la eliminación del fago primario (o su neutralización por anticuerpos) eliminaría la presión selectiva necesaria para mantener el fenotipo acapsular. La restauración de la cápsula por las bacterias supervivientes las haría de nuevo insensibles al fago complementario. En última instancia, todos estos aspectos subrayan que no existe una estrategia superior, y resaltan la necesidad de continuar investigando el impacto de estas dinámicas poblacionales en condiciones específicas del entorno o el paciente.

Perspectivas futuras

Esta tesis sienta las bases para el estudio de la plasticidad fenotípica en *K. pneumoniae*, destacando la modulación de la cápsula como un mecanismo dinámico de defensa frente a fagos. Sin

embargo, nuestros hallazgos plantean nuevos interrogantes que deben abordarse para comprender este proceso por completo.

En este sentido, es fundamental investigar los mecanismos moleculares responsables de esta plasticidad. Si bien hemos identificado alteraciones transcriptómicas evidentes, asociadas principalmente a los genes de la biosíntesis de cápsula, y potencialmente a otros genes relacionados con el metabolismo energético, queda por esclarecer qué genes concretos son los responsables directos del cambio fenotípico. Cabe la posibilidad de que la resistencia no dependa de un solo gen, sino de la contribución múltiple de distintos genes, lo que otorgaría a la regulación de la cápsula una complejidad superior a la descrita hasta el momento. Otro aspecto clave que cabría investigar en el futuro es el mecanismo responsable de esta variabilidad. Si bien, en este estudio hemos podido descartar la mutación como causa principal, todavía quedan por explorar otros mecanismos de regulación como la epigenética, el control postranscripcional mediado por ARNnc o la estocasticidad inherente a la expresión génica. Del mismo modo, es fundamental validar si la resistencia transitoria constituye un rasgo conservado y extendido en la especie, que ha pasado inadvertido hasta la fecha.

Finalmente, el desafío más relevante sería validar estas dinámicas en sistemas naturales y modelos *in vivo*. Nuestros experimentos se han limitado a condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, es crucial determinar si la reversibilidad fenotípica podría ocurrir en modelos animales. La confirmación de este fenómeno tendría grandes implicaciones terapéuticas, ya que la eliminación del fago permitiría la readquisición de cápsula,

comprometiendo potencialmente el éxito de tratamientos de administración secuencial de fagos. Del mismo modo, explorar si estas dinámicas ocurren en ecosistemas naturales permitiría comprender mejor cómo las poblaciones microbianas explotan la plasticidad fenotípica para sobrevivir, y paralelamente, dilucidar cómo la actividad de un fago puede modular el paisaje adaptativo, condicionando la trayectoria evolutiva de otras poblaciones virales.

Conclusiones

- La resistencia de *K. pneumoniae* al fago Cap62 está mediada por la pérdida de la cápsula. Esta resistencia es predominantemente transitoria y reversible, restaurándose la síntesis de cápsula tras la eliminación de la presión selectiva del fago.

- El análisis genómico y de frecuencias alélicas en la población de *K. pneumoniae* resistente descartó la existencia de alteraciones genéticas consistentes, confirmando que la mutación estable no constituye la base molecular principal de la resistencia en este sistema.

- La resistencia estable en el clon de *K. pneumoniae* CL13 está determinada por una deleción de tres nucleótidos en el gen *rfaH*. Esta mutación provoca la terminación prematura de la transcripción del clúster *cps*, confiriendo un fenotipo acapsular difícilmente reversible.

- La resistencia en la población mayoritaria se basa en cambios en el perfil transcriptómico, caracterizados fundamentalmente por la infraexpresión del clúster *cps*. Además, se observa una marcada desregulación de otras rutas metabólicas, como la del metabolismo energético (operón *glpABC*), que podrían contribuir al fenotipo observado.

- El uso de la población resistente bajo presión selectiva continua constituye una plataforma eficaz para el aislamiento de fagos en *K. pneumoniae* capaces de reconocer variantes con resistencia fenotípica, tal como demuestran CuaHET1 y CuaHET2.

- Los fagos CuaHET presentan una mayor eficacia en el retraso de resistencias que los fagos CuaMUT. Esto se debe a que CuaHET

infectan a la población mayoritaria (resistentes fenotípicos), mientras que el rango de hospedador de CuaMUT se restringe a la variante con la deleción en el gen *rfaH*.

- El retraso de la resistencia por el cóctel Cap62-CuaHET1 se basa en la selección de dos poblaciones complementarias (capsular y acapsular). Si bien el fago CuaHET1 es capaz de infectar las variantes resistentes por sí solo, la presencia de Cap62 es fundamental como presión selectiva para el mantenimiento del fenotipo acapsular y evitar su reversión.

- La coevolución experimental incrementa la capacidad del cóctel de fagos de retrasar la emergencia de resistencias bacterianas. Esta mejora está promovida principalmente por la adaptación del fago CuaHET1, debido a mutaciones en sus proteínas de unión al receptor.

- La presión selectiva ejercida simultáneamente por los dos fagos del cóctel durante la coevolución promueve el abandono de los mecanismos de resistencia reversible, forzando la fijación de mutaciones estables. Esto establece un modelo de jerarquía de defensas donde la resistencia genética solo se selecciona cuando la regulación fenotípica resulta ineficaz.

Bibliografía

[1] Russo TA, Marr CM. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Clinical Microbiology Reviews 2019;32:10.1128/cmr.00001-19. https://doi.org/10.1128/cmr.00001-19.

[2] Global antibiotic resistance surveillance report 2025 n.d. https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337 (accessed January 12, 2026).

[3] Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. The Lancet 2024;404:1199–226. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1.

[4] Arcari G, Carattoli A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant and hypervirulent Klebsiella pneumoniae high-risk clones. Pathogens and Global Health 2023;117:328–41. https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2121362.

[5] Rabi R, Enaya A, Sweileh MW, et al. Comprehensive Assessment of Colistin Induced Nephrotoxicity: Incidence, Risk Factors and Time Course. IDR 2023;16:3007–17. https://doi.org/10.2147/IDR.S409964.

[6] Wang T, Liu H, Huang H, et al. Colistin monotherapy or combination for the treatment of bloodstream infection caused by Klebsiella pneumoniae: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2024;24:161. https://doi.org/10.1186/s12879-024-09024-6.

[7] Narimisa N, Bavari S, Goodarzi F, et al. Prevalence of colistin resistance in clinical Klebsiella pneumoniae isolates: a systematic review and meta-analysis. Future Microbiology 2025;20:755–64. https://doi.org/10.1080/17460913.2025.2527534.

[8] Nguyen TNT, Howells G, Short FL. How Klebsiella pneumoniae controls its virulence. PLOS Pathogens 2025;21:e1013499. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1013499.

[9] Gao S, Jin W, Quan Y, et al. Bacterial capsules: Occurrence,

mechanism, and function. NPJ Biofilms Microbiomes 2024;10:21. https://doi.org/10.1038/s41522-024-00497-6.

[10] Xu L, Li J, Wu W, et al. Klebsiella pneumoniae capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. Virulence 2024;15:2439509. https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2439509.

[11] Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of Klebsiella pneumoniae during pathogenesis: A cautionary tale. Mol Microbiol 2020;113:883–8. https://doi.org/10.1111/mmi.14474.

[12] Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, et al. Identification of Klebsiella capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom 2016;2:e000102. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102.

[13] Edwards PR, Fife MA. Capsule types of Klebsiella. J Infect Dis 1952;91:92–104. https://doi.org/10.1093/infdis/91.1.92.

[14] Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, et al. Identification of Klebsiella capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom 2016;2:e000102. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102.

[15] Lam MMC, Wick RR, Judd LM, et al. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the Klebsiella pneumoniae species complex. Microb Genom 2022;8:000800. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000800.

[16] Stanton TD, Hetland MAK, Löhr IH, et al. Fast and accurate in silico antigen typing with Kaptive 3. Microb Genom 2025;11:001428. https://doi.org/10.1099/mgen.0.001428.

[17] Lin C-L, Chen F-H, Huang L-Y, et al. Effect in virulence of switching conserved homologous capsular polysaccharide genes from Klebsiella pneumoniae serotype K1 into K20. Virulence 2017;8:487–93. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1228508.

[18] Huang X, Li X, An H, et al. Capsule type defines the capability of Klebsiella pneumoniae in evading Kupffer cell capture in the liver. PLOS Pathogens 2022;18:e1010693.

[19] Bris JL, Varet H, Rocha EPC, et al. Serotype swapping in

Klebsiella spp. by plug-and-play 2025:2025.08.29.672822. https://doi.org/10.1101/2025.08.29.672822.

[20] Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, et al. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. Proceedings of the National Academy of Sciences 1999;96:2192–7. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2192.

[21] Mushegian AR. Are There 1031 Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? Journal of Bacteriology 2020;202:10.1128/jb.00052-20. https://doi.org/10.1128/jb.00052-20.

[22] Al-Shayeb B, Sachdeva R, Chen L-X, et al. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. Nature 2020;578:425–31. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2007-4.

[23] Heinrichs ME, Piedade GJ, Popa O, et al. Breaking the Ice: A Review of Phages in Polar Ecosystems. Methods Mol Biol 2024;2738:31–71. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3549-0_3.

[24] Huang D, Xia R, Chen C, et al. Adaptive strategies and ecological roles of phages in habitats under physicochemical stress. Trends in Microbiology 2024;32:902–16. https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.02.002.

[25] Liang X, Yang S, Radosevich M, et al. Bacteriophage-driven microbial phenotypic heterogeneity: ecological and biogeochemical importance. Npj Biofilms Microbiomes 2025;11:82. https://doi.org/10.1038/s41522-025-00727-5.

[26] Castledine M, Buckling A. Critically evaluating the relative importance of phage in shaping microbial community composition. Trends in Microbiology 2024;32:957–69. https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.02.014.

[27] Zrelovs N, Dislers A, Kazaks A. Motley Crew: Overview of the Currently Available Phage Diversity. Front Microbiol 2021;11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579452.

[28] Valencia-Toxqui G, Ramsey J. How to introduce a new bacteriophage on the block: a short guide to phage classification. Journal of Virology 2024;98:e01821-23. https://doi.org/10.1128/jvi.01821-23.

[29] Ofir G, Sorek R. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. Cell 2018;172:1260–70. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045.

[30] Dicks LMT, Vermeulen W. Bacteriophage–Host Interactions and the Therapeutic Potential of Bacteriophages. Viruses 2024;16:478. https://doi.org/10.3390/v16030478.

[31] Ferriol-González C, Concha-Eloko R, Bernabéu-Gimeno M, et al. Targeted phage hunting to specific Klebsiella pneumoniae clinical isolates is an efficient antibiotic resistance and infection control strategy. Microbiol Spectr 2024;12:e0025424. https://doi.org/10.1128/spectrum.00254-24.

[32] Lourenço M, Osbelt L, Passet V, et al. Phages against Noncapsulated Klebsiella pneumoniae: Broader Host range, Slower Resistance. Microbiology Spectrum 2023;11:e04812-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.04812-22.

[33] Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, et al. Modeling the Architecture of Depolymerase-Containing Receptor Binding Proteins in Klebsiella Phages. Front Microbiol 2019;10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02649.

[34] Domingo-Calap P, Beamud B, Mora-Quilis L, et al. Isolation and Characterization of Two Klebsiella pneumoniae Phages Encoding Divergent Depolymerases. Int J Mol Sci 2020;21:3160. https://doi.org/10.3390/ijms21093160.

[35] Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, et al. Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. Structure 2020;28:613-624.e4. https://doi.org/10.1016/j.str.2020.04.015.

[36] Latka A, Maciejewska B, Majkowska-Skrobek G, et al.

Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. Appl Microbiol Biotechnol 2017;101:3103–19. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8224-6.

[37] Egido JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, et al. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. FEMS Microbiol Rev 2022;46:fuab048. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048.

[38] Costa P, Pereira C, Romalde JL, et al. A game of resistance: War between bacteria and phages and how phage cocktails can be the solution. Virology 2024;599:110209. https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110209.

[39] Hesse S, Rajaure M, Wall E, et al. Phage Resistance in Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae ST258 Evolves via Diverse Mutations That Culminate in Impaired Adsorption. mBio 2020;11:10.1128/mbio.02530-19. https://doi.org/10.1128/mbio.02530-19.

[40] Wang S, Ding Q, Zhang Y, et al. Evolution of Virulence, Fitness, and Carbapenem Resistance Transmission in ST23 Hypervirulent Klebsiella pneumoniae with the Capsular Polysaccharide Synthesis Gene wcaJ Inserted via Insertion Sequence Elements. Microbiology Spectrum 2022;10:e02400-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02400-22.

[41] Fu Y, Yin M, Cao L, et al. Capsule mutations serve as a key strategy of phage resistance evolution of K54 hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Commun Biol 2025;8:257. https://doi.org/10.1038/s42003-025-07687-8.

[42] Song L, Yang X, Huang J, et al. Phage Selective Pressure Reduces Virulence of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae Through Mutation of the wzc Gene. Front Microbiol 2021;12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.739319.

[43] Tang M, Huang Z, Zhang X, et al. Phage resistance formation and fitness costs of hypervirulent Klebsiella pneumoniae mediated by K2 capsule-specific phage and the corresponding

mechanisms. Front Microbiol 2023;14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1156292.

[44] Li J, Yan B, He B, et al. Development of phage resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with reduced virulence: a case report of a personalised phage therapy. Clinical Microbiology and Infection 2023;29:1601.e1-1601.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.08.022.

[45] van der Woude MW, Bäumler AJ. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. Clin Microbiol Rev 2004;17:581–611. https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611.2004.

[46] van der Woude MW. Phase variation: how to create and coordinate population diversity. Curr Opin Microbiol 2011;14:205–11. https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.002.

[47] Turkington CJR, Morozov A, Clokie MRJ, et al. Phage-Resistant Phase-Variant Sub-populations Mediate Herd Immunity Against Bacteriophage Invasion of Bacterial Meta-Populations. Front Microbiol 2019;10:1473. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01473.

[48] Adler BA, Kazakov AE, Zhong C, et al. The genetic basis of phage susceptibility, cross-resistance and host-range in Salmonella. Microbiology 2021;167:001126. https://doi.org/10.1099/mic.0.001126.

[49] Gao D, Pang S, Zhao Y, et al. Polyvalent phage GSP004 recognizes O-antigen polysaccharide receptors in Salmonella and Escherichia coli through tail fiber protein ORF208. Journal of Virology 2025;99:e00810-25. https://doi.org/10.1128/jvi.00810-25.

[50] Nucci A, Bris JL, Diaz-Diaz S, et al. Phenotypic heterogeneity of capsule production across opportunistic pathogens. mBio 2025. https://doi.org/10.1128/mbio.01807-25.

[51] Dorman MJ, Feltwell T, Goulding DA, et al. The Capsule Regulatory Network of Klebsiella pneumoniae Defined by density-TraDISort. mBio 2018;9:e01863-18.

https://doi.org/10.1128/mBio.01863-18.

[52] Wei D-W, Song Y, Li Y, et al. Insertion sequences accelerate genomic convergence of multidrug resistance and hypervirulence in Klebsiella pneumoniae via capsular phase variation. Genome Med 2025;17:45. https://doi.org/10.1186/s13073-025-01474-0.

[53] Wu K, Lin X, Lu Y, et al. RNA interactome of hypervirulent Klebsiella pneumoniae reveals a small RNA inhibitor of capsular mucoviscosity and virulence. Nat Commun 2024;15:6946. https://doi.org/10.1038/s41467-024-51213-z.

[54] Brockhurst MA, Koskella B, Zhang Q-G. Bacteria-Phage Antagonistic Coevolution and the Implications for Phage Therapy. Bacteriophages, Springer, Cham; 2021, p. 231–51. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_7.

[55] Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. FEMS Microbiol Rev 2014;38:916–31. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072.

[56] Buckling A, Rainey PB. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. Proc Biol Sci 2002;269:931–6. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1945.

[57] Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, et al. Viral mutation rates. J Virol 2010;84:9733–48. https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10.

[58] Ferriol-González C, Domingo-Calap P. The host range of generalist and specialist phages in capsule-diverse Klebsiella hosts is driven by the evolvability of receptor-binding proteins. PLOS Biology 2025;23:e3003515. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3003515.

[59] Abedon ST. Phage Therapy: Combating Evolution of Bacterial Resistance to Phages. Viruses 2025;17. https://doi.org/10.3390/v17081094.

[60] Borin JM, Avrani S, Barrick JE, et al. Coevolutionary phage training leads to greater bacterial suppression and delays the

evolution of phage resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 2021;118:e2104592118. https://doi.org/10.1073/pnas.2104592118.

[61] Kortright KE, Chan BK, Evans BR, et al. Arms race and fluctuating selection dynamics in Pseudomonas aeruginosa bacteria coevolving with phage OMKO1. J Evol Biol 2022;35:1475–87. https://doi.org/10.1111/jeb.14095.

[62] Castledine M, Buckling A. Critically evaluating the relative importance of phage in shaping microbial community composition. Trends in Microbiology 2024;32:957–69. https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.02.014.

[63] Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Res 2018;7:1338. https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2.

[64] Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, et al. Using SPAdes De Novo Assembler. Current Protocols in Bioinformatics 2020;70:e102. https://doi.org/10.1002/cpbi.102.

[65] Bouras G, Nepal R, Houtak G, et al. Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. Bioinformatics 2023;39:btac776. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac776.

[66] Terzian P, Olo Ndela E, Galiez C, et al. PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. NAR Genom Bioinform 2021;3:lqab067. https://doi.org/10.1093/nargab/lqab067.

[67] Hackl T, Ankenbrand M, Adrichem B van, et al. gggenomes: effective and versatile visualizations for comparative genomics 2024. https://doi.org/10.48550/arXiv.2411.13556.

[68] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403–10. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

[69] Moraru C, Varsani A, Kropinski AM. VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. Viruses 2020;12:1268.

https://doi.org/10.3390/v12111268.

[70] Hockenberry AJ, Wilke CO. BACPHLIP: predicting bacteriophage lifestyle from conserved protein domains. PeerJ 2021;9:e11396. https://doi.org/10.7717/peerj.11396.

[71] Yukgehnaish K, Rajandas H, Parimannan S, et al. PhageLeads: Rapid Assessment of Phage Therapeutic Suitability Using an Ensemble Machine Learning Approach. Viruses 2022;14:342. https://doi.org/10.3390/v14020342.

[72] Concha-Eloko R, Stock M, Baets BD, et al. DepoScope: Accurate phage depolymerase annotation and domain delineation using large language models. PLOS Computational Biology 2024;20:e1011831. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011831.

[73] Vieira MF, Duarte J, Domingues R, et al. *PhageDPO*: A machine-learning based computational framework for identifying phage depolymerases. Computers in Biology and Medicine 2025;188:109836. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2025.109836.

[74] Magill DJ, Skvortsov TA. DePolymerase Predictor (DePP): a machine learning tool for the targeted identification of phage depolymerases. BMC Bioinformatics 2023;24:208. https://doi.org/10.1186/s12859-023-05341-w.

[75] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature 2024;630:493–500. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w.

[76] Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM 2013. https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997.

[77] Seemann T. tseemann/snippy 2024.

[78] Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing

datasets. Nucleic Acids Research 2012;40:11189–201. https://doi.org/10.1093/nar/gks918.

[79] Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. Methods Mol Biol 2014;1151:165–88. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6_12.

[80] Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol 2011;29:24–6. https://doi.org/10.1038/nbt.1754.

[81] R core team, R: A language and environment for Statistical computing, R Foundation forStatistical computing (2022). www.R-project.org/ n.d.

[82] RStudio team, RStudio: integrated development for R, RStudio (2020). www.rstudio.com/ n.d.

[83] Döhler S, Durand G, Roquain E. New FDR bounds for discrete and heterogeneous tests. Electronic Journal of Statistics 2018;12:1867–900. https://doi.org/10.1214/18-EJS1441.

[84] Wishart DS, Han S, Saha S, et al. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. Nucleic Acids Res 2023;51:W443–50. https://doi.org/10.1093/nar/gkad382.

[85] Kim D, Paggi JM, Park C, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol 2019;37:907–15. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4.

[86] Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 2014;30:923–30. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656.

[87] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 2014;15:550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.

[88] Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.

Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, https://ggplot2.tidyverse.org n.d.

[89] Create Dendrograms and Tree Diagrams Using ggplot2 n.d. https://andrie.github.io/ggdendro/ (accessed January 21, 2026).

[90] Lin T-L, Hsieh P-F, Huang Y-T, et al. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of Klebsiella pneumoniae: implication in typing and treatment. J Infect Dis 2014;210:1734–44. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu332.

[91] Yin M, Cao L, Fu Y, et al. A novel tail fiber protein triggers phage DNA ejection by recognizing lipopolysaccharides of K54 hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Microbiology Spectrum 2025;13:e02171-25. https://doi.org/10.1128/spectrum.02171-25.

[92] Mourali D, Kazdaghli R, Gara-Ali M, et al. Isolation and Characterization of Lytic Phages Infecting Clinical Klebsiella pneumoniae from Tunisia. Antibiotics 2024;13. https://doi.org/10.3390/antibiotics13121154.

[93] Martin T, Theodoridis L, Stent E, et al. Isolation and characterisation of Klebsiella pneumoniae bacteriophages vB_Kpn_Lilla1 and vB_Kpn_Lilla2. Arch Virol 2025;170:186. https://doi.org/10.1007/s00705-025-06374-7.

[94] Choi Y-J, Shamsuzzaman M, Park C, et al. Overcoming phage resistance: efficacy of sequential phage-colistin therapy against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. Microbiology Spectrum 2025;13:e00855-25. https://doi.org/10.1128/spectrum.00855-25.

[95] Yoo S, Lee K-M, Kim N, et al. Designing phage cocktails to combat the emergence of bacteriophage-resistant mutants in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae. Microbiology Spectrum 2023;12:e01258-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.01258-23.

[96] Zhao W, Du C, Chen Z, et al. Identification of the Genetic Basis of Phage Resistance in Sequentially Generated Phage-

Resistant Klebsiella pneumoniae Using an Established Phage Library. Antibiotics 2025;14. https://doi.org/10.3390/antibiotics14111056.

[97] Chen H, Liu H, Gong Y, et al. A Klebsiella-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both in vitro and in vivo. Npj Biofilms Microbiomes 2024;10:127. https://doi.org/10.1038/s41522-024-00603-8.

[98] Haque MF, Tarusawa T, Ushida C, et al. cAMP-CRP-activated E. coli causes growth arrest under stress conditions. Front Microbiol 2025;16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1597530.

[99] Meyer L, Germain E, Maisonneuve E. Regulation of ytfK by cAMP-CRP Contributes to SpoT-Dependent Accumulation of (p)ppGpp in Response to Carbon Starvation YtfK Responds to Glucose Exhaustion. Front Microbiol 2021;12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.775164.

[100] Zhao L, Zhou S-Y, Fu Y, et al. A dual program for CRP-mediated regulation in bacterial alarmone (p)ppGpp. mBio n.d.;15:e02430-24. https://doi.org/10.1128/mbio.02430-24.

[101] Abedon ST. Lysis from without. Bacteriophage 2011;1:46–9. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980.

[102] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol 2010;8:317–27. https://doi.org/10.1038/nrmicro2315.

[103] Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, et al. Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage. Proceedings of the National Academy of Sciences 2006;103:19039–44. https://doi.org/10.1073/pnas.0609428103.

[104] Li N, Zeng Y, Wang M, et al. Characterization of Phage Resistance and Their Impacts on Bacterial Fitness in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology Spectrum 2022;10:e02072-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02072-22.

[105] Jung S-J, Ashrafudoulla M, Bai J, et al. Receptor-specific phage

resistance induced phenotypic and gene expression shifts in *Salmonella* Typhimurium impacting biofilm formation on food contact surfaces. Food Microbiology 2026;134:104937. https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104937.

[106] Chen P, Sun H, Ren H, et al. LamB, OmpC, and the Core Lipopolysaccharide of Escherichia coli K-12 Function as Receptors of Bacteriophage Bp7. Journal of Virology 2020;94:10.1128/jvi.00325-20. https://doi.org/10.1128/jvi.00325-20.

[107] Li N, Zeng Y, Wang M, et al. Characterization of Phage Resistance and Their Impacts on Bacterial Fitness in Pseudomonas aeruginosa. Microbiol Spectr n.d.;10:e02072-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02072-22.

[108] van der Woude M, Braaten B, Low D. Epigenetic phase variation of the pap operon in Escherichia coli. Trends Microbiol 1996;4:5–9. https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)81498-3.

[109] Cota I, Blanc-Potard AB, Casadesús J. STM2209-STM2208 (opvAB): A Phase Variation Locus of Salmonella enterica Involved in Control of O-Antigen Chain Length. PLOS ONE 2012;7:e36863. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036863.

[110] Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, et al. Epigenetic Control of Salmonella enterica O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance. PLoS Genet 2015;11:e1005667. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005667.

[111] Cota I, Bunk B, Spröer C, et al. OxyR-dependent formation of DNA methylation patterns in OpvABOFF and OpvABON cell lineages of Salmonella enterica. Nucleic Acids Res 2016;44:3595–609. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1483.

[112] Ghosh D, Pal A, Mohapatra S, et al. Distinct epigenetic signatures of classical and hypervirulent Klebsiella pneumoniae. mSphere 2023;9:e00464-23. https://doi.org/10.1128/msphere.00464-23.

[113] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 2001;55:165–99. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165.

[114] Zhao L, Xue T, Shang F, et al. Staphylococcus aureus AI-2 Quorum Sensing Associates with the KdpDE Two-Component System To Regulate Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence. Infection and Immunity 2010;78:3506–15. https://doi.org/10.1128/iai.00131-10.

[115] Chen L, Wilksch JJ, Liu H, et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in Klebsiella pneumoniae. Journal of Medical Microbiology 2020;69:402–13. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001148.

[116] Fernández-Garcia L, Blasco L, Bleriot I, et al. Phages and quorum sensing: findings to consider in phage therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2025. https://doi.org/10.1007/s10096-025-05375-3.

[117] Silva-Bea S, Maseda P, Otero A, et al. Regulatory effects on virulence and phage susceptibility revealed by sdiA mutation in Klebsiella pneumoniae. Front Cell Infect Microbiol 2025;15. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1562402.

[118] Mu H, Han F, Wang Q, et al. Recent functional insights into the magic role of (p)ppGpp in growth control. Computational and Structural Biotechnology Journal 2023;21:168–75. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.063.

[119] van Delden C, Comte R, Bally AM. Stringent Response Activates Quorum Sensing and Modulates Cell Density-Dependent Gene Expression inPseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology 2001;183:5376–84. https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5376-5384.2001.

[120] Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, et al. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. Nature 2017;541:488–93. https://doi.org/10.1038/nature21049.

[121] Rodrigues MV, Kis P, Xavier KB, et al. Synthesis and Potential

of Autoinducer-2 and Analogs to Manipulate Inter-Species Quorum Sensing. Israel Journal of Chemistry 2023;63:e202200091. https://doi.org/10.1002/ijch.202200091.

[122] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, et al. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. Science 2002;297:1183–6. https://doi.org/10.1126/science.1070919.

[123] Chapman-McQuiston E, Wu XL. Stochastic Receptor Expression Allows Sensitive Bacteria to Evade Phage Attack. Part I: Experiments. Biophysical Journal 2008;94:4525–36. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120212.

[124] Chapman-McQuiston E, Wu XL. Stochastic receptor expression allows sensitive bacteria to evade phage attack. Part II: theoretical analyses. Biophys J 2008;94:4537–48. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121723.

[125] Süel GM, Kulkarni RP, Dworkin J, et al. Tunability and Noise Dependence in Differentiation Dynamics. Science 2007;315:1716–9. https://doi.org/10.1126/science.1137455.

[126] Lee H, Popodi E, Tang H, et al. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences 2012;109:E2774–83. https://doi.org/10.1073/pnas.1210309109.

[127] Schroeder JW, Yeesin P, Simmons LA, et al. Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol 2018;53:29–48. https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1394262.

[128] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. Cell 2009;136:615–28. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043.

[129] Goh KJ, Altuvia Y, Argaman L, et al. RIL-seq reveals extensive involvement of small RNAs in virulence and capsule regulation in hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Nucleic Acids Res 2024;52:9119–38. https://doi.org/10.1093/nar/gkae440.

[130] Pan Y-J, Lin T-L, Chen C-T, et al. Genetic analysis of capsular

polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of Klebsiella spp. Sci Rep 2015;5:15573. https://doi.org/10.1038/srep15573.

[131] Zuber PK, Schweimer K, Rösch P, et al. Reversible fold-switching controls the functional cycle of the antitermination factor RfaH. Nat Commun 2019;10:702. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08567-6.

[132] Burmann BM, Knauer SH, Sevostyanova A, et al. An α helix to β barrel domain switch transforms the transcription factor RfaH into a translation factor. Cell 2012;150:291–303. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.042.

[133] Kang JY, Mooney RA, Nedialkov Y, et al. Structural Basis for Transcript Elongation Control by NusG Family Universal Regulators. Cell 2018;173:1650-1662.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.017.

[134] Artsimovitch I, Landick R. The transcriptional regulator RfaH stimulates RNA chain synthesis after recruitment to elongation complexes by the exposed nontemplate DNA strand. Cell 2002;109:193–203. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00724-9.

[135] Bailey MJA, Hughes C, Koronakis V. RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. Molecular Microbiology 1997;26:845–51. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6432014.x.

[136] Production of Oligosaccharides in Microbes 2007:923–47. https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00122-7.

[137] Walker KA, Miner TA, Palacios M, et al. A Klebsiella pneumoniae Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. mBio 2019;10:10.1128/mbio.00089-19. https://doi.org/10.1128/mbio.00089-19.

[138] McCallum KL, Whitfield C. The rcsA gene of Klebsiella pneumoniae O1:K20 is involved in expression of the serotype-

specific K (capsular) antigen. Infect Immun 1991;59:494–502. https://doi.org/10.1128/iai.59.2.494-502.1991.

[139] Wehland M, Bernhard F. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. J Biol Chem 2000;275:7013–20. https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7013.

[140] Huang S-H, Wang C-K, Peng H-L, et al. Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in Klebsiella pneumoniae. BMC Microbiol 2012;12:148. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-148.

[141] Wu C-C, Wang C-K, Chen Y-C, et al. IscR regulation of capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in Klebsiella pneumoniae CG43. PLoS One 2014;9:e107812. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107812.

[142] Lin C-T, Chen Y-C, Jinn T-R, et al. Role of the cAMP-Dependent Carbon Catabolite Repression in Capsular Polysaccharide Biosynthesis in Klebsiella pneumoniae. PLOS ONE 2013;8:e54430. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054430.

[143] Ou Q, Fan J, Duan D, et al. Involvement of cAMP receptor protein in biofilm formation, fimbria production, capsular polysaccharide biosynthesis and lethality in mouse of Klebsiella pneumoniae serotype K1 causing pyogenic liver abscess. J Med Microbiol 2017;66:1–7. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000391.

[144] Krol E, Werel L, Essen LO, et al. Structural and functional diversity of bacterial cyclic nucleotide perception by CRP proteins. microLife 2023;4:uqad024. https://doi.org/10.1093/femsml/uqad024.

[145] Iuchi S, Cole ST, Lin EC. Multiple regulatory elements for the glpA operon encoding anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the glpD operon encoding aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase in Escherichia coli: further characterization of respiratory control. Journal of Bacteriology 1990;172:179–84. https://doi.org/10.1128/jb.172.1.179-

184.1990.

[146] Varga MER, Weiner JH. Physiological role of GlpB of anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Escherichia coli. Biochem Cell Biol 1995;73:147–53. https://doi.org/10.1139/o95-018.

[147] Spoering AL, Vulić M, Lewis K. GlpD and PlsB Participate in Persister Cell Formation in Escherichia coli. Journal of Bacteriology 2006;188:5136–44. https://doi.org/10.1128/jb.00369-06.

[148] Li W, Li Y, Shi W, et al. GlpD involved in the virulence and persistence of a marine pathogen *Vibrio splendidus*. Aquaculture 2024;585:740691. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740691.

[149] Goswami M, Narayana Rao AVSS. Transcriptome Profiling Reveals Interplay of Multifaceted Stress Response in Escherichia coli on Exposure to Glutathione and Ciprofloxacin. mSystems 2018;3:10.1128/msystems.00001-18. https://doi.org/10.1128/msystems.00001-18.

[150] Lewis K. Persister Cells. Annual Review of Microbiology 2010;64:357–72. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306.

[151] Wu YL, Liu KS, Yin XT, et al. GlpC gene is responsible for biofilm formation and defense against phagocytes and imparts tolerance to pH and organic solvents in Proteus vulgaris. Genet Mol Res 2015;14:10619–29. https://doi.org/10.4238/2015.September.9.3.

[152] Huang Q, Abdalla AE, Xie J. Phylogenomics of Mycobacterium Nitrate Reductase Operon. Curr Microbiol 2015;71:121–8. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0838-2.

[153] Weber I, Fritz C, Ruttkowski S, et al. Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of Mycobacterium bovis BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. Molecular Microbiology 2000;35:1017–25. https://doi.org/10.1046/j.1365-

2958.2000.01794.x.

[154] Nakamya MF, Ayoola MB, Park S, et al. The Role of Cadaverine Synthesis on Pneumococcal Capsule and Protein Expression. Medical Sciences 2018;6. https://doi.org/10.3390/medsci6010008.

[155] Scanlan PD, Buckling A, Hall AR. Experimental evolution and bacterial resistance: (co)evolutionary costs and trade-offs as opportunities in phage therapy research. Bacteriophage 2015;5:e1050153. https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1050153.

[156] Buffet A, Rocha EPC, Rendueles O. Nutrient conditions are primary drivers of bacterial capsule maintenance in Klebsiella. Proc Biol Sci 2021;288:20202876. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2876.

[157] Bull JJ, Vegge CS, Schmerer M, et al. Phenotypic resistance and the dynamics of bacterial escape from phage control. PLoS One 2014;9:e94690. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094690.

[158] Majkowska-Skrobek G, Markwitz P, Sosnowska E, et al. The evolutionary trade-offs in phage-resistant Klebsiella pneumoniae entail cross-phage sensitization and loss of multidrug resistance. Environmental Microbiology 2021;23:7723–40. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15476.

[159] Izquierdo L, Abitiu N, Coderch N, et al. The inner-core lipopolysaccharide biosynthetic waaE gene: function and genetic distribution among some Enterobacteriaceae. Microbiology 2002;148:3485–96. https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3485.

[160] Wenner N, Bertola A, Larsson L, et al. The intestinal environment potentiates bacteriophage adaptation in response to phenotypic resistance in Salmonella Typhimurium. Proceedings of the National Academy of Sciences 2025;122:e2507909122. https://doi.org/10.1073/pnas.2507909122.

[161] Kunisch F, Campobasso C, Wagemans J, et al. Targeting Pseudomonas aeruginosa biofilm with an evolutionary trained bacteriophage cocktail exploiting phage resistance trade-offs. Nat Commun 2024;15:8572. https://doi.org/10.1038/s41467-024-52595-w.

[162] Yu Y, Wang M, Ju L, et al. Phage-mediated virulence loss and antimicrobial susceptibility in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. mBio 2024;16:e02957-24. https://doi.org/10.1128/mbio.02957-24.

[163] Wang M, Wei J, Jiang L, et al. Coevolutionary phage training and Joint application delays the emergence of phage resistance in Pseudomonas aeruginosa. Virus Evol 2023;9:vead067. https://doi.org/10.1093/ve/vead067.

[164] Burmeister AR, Tzintzun-Tapia E, Roush C, et al. Experimental Evolution of the TolC-Receptor Phage U136B Functionally Identifies a Tail Fiber Protein Involved in Adsorption through Strong Parallel Adaptation. Applied and Environmental Microbiology 2023;89:e00079-23. https://doi.org/10.1128/aem.00079-23.

[165] Petrie KL, Palmer ND, Johnson DT, et al. Destabilizing mutations encode nongenetic variation that drives evolutionary innovation. Science 2018;359:1542–5. https://doi.org/10.1126/science.aar1954.

[166] Strobel HM, Labador SD, Basu D, et al. Viral Receptor-Binding Protein Evolves New Function through Mutations That Cause Trimer Instability and Functional Heterogeneity. Mol Biol Evol 2024;41:msae056. https://doi.org/10.1093/molbev/msae056.

[167] Doud MB, Gupta A, Li V, et al. Competition-driven eco-evolutionary feedback reshapes bacteriophage lambda's fitness landscape and enables speciation. Nat Commun 2024;15:863. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45008-5.

[168] Castledine M, Sierocinski P, Inglis M, et al. Greater Phage Genotypic Diversity Constrains Arms-Race Coevolution. Front Cell Infect Microbiol 2022;12.

https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.834406.

[169] Doud MB, Gupta A, Li V, et al. Competition-driven eco-evolutionary feedback reshapes bacteriophage lambda's fitness landscape and enables speciation. Nat Commun 2024;15:863. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45008-5.

[170] Williams HT. Phage-induced diversification improves host evolvability. BMC Evol Biol 2013;13:17. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-17.

[171] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clinical Microbiology Reviews 2019;32:10.1128/cmr.00066-18. https://doi.org/10.1128/cmr.00066-18.

[172] Kaneko T, Nakatsuka K, Tsuneda S. Phage cocktails: state-of-the-art technologies and strategies for effective design. FEMS Microbiol Rev 2026;50:fuaf061. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaf061.

[173] Kim MK, Chen Q, Echterhof A, et al. A blueprint for broadly effective bacteriophage-antibiotic cocktails against bacterial infections. Nat Commun 2024;15:9987. https://doi.org/10.1038/s41467-024-53994-9.

[174] Abedon ST, Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ. Phage Cocktail Development for Bacteriophage Therapy: Toward Improving Spectrum of Activity Breadth and Depth. Pharmaceuticals (Basel) 2021;14:1019. https://doi.org/10.3390/ph14101019.

[175] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Unlocking the next generation of phage therapy: the key is in the receptors. Curr Opin Biotechnol 2021;68:115–23. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.10.002.

[176] Rotman E, McClure S, Glazier J, et al. Rapid design of bacteriophage cocktails to suppress the burden and virulence of gut-resident carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Cell Host Microbe 2024;32:1988-2003.e8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.09.004.

[177] Marolda CL, Valvano MA. Promoter Region of the Escherichia coli O7-Specific Lipopolysaccharide Gene Cluster: Structural and Functional Characterization of an Upstream Untranslated mRNA Sequence. Journal of Bacteriology 1998;180:3070–9. https://doi.org/10.1128/jb.180.12.3070-3079.1998.

[178] Klein G, Stupak A, Biernacka D, et al. Multiple Transcriptional Factors Regulate Transcription of the *rpoE* Gene in *Escherichia coli* under Different Growth Conditions and When the Lipopolysaccharide Biosynthesis Is Defective*. Journal of Biological Chemistry 2016;291:22999–3019. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748954.

[179] Hao G, Yuan C, Shu R, et al. O-antigen serves as a two-faced host factor for bacteriophage NJS1 infecting nonmucoid Klebsiella pneumoniae. Microb Pathog 2021;155:104897. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104897.

[180] Kulikov EE, Golomidova AK, Prokhorov NS, et al. High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies. Sci Rep 2019;9:2958. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39590-8.

[181] Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay[S]. Journal of Lipid Research 2015;56:1363–9. https://doi.org/10.1194/jlr.D059725.

[182] Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, et al. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. Sci Rep 2015;5:14802. https://doi.org/10.1038/srep14802.

[183] Chechushkov A, Kozlova Y, Baykov I, et al. Influence of Caudovirales Phages on Humoral Immunity in Mice. Viruses 2021;13. https://doi.org/10.3390/v13071241.

[184] Hall AR, De Vos D, Friman V-P, et al. Effects of Sequential and Simultaneous Applications of Bacteriophages on Populations of Pseudomonas aeruginosa In Vitro and in Wax Moth Larvae.

Applied and Environmental Microbiology 2012;78:5646–52. https://doi.org/10.1128/AEM.00757-12.

[185] Gliźniewicz M, Dołęgowska B, Augustyniak A, et al. Effects of sequential administration of phage cocktail, ciprofloxacin, and caspofungin on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* dual-species biofilms. Microbes and Infection 2025;27:105531. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2025.105531.

[186] Tang M, Yao Z, Liu Y, et al. Host immunity involvement in the outcome of phage therapy against hypervirulent Klebsiella pneumoniae infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2024;68:e01429-23. https://doi.org/10.1128/aac.01429-23.

[187] Roach DR, Leung CY, Henry M, et al. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. Cell Host & Microbe 2017;22:38-47.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018.

Anexo

En este anexo se detalla la descripción de todos los documentos asociados al material suplementario. Asimismo, con el objetivo de facilitar la consulta inmediata de los resultados, se incluyen aquí las figuras y los datos más relevantes. El material suplementario completo asociado a esta tesis puede consultarse en el repositorio Figshare a través del siguiente enlace permanente: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.

Material suplementario (CAPÍTULO 1)

Figura S1.1. Ensayo con medio condicionado para evaluar la regulación negativa de la cápsula inducida por señales solubles. Micrografías (tinción de nigrosina-cristal violeta) de *K. pneumoniae* cultivada en distintos sobrenadantes. Se cultivaron bacterias WT en sobrenadante procedente de poblaciones resistentes infectadas por fagos (izquierda), sobrenadante de cultivos control no infectados (centro), o medio fresco (derecha). La barra de escala representa 10 µm.

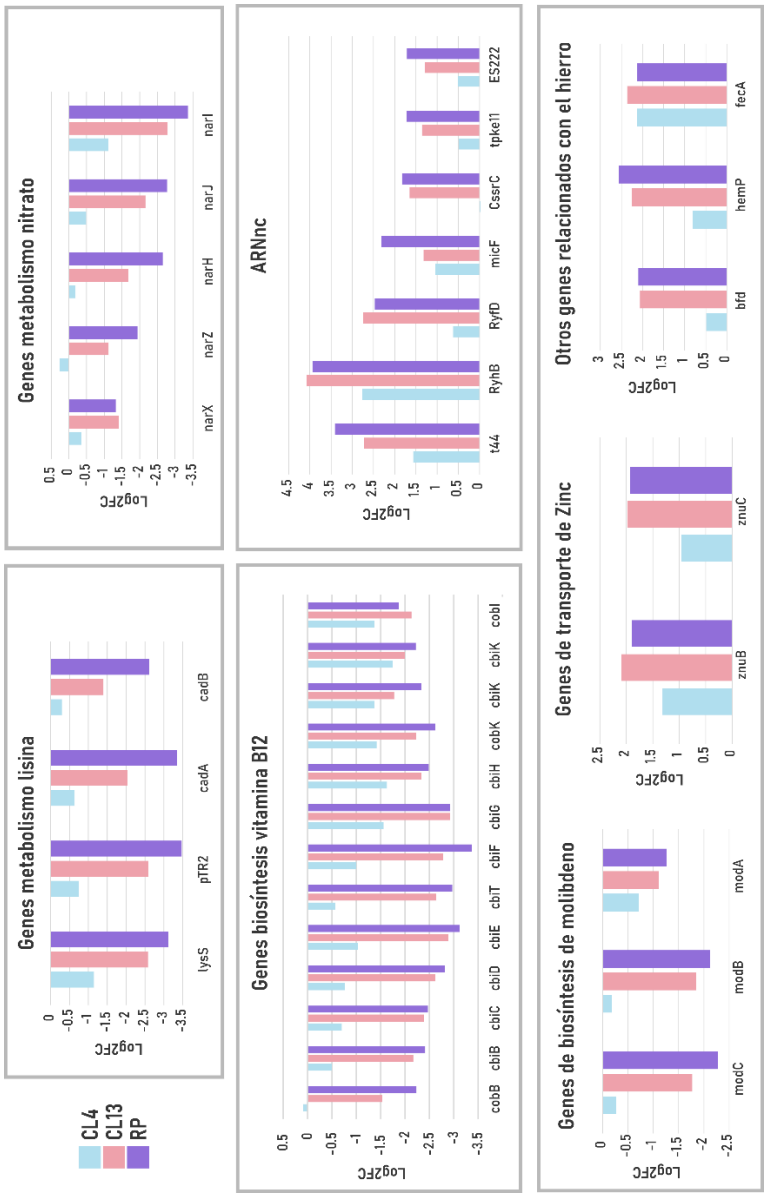


Figura S1.2. Perfil de expresión de otros clusters de genes. Se presenta la expresión génica diferencial (Log_2FC) de los cultivos CL4 (azul), CL13 (salmón) y RP (violeta), relativa al cultivo WT.

Datos S1.1. Perfil de sensibilidad/resistencia de cultivos seleccionados tras la infección por Cap62. La resistencia se evaluó mediante ensayos de *spot* e infecciones en medio líquido. Se incluye una leyenda detallada en el propio documento. Archivo disponible en repositorio online: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.

Datos S1.2. Diferencias en la frecuencia alélica alternativa entre los cultivos WT y RP. Para cada posición, se proporcionan los recuentos de alelos consenso (Cons) y alternativos (Alt) tanto para los cultivos WT como RP. La frecuencia alélica alternativa (AF) se calcula como la proporción entre el recuento de alelos alternativos y el recuento total de alelos en cada cultivo. La diferencia absoluta en la frecuencia alélica alternativa (|ΔAF|) se define como |AF_RP – AF_WT|. Se destacan aquellas posiciones con un valor q < 0.05 (prueba exacta de Fisher con corrección FDR) y una |ΔAF| ≥ 0.05, especificándose la anotación génica correspondiente. El conjunto completo de datos, se encuentra disponible para su consulta en el repositorio online: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.

Pos (pb)	q-valor	|ΔAF|	ID	Nombre	Producto
2620153	1.11×10^{-9}	0.116	CDS_2489	ltrA	group II intron reverse transcriptase/maturase
2620168	1.64×10^{-9}	0.114	CDS_2489	ltrA	group II intron reverse transcriptase/maturase
2620165	1.64×10^{-9}	0.113	CDS_2489	ltrA	group II intron reverse transcriptase/maturase
2620141	3.63×10^{-9}	0.107	CDS_2489	ltrA	group II intron reverse transcriptase/maturase
2620006	2.76×10^{-6}	0.090	CDS_2489	ltrA	group II intron reverse transcriptase/maturase
1245521	4.59×10^{-2}	0.086	CDS_1160	tnp	IS1 family transposase
39535	2.93×10^{-4}	0.074	CDS_0038	uhpT	hexose-6-phosphate:phosphate antiporter

663914	4.59×10^{-2}	0.055	CDS_0595	htpX	Zn-dependent protease with chaperone function
39535	1.58×10^{-2}	0.053	CDS_0038	uhpT	hexose-6-phosphate:phosphate antiporter
3344707	1.54×10^{-2}	0.050	CDS_3220	phrB	deoxyribodipyrimidine photo-lyase

Datos S1.3. Valores de expresión normalizada de los genes con mayor peso en la varianza transcriptómica. Se presentan los valores VST (del inglés, *variance stabilizing transformation*) correspondientes a los genes que mostraron mayor contribución a la separación de los grupos en el PCA. La tabla incluye los datos de expresión de las tres réplicas biológicas para los cultivos WT, RP, CL4 y CL13, así como la información de anotación genómica asociada. Archivo disponible en repositorio online: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.

Datos S1.4. Expresión génica de los cultivos resistentes a fagos respecto al WT. Para simplificar, únicamente se muestran los genes con un valor *p* ajustado (*p-aj*) < 0.0001. Los datos correspondientes a cada cultivo resistente (RP, CL13 y CL4) se presentan en hojas de Excel independientes. Para cada cultivo, la tabla incluye el identificador (ID), el cambio en los niveles de expresión (*Log2FoldChange*, L2FC) respecto al WT, el valor *p* ajustado determinado mediante la prueba de Wald (*p-aj*), el estado de la regulación (sobreexpresado o infraexpresado) y otras características de interés como el tipo de secuencia, el nombre del gen y el nombre del producto. Archivo disponible en repositorio online: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.

Material suplementario (CAPÍTULO 2)

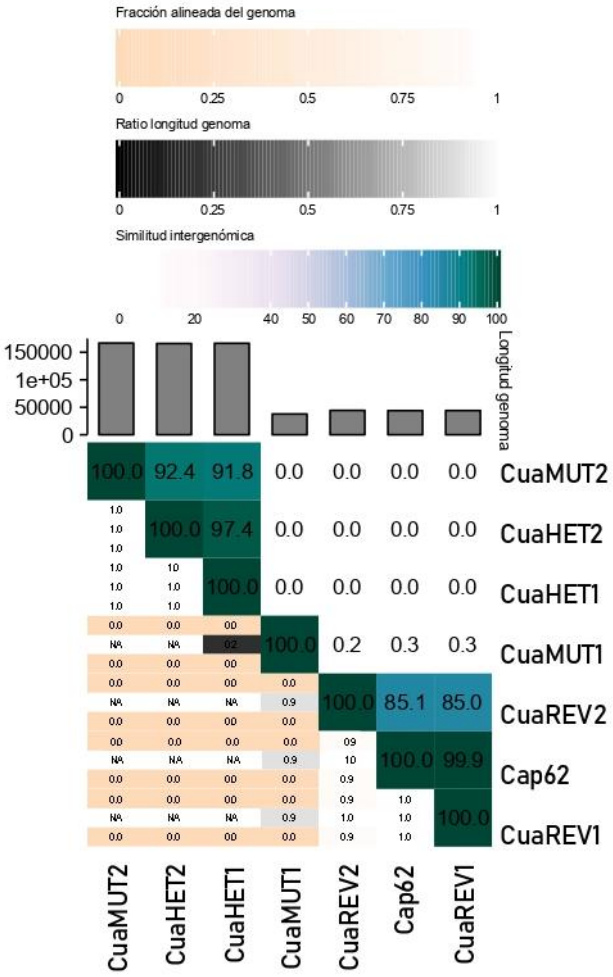


Figura S2.1. Similitud intergenómica calculada empleando VIRIDIC.

Tabla S2.1. Predicción del ciclo de vida de los fagos por BACPHLIP.

Fago	Virulento	Temperado
Cap62	1.0	0.0
CuaREV1	1.0	0.0
CuaREV2	0.975	0.025
CuaMUT1	0.998	0.002
CuaMUT2	0.975	0.025
CuaHET1	0.962	0.038
CuaHET2	0.962	0.038

Tabla S2.2. Predicción de proteínas con potencial actividad depolimerasa. Se muestran las CDS que fueron predichas con una probabilidad ≥ 0.90 por las tres herramientas. nd: No se detectaron CDS con potencial actividad depolimerasa predicha por los tres predictores.

Fago	CDS	Nombre	DepoScope	PhageDPO	DePP
Cap62	007	Tail fiber protein	1.00	0.99	0.94
	056	Tail protein	1.00	0.91	0.98
	060	Tail fiber protein	1.00	1.00	0.96
CuaREV1	007	Tail fiber protein	1.00	0.99	0.95
	056	Tail protein	1.00	0.91	0.97
	060	Tail fiber protein	1.00	1.00	0.95
CuaREV2	007	Tail fiber protein	1.00	0.97	0.96
	056	Tail protein	1.00	0.93	0.96
	060	Tail fiber protein	1.00	0.95	0.97
CuaMUT1	046	Tail protein	1.00	0.97	0.96
CuaMUT2	nd	nd	-	-	-
CuaHET1	nd	nd	-	-	-
CuaHET2	nd	nd	-	-	-

Material suplementario (CAPÍTULO 3)

Datos S3.1. Mutaciones en los fagos evolucionados. Mutaciones con una frecuencia alélica alternativa ≥ 10% para las condiciones de monoinoculación con Cap62, cóctel con Cap62, monoinoculación con CuaHET1 y cóctel con CuaHET1. Cada condición se presenta en una hoja de cálculo independiente dentro del archivo .xlsx. Archivo disponible en repositorio online: https://doi.org/10.6084/m9.figshare.31293016.