



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Instituto de Ciencias
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.**



Posgrado en Microbiología.

**Análisis de la región reguladora de *bla*_{OXA-72} en
asociación con *ISAba-48* y construcción de un
vector estable en *Acinetobacter baumannii*.**

TESIS

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Microbiológicas.
Con opción en Microbiología Médica.

Presenta:

LBM. Diana Flores Percino.

Directora de tesis:

D.C. Patricia Lozano Zarain.

Co-director de tesis:

D.C. Miguel Castañeda Lucio.

Puebla, Pue.

Enero, 2026



Puebla, Pue. a 20 de enero 2026.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría alumna **Diana Flores Percino**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis de la región reguladora de bla_{OXA-72} en asociación con ISAb_a-48 y construcción de un vector estable en *Acinetobacter baumannii*”

A nuestro juicio, la alumna **Diana Flores Percino** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. María Elena Bello López


D.C. Liliana López Pliego

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y al Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme realizar este trabajo.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

A Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada durante el periodo de la maestría con el número de becario 1282799.

A los colaboradores y Hospitales que donaron cepas bacterianas estudiadas en este trabajo de tesis: M. C. Zita Gutiérrez Cazares (Hospital para el Niño Poblano), QFB. Guadalupe Jiménez Flores y el M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero (Proyecto No. 188.2018) (H. R. I.S.S.S.T.E. Puebla).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A los D.C. Miguel Castañeda Lucio y D.C Patricia Lozano Zarain, por aceptarme como alumna para realizar este trabajo, así como por la paciencia y todas las enseñanzas tanto académicas como personales.

A mi comité tutorial, la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, D.C. Ma. Elena Bello López y D.C. Claudia Martínez de la Peña por todas las recomendaciones y apoyo durante este proyecto.

A mis amigos, tanto a los que siguen en contacto como a los que no. A Kate y Gil, por revivir la amistad que teníamos desde la licenciatura y ser mi lugar seguro cuando todo iba mal. A Mariana, por su apoyo, amistad y horas de chisme en el laboratorio. Y a Karen, por su amistad y defenderme de sus perritos.

A Paquito, Mitchell, Julieta, David Eduardo, Brenda y David Gaona, por permanecer como mis amigos después de tantos años y que la vida nos esté llevando por caminos diferentes.

A mis padres y mi hermano por el apoyo y paciencia cuando no estaba con el mejor humor y actitud.

A mis compañeros de laboratorios, por todo el apoyo y momentos lindos compartidos. A Alejandro, por volverse un amigo indispensable, a Elsy, Pablo, Diego, Pao, Oly, Santi, Erika, María y a todos los demás por hacer mi vida un poco más divertida.

INDICE

1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. ANTECEDENTES GENERALES	16
4.1. β -lactamasas tipo OXA	16
4.2. Asociación IS- <i>bla</i> _{OXA}	19
5. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	20
5.1. Asociación <i>bla</i> _{OXA-72} con secuencias tipo IS <i>Aba</i>	20
5.2. Vectores utilizados para el estudio a nivel molecular de <i>A. baumannii</i>	21
6. JUSTIFICACIÓN	22
7. OBJETIVOS	23
General:	23
Específicos:	23
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1. Cepas bacterianas	24
8.2. Ética	25
8.3. Bioinformática	25
8.4. Extracción de RNA de <i>A. baumannii</i> por fenol caliente	25
8.5. Ensayos de RT-PCR punto final	27
8.6. Extracción de plásmido por perclorato	28
8.7. Transformación por choque térmico	28
8.8. Extracción de plásmidos por lisis alcalina (miniprep) para posterior uso en PCR	29
8.9. Conjugación biparental	30
8.10. Condiciones de PCR para amplificar <i>lacZ</i>	31
8.11. Extracción de DNA total de <i>A. baumannii</i>	32
8.12. Purificación de productos de PCR por el método de sílica	32
8.13. Extracción de plásmido por columna de sílica	33
9. RESULTADOS	34

9.1.	Análisis bioinformático de la asociación de los genes <i>bla</i> _{OXA-72} -ISAb _a -48	34
9.2.	Expresión conjunta de ISAb _a -48 y <i>bla</i> _{OXA-72} en una sola unidad transcripcional	43
9.3.	Construcción de un vector estable en <i>A. baumannii</i>	46
10.	DISCUSIÓN.....	51
11.	CONCLUSIONES.....	60
12.	PERSPECTIVAS	60
13.	ANEXOS	61
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
15.	ACTIVIDADES ACADÉMICAS RELACIONADAS CON EL PROYECTO....	70
16.	ACTIVIDADES DE RETRIBUCIÓN SOCIAL	70

1. ABREVIATURAS

BET	Bromuro de Etidio.
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHC	Enzimas que hidrolizan carbapenémicos
EUA	Estados Unidos de América
GM	Gentamicina
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud.
IMP	Imipenem
IS	Secuencia de Inserción
ISAb_a	Secuencia de Inserción de <i>A. baumannii</i>
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
MDR	Multidrogo-resistente
MH	Muller-Hinton
MEM	Meropenem
ORF	Marco de lectura abierto.
NaCl	Cloruro de sodio
Nal	Yoduro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONU	Organización de las Naciones Unidas.
OXA	Oxacilinasas
PBP	Proteínas de unión a penicilinas
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
sRNA	Pequeños RNA no codificantes
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa
RPM	revoluciones por minuto
Sm	Estreptomina
SSE	Solución Salina Ésteril
TBE	Tris-Borato-EDTA
TrisHCl	Clorhidrato de Tris
TSA	Agar Soya-Trypticaseína
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
USP	Proteínas universales de estrés
XDR	Extremadamente drogo-resistentes
Pb	Pares de bases
Kb	Kilobase
μg	Microgramos
μl	Microlitros

2. RESUMEN

Acinetobacter baumannii es una bacteria del grupo *ESKAPE* de relevancia clínica, especialmente por las cepas resistentes a carbapenémicos. Actualmente, OXA-72 se ha convertido en la carbapenemasa de mayor prevalencia en México y en años recientes ha sido reportada en asociación con IS*Aba-48*, lo que podría estar contribuyendo a los fenotipos de alta resistencia a carbapenémicos en las cepas que la portan. Por lo que se decidió estudiar la región reguladora de *bla*_{OXA-72} en asociación con IS*Aba-48* en esta bacteria. Al realizar un análisis de promotores en esta asociación génica, se encontraron 3 posibles candidatos, uno en la región intergénica, otro al final de la secuencia de IS*Aba-48* y el último río arriba de IS*Aba-48*. Adicionalmente, al analizar las regiones intergénicas IS*Aba-48-bla*_{OXA-72}, se encontró una región conservada de aproximadamente 100 pb en todas las secuencias. Se determinó que en la cepa AE16 crecida en medio suplementado con IMP [100µg/ml], IS*Aba-48* y *bla*_{OXA-72} se encuentran en un mRNA largo, formando una sola unidad transcripcional. Para probar la funcionalidad de las regiones reguladoras determinadas con el análisis de promotores, se construyó el vector pKT230LacZTGM2 con el origen de replicación RSF1010, que logró ser transferido por conjugación biparental en las cepas clínicas AE12, AE19 y AE20. Además, se confirmó la estabilidad del vector en cepas de *Acinetobacter baumannii* de origen clínico.

Palabra clave: *Acinetobacter baumannii*, IS*Aba-48-bla*_{OXA-72}, regulación génica, vectores, RSF1010.

3. INTRODUCCIÓN

Se puede considerar a los antibióticos como aquellos compuestos que ayudaron a cimentar la medicina moderna. Sin embargo, la aparición y prevalencia de bacterias multi-drogoresistentes (MDR), no solo de antibióticos pre-existentes, sino también de aquellos más recientes, se ha convertido en una amenaza al sistema de salud moderno (Huemer *et al.*, 2020).

En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que aproximadamente 700,000 muertes al año son causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Estas cifras para 2050 podrían aumentar a 20 millones, lo que podría representar un gasto económico de \$2.9 trillones de dólares, evidenciando que la resistencia a antibióticos no solo tiene un impacto en la salud, sino también representa un grave problema en la economía mundial (Huemer *et al.*, 2020; Uddin *et al.*, 2021).

A pesar de lo preocupante de este asunto, el desarrollo actual de nuevos antibióticos es escaso. En los años 80, aproximadamente 20 firmas farmacéuticas participaban en la investigación de antibióticos. Sin embargo, solo 5 de estas firmas se mantienen activas actualmente, dejando el desarrollo de nuevas terapias a pequeñas y nuevas firmas biotecnológicas. Debido al fenómeno de resistencia a antibióticos, se necesitan inversiones altas a la ciencia ya que hay una falta de entendimiento de cómo desarrollar nuevos agentes dirigidos a cepas resistentes, lo que significa un reto regulatorio y de financiamiento para las compañías, propiciando que estas reduzcan o abandonen su desarrollo (Uddin *et al.*, 2021).

Entre los diversos antibióticos que existen, los β -lactámicos son de gran importancia médica pues son los agentes bactericidas más utilizados para tratar enfermedades infecciosas bacterianas (Bush & Bradford, 2016). Aproximadamente dos tercios de las prescripciones de antibióticos en los hospitales en años recientes incluyen β -lactámicos (Bush, 2020). Estos fármacos tienen como mecanismo de acción el interrumpir la formación de la pared celular bacteriana al unirse covalentemente a las proteínas de unión a penicilinas (PBP), enzimas esenciales al final del proceso de entrecruzamiento del peptidoglicano tanto en Gram-negativas como en Gram-positivas (Bush & Bradford, 2016).

Los β -lactámicos más comúnmente utilizados pertenecen a cuatro clases químicas principales: las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos (Bush, 2020).

La resistencia a los β -lactámicos en Gram-negativos está principalmente representada por β -lactamasas (Bush & Bradford, 2016). Las β -lactamasas son un grupo diverso de enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactam (Pandey et al., 2023). Bioquímicamente han sido clasificadas en dos grupos de acuerdo al mecanismo por el que llevan a cabo la hidrólisis de estos antibióticos: el primero al utilizar un sitio activo con una serina (Serin- β -lactamasas) y el segundo al utilizar sitios activos con iones de Zinc (Zn^{2+}) (Metallo- β -lactamasas) (Bush, 2018).

Sin embargo, los esquemas de clasificación de β -lactamasas más comúnmente utilizados son A) el esquema Ambler, que se basa en la secuencia de aminoácidos de la enzima, y B) el esquema de Bush, Jacoby, y Medeiros que se basa en los sustratos y los perfiles de inhibidores de las enzimas (Tabla 1) (Pandey et al., 2023).

Tabla 1. Esquemas de clasificación de β -lactamasas.

Esquema de clasificación	Categorías	Características
Ambler	Clase A	Serin- β -lactamasas
	Clase B	Metallo- β -lactamasas
	Clase C	Serin- β -lactamasas
	Clase D	Serin- β -lactamasas
Bush, Jacoby, y Medeiros	Grupo 1	Cefalosporinasas que no son bien inhibidas por ácido clavulánico
	Grupo 2	Penicilinasas, cefalosporinasas y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

		generalmente inhibidas por inhibidores dirigidos al sitio activo.
	Grupo 3	Penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas poco inhibidas por la mayoría de las moléculas que contienen β -lactam.

Actualmente, uno de los tratamientos de última elección en pacientes críticamente enfermos son los carbapenémicos, que se mantienen restringidos ya que poseen un amplio espectro de actividad contra bacterias gram-negativas (Iovleva *et al.*, 2025). Los carbapenémicos son antibióticos bactericidas y al pertenecer al grupo de los β -lactámicos, evitan la transpeptidación durante el proceso de síntesis de la pared celular bacteriana (Armstrong *et al.*, 2021).

Debido al incremento de bacterias portadoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), el uso de carbapenémicos ha aumentado en las últimas dos décadas, provocando a su vez el surgimiento de cepas productoras de carbapenemasas, que no solo degradan carbapenémicos, sino algunas también pueden inactivar otros β -lactámicos como cefalosporinas de espectro extendido contribuyendo a una mayor resistencia (Huemer *et al.*, 2020).

El surgimiento de bacterias gram-negativas resistentes a carbapenémicos ha empeorado en los últimos 20 años. Antes del 2021, aproximadamente el 99.9% de los aislados clínicos de Enterobacterias era considerado susceptible a los carbapenémicos (Ma *et al.*, 2023), pero después del año 2005, la resistencia a carbapenémicos en bacterias gram-negativas en general, empeoró gradualmente, fenómeno especialmente observado en aislados bacterianos de pacientes internados en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Jean *et al.*, 2022).

Entre las cepas de Gram-negativos extremadamente drogo-resistentes (XDR) de mayor importancia clínica por portar plásmidos que acarrean genes de resistencia

a carbapenémicos, encontramos a aquellas pertenecientes al complejo de *Acinetobacter baumannii* (Jean et al., 2022).

A. baumannii es una bacteria no fermentadora, Gram-negativa, cocobacilar que está ampliamente distribuida en la naturaleza. En los humanos, podemos encontrarla colonizando mucosas como la nasofaringe, la piel y la boca (Li et al., 2021). También podemos encontrarla en ambientes hospitalarios formando biopelículas en dispositivos médicos, lo que aumenta el riesgo de infecciones respiratorias causadas por esta bacteria (Li et al., 2021). *A. baumannii* es considerado un patógeno oportunista nosocomial emergente, causante de severas infecciones asociadas a la atención de la salud y brotes de largo plazo, particularmente en las UCI alrededor del mundo, causando infecciones del sistema sanguíneo y heridas, o neumonía asociada a ventilador (Ślarczyńska et al., 2021; Strateva et al., 2023). Posee una alta capacidad de diseminarse dentro de los hospitales y de colonizar superficies, presentando altos índices de mortalidad en infecciones invasivas, principalmente las cepas resistentes a carbapenémicos. *A. baumannii* porta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos junto con una capacidad rápida de adquirir mecanismos adicionales de resistencia (Strateva et al., 2023).

A. baumannii es parte del grupo bacteriano conocido como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* sp.) (Strateva et al., 2023), acrónimo dado debido a la capacidad que tienen los integrantes de **escapar** a la acción de los antibióticos, a través de mutaciones genéticas o la adquisición de genes de resistencia por medio de elementos genéticos móviles, que les han permitido desarrollar mecanismos de resistencia a múltiples familias de estos fármacos, tales como macrólidos, tetraciclinas, lipopéptidos, oxazolidinonas, quinolonas, β -lactámicos, o antibióticos de última línea como los carbapenémicos, entre otros (De Oliveira et al., 2020; Denissen et al., 2022).

Infecciones causadas por cepas MDR de *A. baumannii* se han reportado en diferentes partes del mundo, afectando a pacientes inmunocomprometidos o con alguna enfermedad secundaria y se ha asociado a una mortalidad de 30% de los

pacientes infectados (Perez *et al.*, 2007). Aproximadamente el 45% de todos los aislados clínicos mundiales de esta bacteria son considerados MDR, dejando sin tratamientos eficaces disponibles a los hospitales (De Oliveira *et al.*, 2020), por lo que la OMS lo considera dentro de la categoría de prioridad crítica para el desarrollo de nuevos agentes antibióticos (OMS, 2024).

La resistencia a carbapenémicos en esta bacteria ha incrementado significativamente en los últimos años, tan solo en EUA se ha reportado un 50% de resistencia, mientras que en países europeos varía entre <1% a >55%. En países como China, India y Corea del Sur ha excedido un 70%, y en Latinoamérica se ha reportado un intervalo entre 30% y más del 80% (Iovleva *et al.*, 2025).

Las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos son particularmente un problema de salud pública debido a la falta de tratamientos efectivos contra infecciones causadas por ellas, lo que se estimó que causó 326,000 muertes en el año 2019 (Iovleva *et al.*, 2025). La resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* puede ser causada por enzimas hidrolíticas del tipo β -lactamasas, al igual que otros mecanismos como es la sobre-expresión de sistemas activos de bombas de eflujo, que causan cambios en la permeabilidad de la membrana a estas moléculas, o por mutaciones en el sitio blanco (Strateva *et al.*, 2023). La resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* es mediada principalmente por la producción de enzimas que hidrolizan carbapenémicos (EHC), pertenecientes a la clase Ambler D (OXA), sin embargo también se han reportado enzimas de la clases A (KPC) y B (IMP, VIM, SIM y NDM) (Słoczyńska *et al.*, 2021). Existen diferentes tipos de EHC que se pueden encontrar en bacterias productoras de carbapenemasas (Tabla 2) (Bush, 2020).

Tabla 2. Clasificación de las diferentes carbapenemasas.

Enzimas hidrolizadoras de carbapenémicos (carbapenemasas)			
Característica bioquímica		Tipo	
Serin-carbapenemasas	Especie-específicas	SME	Solo reportadas en el cromosoma de en <i>Serratia marcescens</i> . Confieren resistencia a carbapenémicos, pero no a cefalosporinas de espectro extendido.
		IME/NMC	Solo identificadas en el cromosoma de aislados del complejo <i>E. cloacae</i> .
	Adquiridas	KPC	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemasa. Confiere resistencia a cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Se encuentran en diferentes géneros del grupo <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>P. aeruginosa</i> .
		OXA carbapenemasas	Solo una fracción reducida de las oxacilinasas tiene actividad carbapenemasa. Entre las que sí son consideradas carbapenemasas encontramos

			OXA-23, OXA-40 y OXA-48. Tienen actividad contra penicilinas y carbapenémicos de amplio espectro, y son poco inhibidas por inhibidores de β -lactamasas, excepto avibactam.
Metallo-carbapenemasas	IMI		Confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Son diseminadas en plásmidos de amplio y estrecho rango de hospedero.
	VIM		Metallo- β -lactamasa codificada por el integrón Verona. Son globalmente encontradas, principalmente en <i>K. pneumoniae</i> y el complejo <i>E. cloacae</i> .
	NDM		Metallo- β -lactamasa de Nueva Delhi. Comunnmente encontrada en <i>Enterobacteriaceae</i>

Por todo esto, el estudio de la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* podría impulsar el desarrollo de otras nuevas investigaciones que tengan como objetivo incrementar el conocimiento que se tiene de este problema, lo que impactaría a su vez en el interés de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento contra esta bacteria.

4. ANTECEDENTES GENERALES

4.1. β -lactamasas tipo OXA

En los últimos años, los carbapenémicos se reconocían como el tratamiento de primera elección para IAAS graves causadas por esta bacteria, pero el surgimiento de cepas resistentes a ellos ha colocado a *A. baumannii* como una amenaza urgente a la salud pública por los centros de control y prevención de enfermedades (Strateva *et al.*, 2023). Se considera que la resistencia a carbapenémicos que reporta está principalmente mediada por enzimas del tipo OXA (El-Shazly *et al.*, 2015), y se ha observado en aislados de países como China y Taiwan, que algunas cepas de *Acinetobacter* sp. y aislados clínicos de *A. baumannii* que portan plásmidos con genes como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-72}, etc, reportan resistencia a todos los carbapenémicos (Jean *et al.*, 2022).

Las Oxacilinasas son un amplio grupo de β -lactamasas específicas que se clasifican de acuerdo a su estructura y propiedades bioquímicas, en 2021 aproximadamente 350 de ellas habían sido identificadas (Ibrahim *et al.*, 2021). El primer reporte de *A. baumannii* portadora de una enzima OXA mediada por plásmido fue descrito en una cepa aislada de Escocia en 1985, incluso antes de la introducción de los carbapenémicos en la clínica (Perez *et al.*, 2007).

Estas proteínas OXA son predominantemente acarreadas en plásmidos, pero también se pueden encontrar en el cromosoma de esta bacteria como OXA-51 (Müller *et al.*, 2023). Además, se ha demostrado que tienen un alto índice de transmisibilidad (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023). De hecho, la alta plasticidad genética que posee *A. baumannii* juega un papel crítico en la habilidad de esta bacteria para adquirir y diseminar elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones, etc. (Marino *et al.*, 2024). Se ha reportado que *A. baumannii* tiene una habilidad natural de adquirir DNA exógeno a través de la transferencia horizontal de genes, lo que explica la plasticidad que tiene esta bacteria, impactando en el grado de resistencia antibiótica que reporta (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023).

Las oxacilinasas más comunes en *A. baumannii* son las OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-51-like, OXA-143-like, OXA-235-like y OXA-58-like (Ślarczyńska *et al.*, 2021; Strateva *et al.*, 2023; Yazdansetad *et al.*, 2019). Del grupo de las OXA-24/40-like encontramos 5 variantes: OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72 y OXA-160 (Montealegre *et al.*, 2012).

Además, la capacidad de ciertas OXAs para hidrolizar carbapenémicos también se puede ver influenciada por el entorno en el que se encuentra el gen (El-Shazly *et al.*, 2015). Se ha observado que la expresión de estos genes *bla*_{OXA}, se puede incrementar por la presencia de secuencias de inserción (IS), y la alta frecuencia de estas IS asociadas a oxacilinasas y otras carbapenemasas podría estar determinada por la variedad de tratamientos con carbapenémicos que se aplican actualmente a los pacientes (El-Shazly *et al.*, 2015).

Las secuencias de inserción son pequeños elementos genéticos móviles que constan de uno o dos genes que codifican para transposasas (*tnp*) generalmente flanqueados por invertidas repetidas terminales a la izquierda (IR_I) y derecha (IR_D) de *tnp* (Figura 1) (Partridge *et al.*, 2018).



Figura 1. Estructura general de una secuencia de inserción. La flecha roja representa el gen de la transposasa (*tnp*) y los triángulos negros las repetidas invertidas.

Las carbapenemasas de la familia OXA-24/40-like han sido reportadas en *A. baumannii* en varios países europeos como España, Polonia, Portugal, Francia, Bulgaria y Suecia, al igual que en otros países como Estados Unidos de América, Israel y Colombia (Ślarczyńska *et al.*, 2021). Estas carbapenemasas normalmente son transportadas en plásmidos y han sido reportadas en cepas causantes de brotes intrahospitalarios en las UCI, en países como Brasil, Ecuador y Colombia

(Rodríguez *et al.*, 2018). Con respecto a la variante OXA-72, se describe por primera vez en 2004 en Tailandia en *A. baumannii*, y posteriormente es reportada en otros países como Taiwan, China, Corea del Sur y algunos países europeos (Nuñez Quezada *et al.*, 2017). En México, durante 2014, se reporta por primera vez en cepas de *A. baumannii* aisladas de un hospital de tercer nivel, contribuyendo a la resistencia a meropenem (MEM) e imipenem (IMP), siendo éste el primer reporte de esta enzima en Latinoamérica (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2014). En el mismo año, también se reporta como la carbapenemasa más prevalente en el Hospital Civil de Guadalajara (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014) y en años recientes, OXA-72, sigue siendo la enzima con actividad carbapenemasa más reportada en cepas de *A. baumannii* (Garza-Ramos *et al.*, 2023). La OXA-72 parece ser la enzima más importante en contribuir a la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* en nuestro país (Rodríguez *et al.*, 2018).

En 2017, Nuñez-Quezada *et al.*, estudiaron 35 cepas de *A. baumannii* en Ecuador; de estas, 33 cepas mostraron resistencia a todos los β -lactámicos probados, incluyendo carbapenémicos. Treinta cepas fueron portadoras de *bla*_{OXA-72}. En este caso no se reportó que se encontrara en un integrón y no se encontró alguna IS*Aba* flanqueándola, y todavía la presencia de *bla*_{OXA-72} era considerada esporádica en el continente americano (Nuñez Quezada *et al.*, 2017). Sin embargo, en años recientes, ya es una de las carbapenemasas mayormente diseminadas en cepas de países de este continente, así como otras oxacilinasas entre las que encontramos a OXA-23, OXA-58, OXA-143 y OXA-253, además de otras β -lactamasas como NDM-1, VIM-1, IMP-1, e IMP-10 (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023).

En Polonia, también se ha reportado la presencia de *bla*_{OXA-72} en cepas de *A. baumannii*, pero tampoco se determinó ninguna IS río arriba de este gen; por otro lado, hasta el momento ninguna IS ha sido encontrada asociada a alguna variante de *bla*_{OXA-24/40-like} (Ślarczyńska *et al.*, 2021; Verdugo-Yocupicio, 2020).

4.2. Asociación IS-*bla*_{OXA}

Se ha observado que las EHC pueden conferir una alta resistencia a carbapenémicos si río arriba del gen que las codifica se encuentra una IS, debido a que esta provee de un promotor fuerte, que propicia una sobre-expresión del gen (Słoczyńska *et al.*, 2021).

La presencia de IS río arriba de genes OXA regula la sobre-expresión de estas enzimas, potenciando su actividad hidrolítica de carbapenémicos; por otro lado, si estos elementos genéticos no están presentes, estas enzimas presentan una actividad catalítica débil hacia carbapenémicos (Agoba *et al.*, 2018). Se ha observado que la IS*Aba-1* presente en *A. baumannii*, contribuye en la sobre expresión de las betalactamasas OXA-51/OXA-69-like disminuyendo la susceptibilidad de las cepas hacia ceftazidima y carbapenémicos (Perez *et al.*, 2007).

Generalmente, la mayoría de aislados de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos que portan *bla*_{OXA-24/40} reportan concentraciones mínimas inhibitorias más altas comparados con otros aislados que portan otro tipo de *bla*_{OXA} por si solos. Sin embargo, aislados que reportan la presencia concomitante de varios *bla*_{OXA} o que tienen una IS*Aba-1* insertada cerca de ellos, tienen un nivel de resistencia a carbapenémicos todavía más altos (Yazdansetad *et al.*, 2019). Las IS son regularmente nombradas de acuerdo al organismo en el que fueron primeramente descritas, utilizando las primeras 3 letras, así los elementos IS de *A. baumannii* se denominan IS*Aba* (Noel *et al.*, 2022).

En 2004, Figueiredo *et al.*, estudiaron dos cepas (A1 y A2) de *A. baumannii* portadoras del gen *bla*_{OXA-66}, aisladas de un paciente en Francia. Dichas cepas diferían en su perfil de susceptibilidad a carbapenémicos, siendo la cepa A2 la que presenta un perfil de resistencia a carbapenémicos más alto. Determinan la presencia de IS*Aba1*, 7 pb río arriba del gen *bla*_{OXA-66} en la cepa A2, pero ninguna asociación en la cepa A1. Adicionalmente, analizan la relación de IS*Aba1* con la sobre-expresión del gen *bla*_{OXA-66} por medio de qRT-PCR (región interna de *bla*_{OXA-}

66,) encontrando que la expresión de este gen es 50 veces más alta en la cepa A2 que en la cepa A1 (Figueiredo *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se han encontrado diversas asociaciones de IS con genes OXA, en cepas de *A. baumannii*. En Polonia, en un estudio realizado con cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, se encontraron los genes adquiridos *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} y el gen *bla*_{OXA-58-like}. Río arriba de cada uno de los genes *bla*_{OXA-23-like} y *bla*_{OXA-51-like} se encontró IS*Aba1*, mientras que río arriba de las cepas portadoras de *bla*_{OXA-58-like} se encontró IS*Aba3* (Ślarczyńska *et al.*, 2021).

5. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

5.1. Asociación *bla*_{OXA-72} con secuencias tipo IS*Aba*

Antes del 2022, no existía ningún reporte de la asociación de *bla*_{OXA-72} con alguna IS del tipo IS*Aba*. Sin embargo, Jiménez-Villalpando de nuestro equipo de trabajo, en 2022, reporta mediante análisis bioinformáticos la presencia de IS*Aba-48* río arriba de *bla*_{OXA-72} (Figura 2) en 5 plásmidos diferentes de *A. baumannii* reportados en México; dos de los cuales fueron aislados de cepas provenientes de 2 hospitales Poblanos (Hospital para el niño Poblano y Hospital Regional ISSSTE Puebla) (Jiménez-Villalpando, 2022).



Figura 2. Arreglo genético de la asociación IS*Aba-48*-*bla*_{OXA-72}. La flecha roja representa a IS*Aba-48* río arriba de *bla*_{OXA-72}, representado por la flecha naranja.

De acuerdo con la base de datos ISFinder, IS*Aba-48* pertenece a la familia IS701, específicamente al grupo IS*Aba11*. Adicionalmente, *bla*_{OXA-72} ha sido reportado

flanqueado por sitios de recombinación XerC/XerD, lo que podría ser el principal mecanismo de movilización de este gen (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Jiménez-Villalpando, 2022).

En 2023, Fernández-Vázquez examina la estructura de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *OXA-72*, observando la presencia de una IS701 (ISAbA-48) río arriba de *bla_{OXA-72}*, siendo este el segundo reporte publicado de esta asociación, ambos en cepas mexicanas (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023). Sin embargo, no se ha estudiado el impacto que implica esta asociación en la expresión de *bla_{OXA-72}*, si es por la participación de un promotor fuerte que influye la expresión individual de ambos genes o como una sola unidad transcripcional.

5.2. Vectores utilizados para el estudio a nivel molecular de *A. baumannii*

Actualmente, existe una baja disponibilidad de vectores que sean útiles en *A. baumannii* para su manipulación y estudio genético, especialmente para cepas MDR. Para estudiar el impacto de la ISAbA-48 en asociación con *bla_{OXA-72}*, es necesario encontrar una solución a esta problemática. Hasta el momento, se había estado trabajando con plásmidos como el pWH1277, un plásmido críptico aislado de *A. calcoaceticus* BD413 y sus derivados adicionados con el replicón EcolE1 de *E. coli*. Entre estos derivados encontramos a pWH1266 que surgió de combinar a pWH1277 con el vector de *E. coli* pBR322. Sin embargo, pWH1266 tiene muchas limitantes como marcadores de resistencia inútiles en cepas MDR, que no se conocen sus mecanismos de estabilidad, se desconoce su número de copias, tiene pocos sitios de restricción únicos y es muy difícil de seleccionar candidatas pues se basa en inactivación de marcadores (Lucidi *et al.*, 2018). Para intentar contrarrestar todas estas limitantes en este plásmido es que se ha modificado obteniendo los derivados de la familia pVRL (Lucidi *et al.*, 2019) o el sistema de clonación AspFlex, con módulos de selección KanR y marcadores de resistencia a telurito (Brychcy *et al.*, 2023).

Otra alternativa a este problema, es el vector pDSK519 que es un derivado del plásmido RSF1010, pertenece al grupo de incompatibilidad IncQ y puede replicarse en *A. baumannii* demostrando una alta estabilidad en esta bacteria (Jie et al., 2021), por lo que trabajar con un derivado con marcadores de selección idóneos para cepas MDR, convierte a los derivados del RSF1010 en candidatos idóneos para contrarrestar la escases de herramientas para el estudio molecular de esta bacteria.

6. JUSTIFICACIÓN

La adquisición de genes que codifican para beta-lactamasas en los microorganismos causantes de IAAS, es un fenómeno desfavorable que tiene impacto en la eficacia del tratamiento aplicado a los pacientes. Las betalactamasas, principalmente las de tipo OXA, han sido consideradas objetos importantes de estudio debido a su amplia actividad hidrolítica hacia diferentes β -lactámicos y, sobre todo a carbapenémicos. La expresión de las enzimas tipo OXA se ha visto incrementada por su asociación a elementos genéticos móviles como son las ISAb_a en aislados de *A. baumannii*. La enzima OXA-72 ha sido reportada en diferentes partes del mundo; y en México es considerada como la OXA más predominante en *A. baumannii* en los últimos años, incluso siendo reportada en aislados provenientes de hospitales poblanos. Se ha reportado la asociación de *bla*_{OXA-72} con una IS río arriba del gen; es importante realizar el estudio de si la IS confiere alguna regulación que resulte en una sobreexpresión de *bla*_{OXA-72}. El estudio de la región reguladora del gen *bla*_{OXA-72}, permitirá un mayor entendimiento del impacto que tienen las secuencias de inserción en el grado de expresión de este gen, al igual que permitirá en un futuro analizar la influencia que tienen en el fenotipo de resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii*.

7. OBJETIVOS

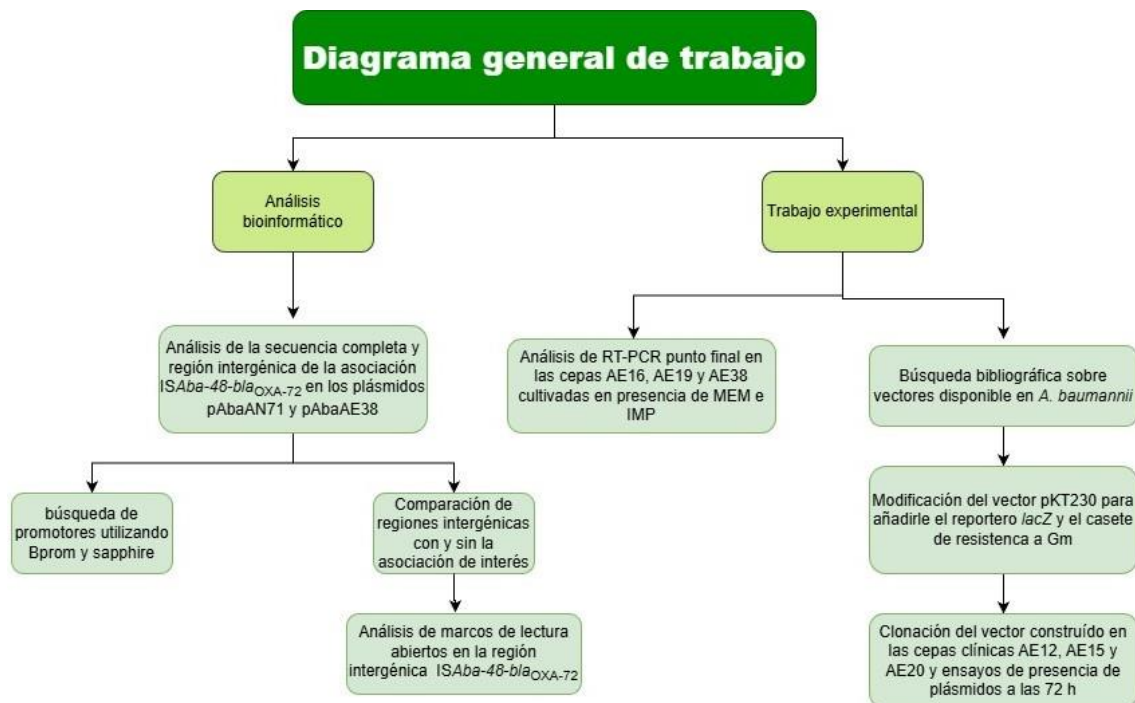
General:

Estudiar la región reguladora de *bla*_{OXA-72} en asociación con IS*Aba*-48.

Específicos:

1. Analizar *in silico* los posibles promotores asociados a *bla*_{OXA-72} y/o IS*Aba*-48-*bla*_{OXA-72}.
2. Determinar si los genes IS*Aba*-48 y *bla*_{OXA-72} constituyen una unidad transcripcional.
3. Generar fusiones transcripcionales con las regiones reguladoras encontradas.

8. MATERIALES Y MÉTODOS



8.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de *A. baumannii* AE38, AE19 y AE16 aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, la cepa AN71 aislada del Hospital para el Niño Poblano (Tabla 3) y cepas de *E. coli* para mantener los vectores o realizar los ensayos de conjugación (Tabla 4).

Tabla 3. Características genéticas de las cepas de *Acinetobacter baumannii* utilizadas en este proyecto.

Cepa <i>A. baumannii</i>	Hospital/ genotipo	Rol en este trabajo	Referencia
AE16	HR. I.S.S.S.T.E: <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} ,	Cepa de estudio	Verdugo-Yocupicio, 2020
AE19	HR.I.S.S.S.T.E.: <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>ISAba-48-bla</i> _{OXA-72}	Cepa de estudio	Verdugo-Yocupicio, 2020
AN71	HPN: <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-214} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-72} - <i>ISAba-48-bla</i> _{OXA-72}	Cepa de estudio	Jiménez-Villalpando, 2022
AE38	HR.I.S.S.S.T.E.: <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-214} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>ISAba-48-bla</i> _{OXA-72}	Cepa de estudio	Jiménez-Villalpando, 2022
AE12	HR.I.S.S.S.T.E.: <i>bla</i> _{OXA-51}	Conjugación y prueba de estabilidad	Verdugo-Yocupicio, 2020
AE15	HR.I.S.S.S.T.E.: <i>bla</i> _{OXA-51}	Conjugación y prueba de estabilidad	Verdugo-Yocupicio, 2020
AE20	HR.I.S.S.S.T.E.: <i>bla</i> _{OXA-51}	Conjugación y prueba de estabilidad	Verdugo-Yocupicio, 2020

Tabla 4. Características genéticas de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

Cepas	Características de la cepa	Rol en este trabajo	Referencia
-------	----------------------------	---------------------	------------

DH5a	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.</i>	Clonación	Gibco BRL
S-17	<i>recA pro hsdR, RP4-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	Conjugación biparental con <i>A. baumannii</i>	Simon <i>et al.</i>

8.2. Ética

No se requiere de un consentimiento informado de los pacientes, ya que las cepas fueron aisladas de muestras clínicas tomadas en los estudios de rutina y no se trabajaron directamente con estas. Los datos de los pacientes se mantuvieron en anonimato. Los protocolos de investigación fueron aprobados por los comités de ética e investigación de los hospitales: Hospital Regional I.S.S.S.T.E, de Puebla (188.2018) y Hospital para el Niño Poblano (HNP/ENS/177/2016).

8.3. Bioinformática

Se utilizaron las plataformas Bprom (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) (Solovyev & Salamov, 2011) y SAPPPIRE (<https://sapphire.biw.kuleuven.be/>) (Coppens & Lavigne, 2020) para la búsqueda de promotores. También se utilizó Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) (Sievers et al., 2011) y ORFfinder versión online (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) (Rombel et al., 2002).

8.4. Extracción de RNA de *A. baumannii* por fenol caliente

Las cepas se sembraron en placas de agar Muller-Hinton (MH) y se dejaron incubar por 16h a 37°C. Posteriormente, el crecimiento se recolectó completamente en tubos *ependorf* con 1 ml de solución salina estéril (SSE) y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Una vez formada la pastilla celular, se retiró el sobrenadante junto con el exceso de polisacárido por decantación. Las pastillas se lavaron 3 veces con 1 ml de SSE, resuspendiéndolas suavemente con ayuda de la micropipeta para evitar que se lisen antes de tiempo (NO SE UTILIZÓ VORTEX). Para cada lavado, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Al final, se realizó un último lavado con 1 ml

de EDTA 0.01M, se resuspendió con micropipeta y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente, después se centrifugó 5 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante (Tamaño aproximado de la pastilla final: 15 µl). NOTA: Las pastillas se usaron para la extracción el mismo día, no se congelaron para evitar degradación.

La pastilla se resuspendió utilizando 20 µl de H₂O con Dietilpirocarbonato (DEPC) 0.01% suavemente, sin utilizar vórtex. Posteriormente se agregaron 3 µl de H₂O DEPC 0.5% y se mezcló. Se agregaron 200 µl de acetona helada, se mezcló hasta homogenizar la muestra y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. Se desechó el sobrenadante utilizando la micropipeta para eliminar por completo la acetona de la muestra. La pastilla obtenida se resuspendió en 30 µl de H₂O DEPC 0.01%, se agregaron 10 µl de lisozima (10 mg/ml, preparada con agua libre de RNAsas) y se mezcló. Se dejó incubar la muestra 10 min a 37°C. Pasado ese tiempo, se agregó 1 µl de proteasa (10 mg/ml, preparada con agua libre de RNAsas), se mezcló y se dejó incubar por 10 min en hielo. Posteriormente, se agregaron 3.5 µl de H₂O DEPC 0.5%, 200 µl de fenol precalentado a 70°C y 150 µl de cloroformo, se mezcló y después se agregaron 120 µl de H₂O DEPC 0.5%. Se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo tipo *ependorf* nuevo, se agregó 1 ml de isopropanol, y se mezcló manualmente. La muestra se dejó precipitar por 1h a -20°C. Pasado el tiempo, se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante hasta eliminar todo el isopropanol y se dejó secar la pastilla a 37°C. Se resuspendió la muestra en 50 µl de agua libre de RNAsas y no se congelaron, se siguieron utilizando el mismo día.

Se realizó electroforesis con gel de agarosa al 1% preparado con TBE 1X (Stock de TBE 10X pH=8). A aproximadamente 55°C de la agarosa derretida, se añadió 1 ml de formaldehído. El buffer de corrida se preparó con TBE 1x (297 ml) y formaldehído (3 ml). Para cargar las muestras: en un microtubo tipo *ependorf* estéril se colocaron 5 µl de la muestra de RNA, 7 µl RNA sample (MAE 5x, Formaldehído) y 1 µl de UView 6x loading dye (Bio-rad), se mezcló y se cargó en el gel. Las condiciones de

corrida fueron 100 V, por 30 minutos. El gel se tiñó en BET 30 segundos para observar las bandas con mejor claridad.

Para eliminar contaminación con DNA se utilizó el kit DNase I, RNase-free (Thermo scientific) según el instructivo del fabricante, y se añadió 0.1 µl de RNase RiboLock.

NOTA: todos los procedimientos que involucraron la manipulación de RNA, se llevaron a cabo utilizando guantes nuevos, las muestras siempre en hielo y con material esterilizado exclusivo para RNA. La cámara de electroforesis se trató previamente con DEPC.

8.5. Ensayos de RT-PCR punto final

Se utilizó la herramienta PrimerQuest™ de IDT Technologies (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) para el diseño de *primers* a utilizar en este ensayo.

Para obtener el cDNA se utilizó el Kit de retrotranscriptasa (Promega), según las instrucciones del fabricante, añadiendo 0.4 µl de RNase RiboLock a cada reacción y usando los *primers* OXA-72Rv y ISAbA-48Rv.

Para las PCR que utilizaron los pares de *primers* IS-OXAFw/Rv y OXA-72Fw/Rv se utilizó como molde el cDNA que se obtuvo con el primer OXA-72Rv y para el par ISAbA-48Fw/Rv se utilizó el cDNA que se obtuvo con el primer ISAbA-48Rv utilizando del mix de la tabla 5.

Tabla 5. Mix para reacción de PCR con DreamTaq DNA polymerase (ThermoFisher).

Reactivo	Volumen añadido a la reacción	Concentración final
Primer F [25 µM]	0.3µl	0.75 µM
Primer R [25 µM]	0.3 µl	0.75 µM
Buffer de reacción [10 X]	1 µl	1 x
dNTPs [10 mM]	0.3 µl	0.75 µM
DreamTaq [5U/µl]	0.1 µl	0.05 U
H ₂ O libre de nucleasas	7.5 µl	
cDNA [N/A]	1 µl	N/A

8.6. Extracción de plásmido por perclorato

Se partió de un cultivo de *E. coli* DH5 α en 3 ml de Luria-Bertani (LB) suplementado con el antibiótico de selección (Gm [20 μ g/ml]) a 37°C toda la noche en agitación. Posteriormente, se centrifugó el cultivo 5 min a 6,000 rpm y se decantó el medio. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de MgSO₄ 10 mM y para una mejor manipulación de la muestra se pasó a un microtubo tipo *ependorf* para después centrifugar 1 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante, se utilizó la ayuda de la micropipeta para desechar lo más posible del líquido. Una vez que se tuvo la pastilla lista, se resuspendió en 175 μ l de TES (TRIS-EDTA-Sacarosa), después se agregaron 25 μ l de lisozima (10mg/ml), se mezcló con ayuda del vórtex y se incubó la muestra 20 min en hielo. Pasado el tiempo, se agregaron 400 μ l de agua helada a la muestra y se incubó en el *Thermoblock* a 73°C por 15 min, e inmediatamente después se pasó la muestra al hielo hasta enfriar y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo tipo *ependorf* nuevo y se le agregaron 60 μ l de NaClO₄ 5M y 600 μ l de isopropanol. Se centrifugó 15 min a 13,000 rpm y se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70%. Después del último lavado, se retiró lo más posible el líquido con ayuda de una micropipeta y se secó la pastilla a 50 °C hasta eliminar por completo el etanol. Posteriormente, se resuspendió la pastilla de DNA en 30 μ l de RNasa diluida (2 mg/ml), y se dejó incubar 1 hora a 37°C. Se corroboró la extracción por electroforesis con gel de agarosa al 1%. La muestra se guardó a -20°C hasta su uso.

8.7. Transformación por choque térmico

Para la conjugación biparental se transformaron las células competentes de la S-17 tomando 200 μ l en un tubo *ependorf*, y se añadió 1 μ l de DNA del vector pKT230LacZTGm2 previamente purificado por perclorato. Se mezcló y se dejó incubar en hielo por 30 min (durante este tiempo se puso a calentar el *ThermoBlock* a 42°C). Posteriormente, se dio a la muestra un choque térmico de 42 °C por 2 min, y se pasó el tubo inmediatamente a hielo. Se añadió 1 ml de LB y se incubó la muestra 1 h a 37 °C en agitación (200 rpm). Posteriormente, se sembraron 300 μ l de la muestra en placas de LB suplementado con antibiótico [Gm 30 μ g/ml], con

ayuda de un asa triangular o perlas de vidrio estériles. Se dejó incubar la placa 18 h aproximadamente a 37°C y si se observaban colonias, se seleccionaban 4 candidatas para verificar que sí contenían el vector.

8.8. Extracción de plásmidos por lisis alcalina (miniprep) para posterior uso en PCR

Se inocularon 3 ml de LB con Gm [30 µg/ml] con *E. coli* DH5α y se dejaron incubar toda la noche a 37° C en agitación a 200 rpm. Posteriormente, se centrifugaron las muestras 5 min a 6,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavaron las pastillas celulares con 1 ml de MgSO₄ 10 mM y se pasaron a microtubos tipo *ependorf* nuevos, posteriormente se volvió a centrifugar y se desechó el sobrenadante eliminando con la ayuda de la micropipeta cualquier residuo líquido. Se resuspendieron las pastillas con 150 µl de solución 1 (glucosa 10 mM, EDTA 2 mM, TrisHCl 5 mM pH 8.0) fría, después se agregaron 350 µl de solución 2 (NaOH 2 N 100 µl, SDS 10% 100 µl, Agua destilada 800 µl) recién preparada, se invirtieron los microtubos lentamente 20 veces. Se dejaron incubar 5 min en hielo. Pasado el tiempo, se agregaron 250 µl de solución 3 (Acetato de sodio o potasio [5 M], Ac. Acético Glacial y Agua destilada pH 4.8) y se agitó la muestra fuertemente con las manos hasta observar las muestras blanquecinas y se incubaron en hielo por 15 min. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 12,000 rpm y se transfirió el sobrenadante de cada muestra a microtubos tipo *ependorf* nuevos y se les añadió un volumen de isopropanol. Se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, se lavaron las pastillas de DNA 2 veces con 700 µl de etanol al 70%. Se centrifugó una última vez por 5 min a 12,000 rpm para descartar el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla a 50 °C. Una vez evaporado todo el etanol, se resuspendió la muestra en 15 µl de RNAsa diluida (2 mg/ml), y se incubó 1 h a 37°C. Se corroboró la extracción por electroforesis con gel de agarosa al 1%.

8.9. Conjugación biparental

Se usó la cepa S-17 transformada con pKT230LacZTGM2 como donadora. Se inició preparando cultivos de las cepas de *A. baumannii* AE12, AE15 y AE20 y de la S-17 en tubos Falcon (uno para cada cepa) con 3 ml de LB sin antibiótico y se dejaron incubar 12h a 37° C en agitación (200 rpm). Posteriormente, se centrifugaron las muestras 5 min a 6,000 rpm, después se decantó el medio y se procedieron a lavar las pastillas con MgSO₄ 10 mM. Una vez que se tuvieron las pastillas lavadas, se resuspendieron en 1 ml de LB sin antibiótico. Posteriormente, en microtubos tipo *ependorf* se prepararon mezclas de las cepas 1:1. Se tomaron 250 µl de cada cepa de *A. baumannii* y se les agregaron a cada una 250 µl de la cepa de *E. coli* S17.1. Se mezclaron suavemente y cada mezcla se sembró en “charco” (con mucho cuidado para evitar que se esparciera por toda la placa) en placas de LB sin antibiótico (Figura 3). Se dejaron secar y se incubaron 24h a 37° C. Después se tomó todo el crecimiento de cada placa con ayuda de un asa y se colocó cada uno en tubos *ependorf* con 1 ml de SSE mezclando bien. Se centrifugaron los tubos 2 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se lavaron las pastillas con 1 ml de SSE otra vez, se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió cada pastilla con 500 µl de SSE y se procedió a hacer en microtubos tipo *ependorf* una nueva dilución 1:10 de cada muestra (100 µl de muestra con 900 µl de SSE). Se sembraron 200 µl de estas diluciones en placas de LB con los antibióticos de selección Gm [30 µg/ml] y Km [20 µg/ml] (kanamicina) con ayuda de perlas de vidrio y se dejaron incubar toda la noche a 37° C.

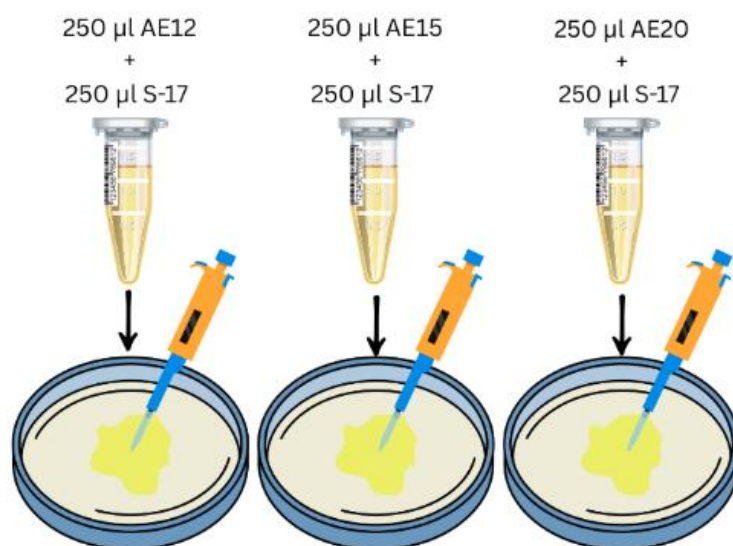


Figura 3. Representación gráfica del experimento de conjugación. Se mezclaron en tubos eppendorf 250 µl de los cultivos de cada cepa con 250 µl de la cepa S-17, se mezclaron y se sembraron en charco en placas de LB sin antibióticos, evitando que se extendiera el líquido por toda la placa.

8.10. Condiciones de PCR para amplificar *lacZ*

Tabla 6. Mix para realizar PCR del gen *lacZ* utilizando DreamTaq polimerasa.

Reactivo	Volumen añadido a la reacción	Concentración final
Primer F [25 µM]	0.3µl	0.75 µM
Primer R [25 µM]	0.3 µl	0.75 µM
Buffer de reacción [10 X]	1 µl	1 x
dNTPs [10 mM]	0.3 µl	0.75 µM
DreamTaq [5U/µl]	0.1 µl	0.05 U
H ₂ O libre de nucleasas	7.5 µl	
cDNA [N/A]	1 µl	N/A

Tabla 7. Secuencia de los *primers* y condiciones de PCR para amplificar el gen *lacZ*.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (Kb)	Condiciones de reacción	Referencia
LacZTFw	AAAAGCTTAGCCAGTTCC	3	95°C 5 min 95°C 45 seg 50°C 1 min 72°C 3 min 72°C 5 min	Castañeda-Lucio, M., et al.
LacZTRv	GTCTGCAGCCATGATAAAAAA			

8.11. Extracción de DNA total de *A. baumannii*

Se partió de cultivos de 3 ml de BHI crecidos por 18 h a 37 °C en agitación, se recolectaron las pastillas celulares por centrifugación y se lavaron con 1 ml de SSE. Las pastillas resultantes se resuspendieron en 400 µl de solución TE (Tris 50 mM-EDTA 20mM) 50:20. Se agregaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml), se mezclaron y se incubaron a 37 °C por 30 min. Después, se agregaron 50 µl de proteasa (10 mg/ml), mezclaron y se incubaron otros 30 min a 37 °C. Pasado el tiempo, se agregaron 50 µl de SDS 10%, mezclaron y se incubaron 15 min a 37 °C (o hasta que se observó una solución viscosa). Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M y se incubaron a 65 °C por 10 min. Luego, se agregaron 80 µl de CTAB 10%/NaCl 0.7M (incubado previamente a 65°C), mezclaron y se incubaron 20 min a 65 °C. Se agregaron 500 µl de Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1, se agito con vórtex cada muestra y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se agregaron tres volúmenes de yoduro de sodio (NaI) 6M, luego se agregaron 10 µl de sílica y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron por medio minuto y se descartó el sobrenadante. Las pastillas de sílica se lavaron 3 veces con 700 µl de *New wash*. Después de los lavados se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se secaron las pastillas a 55 °C por el tiempo necesario. Se resuspendieron las pastillas con 30 µl de RNAsa diluida (2mg/ml) y se incubaron a 37°C por 1h y 30 min. Pasado el tiempo, se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min y se recuperó el sobrenadante en tubos nuevo, se verificaron las extracciones por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras se congelaron a -20° C hasta su próximo uso.

8.12. Purificación de productos de PCR por el método de sílica

A un volumen total de reacciones de PCR se agregaron 3 volúmenes de NaI 6M y 10 µl de sílica, y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm 1 min. Las pastillas se lavaron 2 veces con 700 µl de *New wash* (se resuspendieron suavemente en cada lavado, no agitar en vórtex). Después del último lavado se centrifugaron 4 minutos a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y las pastillas se secaron a 50 °C. Una vez secas, se resuspendieron

en 25 µl de agua estéril con ayuda del vórtex, se centrifugaron otra vez 4 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en microtubos nuevos. Se verificaron las purificaciones en geles de agarosa al 1% y se congelaron a -20° C hasta su próximo uso.

8.13. Extracción de plásmido por columna de sílica

Se partió de un cultivo de 50 ml de LB suplementado con antibióticos de selección necesarios y se incubó a 37°C por 18h en agitación (200 rpm). Posteriormente se centrifugó el medio para obtener la pastilla celular y se resuspendió con 10 ml de MgSO₄ 10 mM. La muestra se dividió en 10 microtubos tipo *ependorf*, 1 ml en cada uno y se centrifugaron para obtener las pastillas celulares y decantar el sobrenadante. Se seleccionaron 4 pastillas para continuar con el protocolo y las restantes se congelaron a -20°C como reserva. Se resuspendieron las pastillas seleccionadas en 100 µl de solución 1 (glucosa 10 mM, EDTA 2 mM, TrisHCl 5 mM pH 8.0) adicionada con RNAsa (1 mg/ml). Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución 2 (NaOH 2 N 100 µl, SDS 10% 100 µl, Agua destilada 800 µl) y se agitaron suavemente por inversión 20 veces hasta ver el aclaramiento de la suspensión celular. Se incubaron por 5 min en hielo y se agregaron 150 µl de solución 3 [Acetato de sodio o potasio (5 M), Ac. Acético Glacial y Agua destilada pH 4.8]. Se agitaron fuertemente con la mano hasta que se formó un precipitado blanquecino y se incubaron por 5 min en hielo. Pasado el tiempo, se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min y se transfirió el sobrenadante a microtubos tipo *ependorf* nuevos. Posteriormente, se añadieron 450 µl de NaI 6M. Se prepararon las columnas de sílica de 8 capas añadiendo 200 µl de NaI 6M y dejándolas reposar 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm y se desechó el NaI filtrado. A las columnas activadas se les añadió toda la muestra y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm y el filtrado se volvió a colocar en la columna y se volvió a centrifugar a la misma condición y se desechó el filtrado. Se lavaron las columnas 2 veces con 500 µl de *New wash* centrifugando 1 min a 13,000 rpm. Descartado el último filtrado, se centrifugaron las columnas 5 min a 13,00 rpm con la tapa abierta para secarlas.

Para garantizar el secado de las columnas, se dejaron secando a temperatura ambiente 15 min y se volvieron a centrifugar por 2 min. Por último, se añadieron 50 µl de agua estéril a las columnas y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente, Las columnas se colocaron en microtubos tipo *ependorf* nuevos y se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm para recuperar el filtrado. Las muestras fueron verificadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se congelaron a -20° C hasta su próximo uso.

9. RESULTADOS

9.1. Análisis bioinformático de la asociación de los genes *bla*_{OXA-72}-ISAb_a-48

Se decidió realizar una comparación de la región intergénica de la asociación ISAb_a-48-*bla*_{OXA-72}, en los plásmidos pAbaAN71 y pAbaAE38 (secuencias pertenecientes al LMHyC), y otros plásmidos de *A. baumannii* reportados en el GenBank (tabla 8) entre los que se encuentran pAba10042a (NZ_OR436920.1) que porta la misma asociación ISAb_a-48-*bla*_{OXA-72}, y los plásmidos pA52-OXA-72 (NZ_CP034097.1), pAbIHIT32296 (NZ_KY704308.1) y pIII_JAB108 (NZ_CP121618.1) que únicamente portan *bla*_{OXA-72}, y que río arriba están presentes otros genes no identificados en su totalidad (Figura 4).

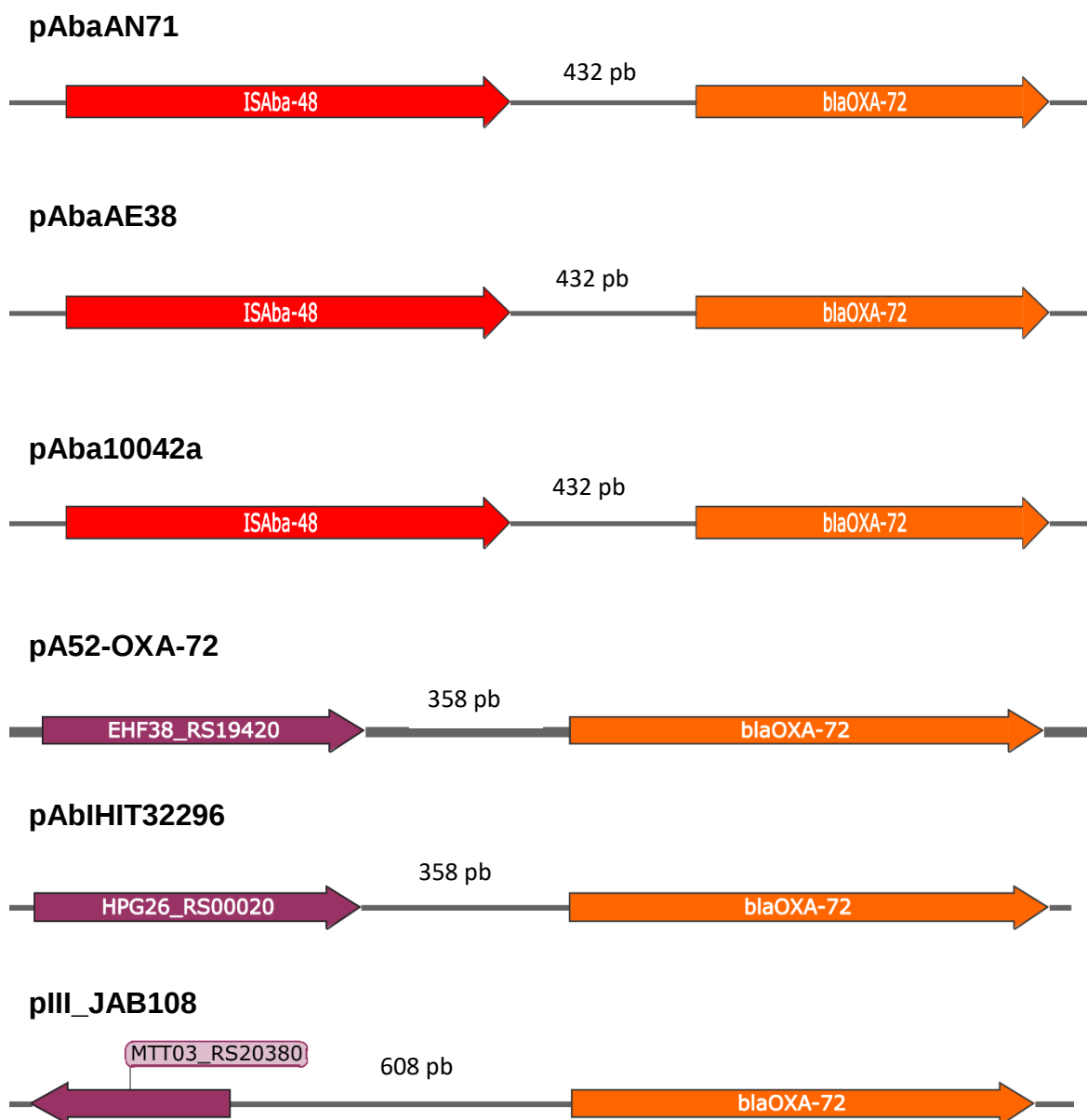


Figura 4. Arreglo genético de *bla*_{OXA-72} en los diferentes plásmidos analizados. Se muestran los 3 plásmidos con la asociación *ISAbA-48-bla*_{OXA-72} y los tres sin ella, se señala el tamaño de las regiones intergénicas entre *bla*_{OXA-72} y el gen más próximo río arriba.

Lo primero que se pudo observar es que las regiones analizadas variaban en tamaño. En las secuencias de las regiones intergénicas *ISAbA-48-bla*_{OXA-72}, de los plásmidos pAbaAN71, pAbaAE38 y pAba10042a, se encontró un tamaño de 432 pb. Mientras que, en los plásmidos (pA52-*OXA-72*, pAbIHIT32296, pIII_JAB108) que no se encontraba esta asociación, la región intergénica entre *bla*_{OXA-72} y el gen más

próximo río arriba, fue de tamaños variables encontrando: 358 pb y 608 pb respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Regiones intergénicas de la asociación genética ISAb-48-*bla*_{OXA-72} de diferentes plásmidos de *A. baumannii*

Plásmido	Tamaño de la secuencia intergénica (pb)	Asociación genética	Número de acceso/Referencias
pAbaAN71	432	ISAb-48 - <i>bla</i> _{OXA-72}	Jiménez-Villalpando, 2022
pAbaAE38	432	ISAb-48 - <i>bla</i> _{OXA-72}	Jiménez-Villalpando, 2022
pAba10042a	432	ISAb-48 - <i>bla</i> _{OXA-72}	NZ_OR436920.1
pA52-OXA-72	358	EHF38_RS19420- <i>bla</i> _{OXA-72}	NZ_CP034097.1
pAbIHIT32296	358	HPG26_RS00020 - <i>bla</i> _{OXA-72}	NZ_KY704308.1
pIII_JAB108	608	MTT03_RS20380 - <i>bla</i> _{OXA-72}	NZ_CP121618.1

En los plásmidos pA52-OXA-72 y pAbIHIT32296, los genes río arriba de *bla*_{OXA-72} no han sido identificados completamente, solo se reportaron con los códigos EHF38_RS19420 y HPG26_RS00020, respectivamente. Sin embargo, se sugiere que ambos genes codifican para una proteína del tipo N-acetiltransferasa de la familia GNAT(Jia et al., 2019).

Por otro lado, el plásmido pIII_JAB108 reporta al gen MTT03_RS20380 como gen asociado río arriba de *bla*_{OXA-72}, que codifica para una proteína del sistema toxina-antitoxina tipo II, de la familia de toxinas RelE/ParE.

En el alineamiento múltiple de las seis regiones intergénicas seleccionadas se realizó utilizando la herramienta Clustal Omega (Figura 5), se pudo observar que una sección de ~100 pb de todas las secuencias esta conservada. Debido a que un alto grado de conservación entre secuencias de diferentes orígenes podría sugerir que hay un marco de lectura abierto, se decidió hacer un análisis con la herramienta *ORFfinder* (Figura 6) de toda la región intergénica ISAb-48-*bla*_{OXA-72} del plásmido pAbaAN71.

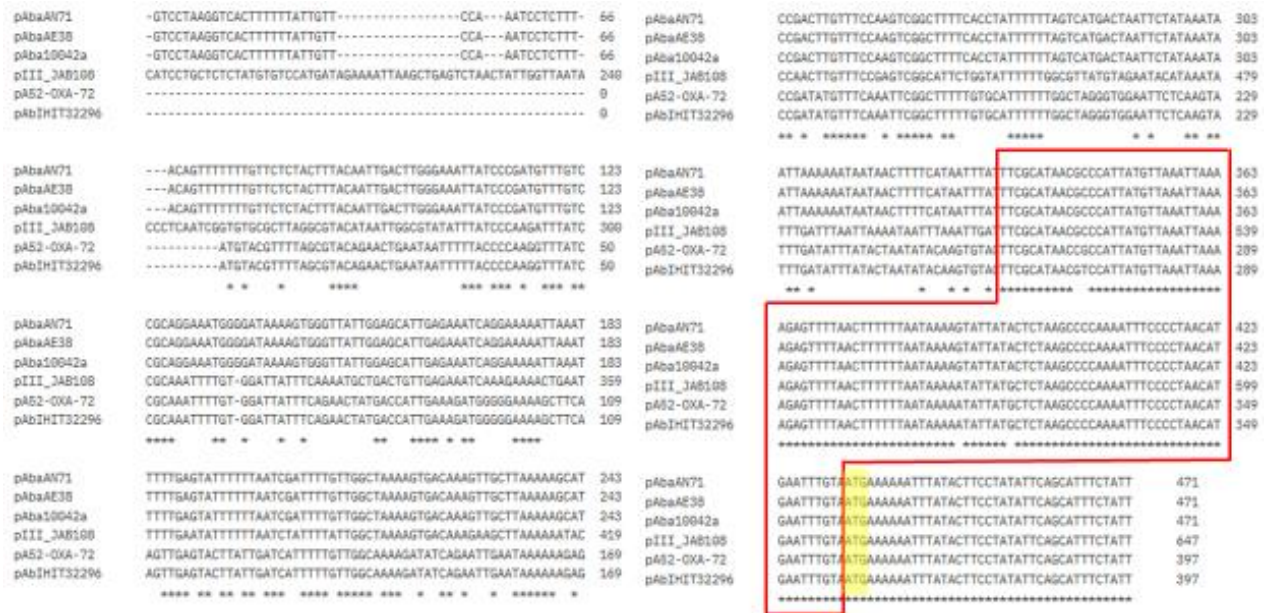


Figura 5. Alineamiento múltiple de regiones intergénicas de la asociación ISAb48 - bla_{OXA-72} y secuencias intergénicas de bla_{OXA-72} en asociación con otro gen. Se marca con un recuadro rojo la región conservada en todas las secuencias justo antes del codón de inicio de bla_{OXA-72} que se resalta con amarillo

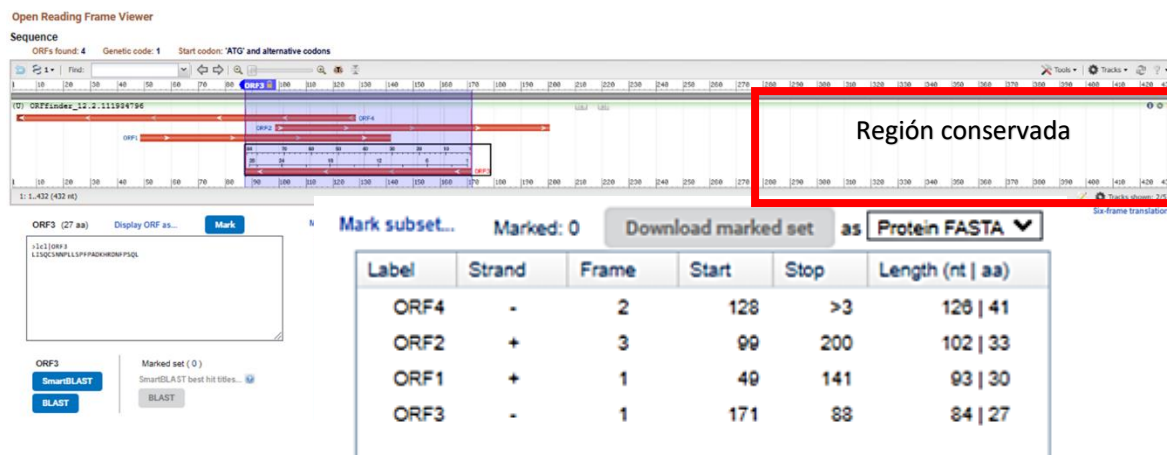


Figura 6. Marcos de lectura abiertos identificados en la región intergénica ISAb48-bla_{OXA-72}. Se identificaron 4 posibles marcos de lectura abiertos, el más grande de 41 aminoácidos y el más pequeño de 27 aa. Se resalta con un recuadro rojo la región conservada de la región intergénica. Análisis realizado con ORFfinder.

La base de datos *ORFfinder* predijo 4 posibles marcos de lectura abiertos en la zona que no estaba conservada entre todos los plásmidos (Anexo 1). Todos los ORF eran pequeños, el mayor tenía una longitud de 126 nucleótidos (nt), y de aminoácidos (aa) de 41, mientras que el menor tenía 84 nt y 27 aa. En la región conservada de la región intergénica no se encontró ninguna predicción por *ORFfinder* de algún ORF que pudiera estar codificando para un gen, posiblemente porque el tamaño es pequeño o por que no hubo similitud con ningún gen reportado en las bases de datos.

Posteriormente, se continuó con la búsqueda de posibles promotores para *bla_{OXA-72}*. Se analizó un fragmento 24747 pb de la secuencia del plásmido pAbaAN71 en el que se encontraban nuestros genes de interés con la región intergénica entre ellos (Figura 7 A). Este fragmento se seleccionó para conocer los posibles promotores río arriba de *ISAb_a-48* y dentro de la secuencia de este gen que pudieran estar influenciando la transcripción de *bla_{OXA-72}*. De las predicciones encontradas utilizando BProm (Solovyev & Salamov, 2011) (Anexo 2), tres se destacaron por su posición. En la región intergénica *ISAb_a-48-bla_{OXA-72}*, se encontró una predicción (-10 TTAAAAAAT; -30 ATGACT) cercana al codón de inicio de *bla_{OXA-72}*. Sin embargo, río arriba, dentro de lo que sería la región terminal del gen *ISAb_a-48*, se predijo otro posible promotor (-10 GGCTATAGT; -30 TTGTGA), que, a pesar de su lejanía del codón de inicio de *bla_{OXA-72}*, todavía se encuentra dentro del rango de aproximadamente 600 pb que puede llegar a medir una región reguladora, por lo que fue tomada en cuenta (Figura 7 A). A su vez, río arriba de *ISAb_a-48*, hubo otra predicción (-10 CATTAACCTT; -30 TTAAA) que podría ser el propio promotor de este gen y se tomó en cuenta ya que, podría estar teniendo una

influencia en la transcripción de *bla_{OXA-72}* si es que ambos genes se encontraran en una sola unidad transcripcional.

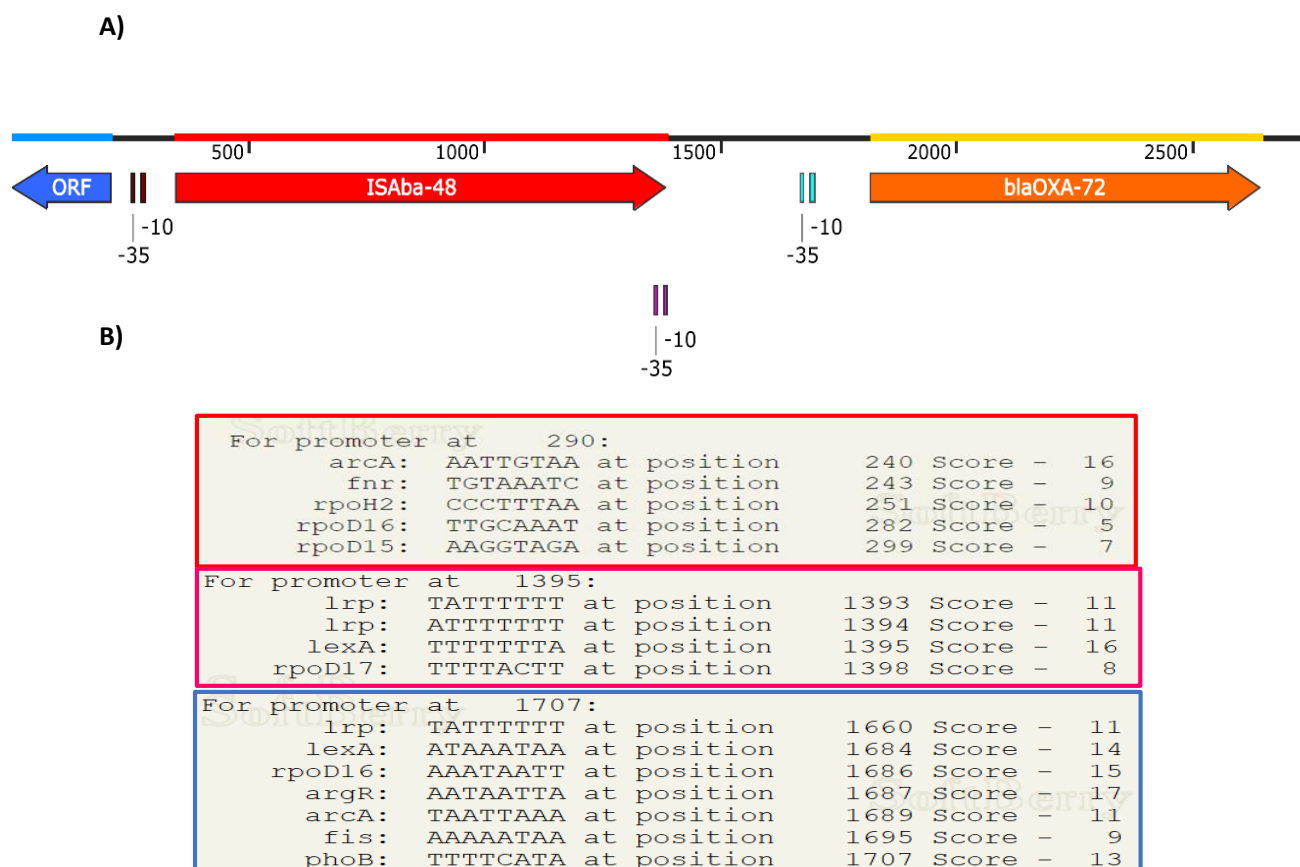


Figura 7. Predicción de promotores, su posición en la secuencia analizada y los sitios de regulación que presentan. A) Azul: ORF más próximo río arriba de *ISAbA-48*; Rojo: *ISAbA-48*; Naranja: *bla_{OXA-72}*; Los promotores predichos por Bprom: se resaltaron con colores dentro del gráfico de la secuencia para visualizar su posición, con morado se resalta el promotor a final de la secuencia de *ISAbA-48*, con azul el más próximo al codón de inicio de *bla_{OXA-72}* y con rojo el promotor río arriba de *ISAbA-48*. B) Reguladores reportados para cada promotor de interés, se respeta el mismo código de color descrito anteriormente. Datos obtenidos en BProm.

Como no se puede atribuir completamente la regulación de *bla_{OXA-72}* a la simple acción del promotor, se decidió buscar otros sitios de regulación de expresión transcripcional. De acuerdo con los resultados de Bprom, el promotor predicho en la región intergénica *ISAbA-48-bla_{OXA-72}* (-10 TTAAAAAAT; -30 ATGACT), reportó sitios de regulación para *lexA*, *lrp*, *rpoD16*, *argR*, *arcA*, *fis* y *phoB*. Mientras, que el segundo promotor (-10 GGCTATAGT; -30 TTGTGA) cuenta con sitios *lexA*, *lrp* y

rpoD17 y el promotor (-10 CATTAAGTT; -30 TTAAA) sitios *arcA*, *fnr*, *rpoH2**rpoD16* y *rpoD15* (figura 7 B).

Debido a las limitaciones de BProm, cuya última modificación fue en el 2016, se decidió utilizar otro predictor de promotores más actualizado. El programa seleccionado fue Sapphire (Coppens & Lavigne, 2020) (Anexo 3), cuya última actualización fue en el año 2021. Dicho programa arrojó un mayor número de predicciones de promotores en la misma región analizada anteriormente. Algo a destacar, es que la predicción de este programa coincidió con lo predicho por Bprom. Sin embargo, Sapphire también predijo otro promotor más próximo al codón de inicio de *bla_{OXA-72}* (Figura 8).

Ya que estas predicciones se localizaron en la región intergénica *ISAb_a-48-bla_{OXA-72}*, se buscó su posición dentro de los alineamientos múltiples de las secuencias intergénicas que anteriormente se habían analizado. Así se pudo observar que el primer promotor (-10: TATACT; -35: TTTACT) más próximo a *bla_{OXA-72}* está presente tanto en secuencias con la asociación *ISAb_a-48-bla_{OXA-72}* como sin ella; mientras que el segundo promotor que coincidió en ambos buscadores (-10: AAAAAT; -35: ATCACT) solo se encontró en aquellas secuencias que provienen de plásmidos con la asociación *ISAb_a-48-bla_{OXA-72}*. (Figura 9).

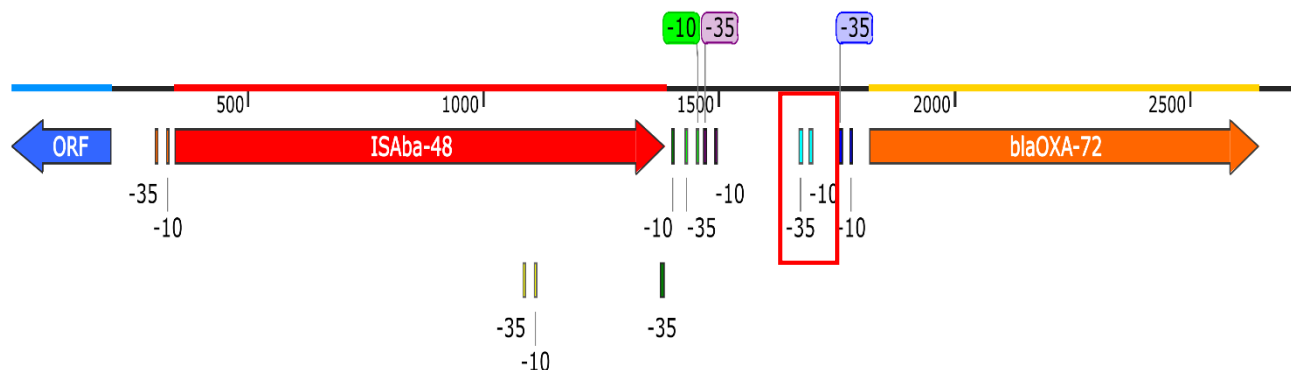


Figura 8. Promotores y su posición dentro de la secuencia intergénica *ISAb_a-48-bla_{OXA-72}*. código de colores en la secuencia: Azul: gen más próximo río arriba de *ISAb_a-48*; Rojo: *ISAb_a-48*; Naranja: *bla_{OXA-72}*; promotores y su posición en la secuencia analizada, en el recuadro rojo se resalta la coincidencia de Sapphire con Bprom. Promotores predichos por Sapphire.



Figura 9. Alineamientos para mostrar las posiciones de los dos promotores más próximos al inicio de *bla*_{OXA-72} predichos de acuerdo con ambas bases de datos. A) posición del promotor predicho solo por *Sapphire*. B) posición del promotor predicho por ambas bases y que solo se encuentra en las secuencias de plásmidos con la asociación *ISAbA-48-bla*_{OXA-72}.

Con estos análisis, ya conociendo la posición en la secuencia de estos promotores (Figura 7), se diseñaron juegos de *primers* de forma manual que nos permitieran amplificar 3 secciones, la primera con un tamaño de 662 pb (O1), la segunda con 288 pb (O2) y la última con 175 pb (IS). Todos los *primers* contenían sitios de restricción para *Xho*I, sitio presente también en el sitio de multiclonación de nuestro vector. Estos *primers* se probaron y se estandarizaron las condiciones óptimas para obtener los amplificados (tabla 9).

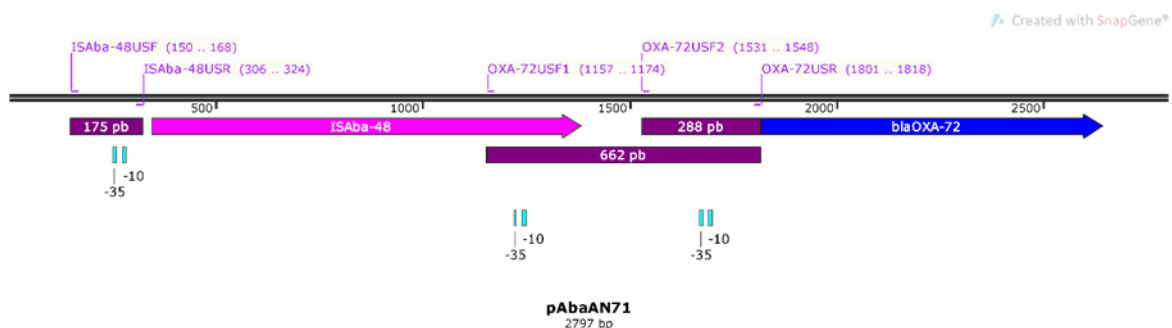


Figura 10. Predicción de promotores y su posición dentro de la secuencia de la asociación intergénica *ISAbA-48-bla*_{OXA-72}. De rosa se encuentra señalado el gen *ISAbA-48*, de azul rey *bla*_{OXA-72}, de azul cielo los promotores predichos, los rectángulos morados señalan los amplificados esperados con los *primers* que se señalan de morado en la parte superior.

Tabla 9. Secuencias de *primers* para amplificar las regiones reguladoras y condiciones de PCR.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Nombre y tamaño del amplicón (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
ISAbA-48Fw	CAA CTCGAG GATAACCTCTTAGAGCTAG	IS: 175	95°C 30 seg	Este trabajo
ISAbA-48Rv	TTG CTCGAG GTAGGCTACATCCTAGTCT		95°C 30 seg	
OXA-72Fw1	CAA CTCGAG CAGGTGCATCGGGAGTTA	O1: 662	56°C 30 seg	
OXA-72Fw2	TAA CTCGAG GTGGGTTATTGGAGCATT	O2: 288	72°C 30 seg	
OXA-72Rv	TAA CTCGAG ACAAATTCATGTTAGGGG		72°C 5 min	

Bajo estas condiciones y con estos *primers* fue que se lograron obtener los productos deseados para probar las regiones reguladoras (figura 11). Estos amplificados se logró purificar por el método de sílica para su posterior tratamiento con *Xho*I para liberar los extremos.

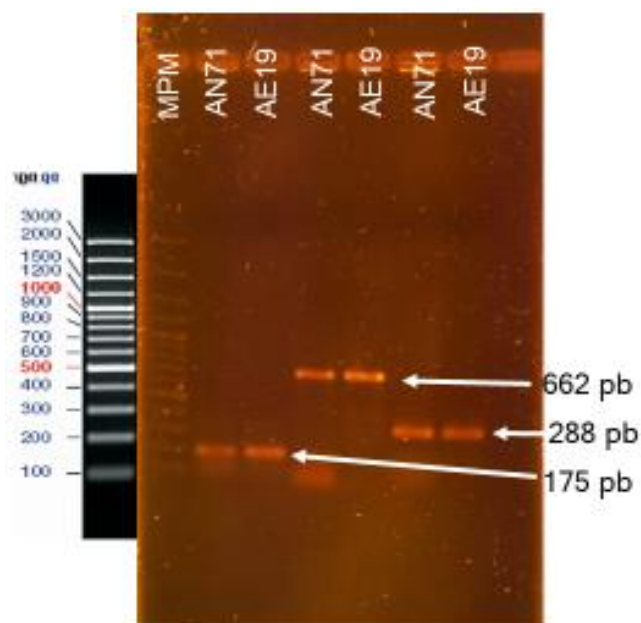


Figura 11. Electroforesis de los amplificados de PCR de las regiones reguladoras a clonar en el vector pKT230LacZTGM2. Carril 1 MPM, Carril 2 amplificado IS en la cepa AN71, Carril 3 amplificado IS en la cepa AE19, Carril 4 amplificado O1 en la cepa AN71, Carril 5 amplificado O1 en la cepa AE19, Carril 6 amplificado O2 en la cepa AN71 y Carril 7 amplificado O2 en la cepa A19.

9.2. Expresión conjunta de ISAb_a-48 y bla_{OXA-72} en una sola unidad transcripcional

Para realizar los ensayos de RT-PCR punto final que nos permitieran determinar si bla_{OXA-72} se transcribe en una sola unidad transcripcional con ISAb_a-48, se diseñaron tres pares de *primers* utilizando la secuencia de la región del plásmido pAbaAN71 donde se encuentran la región intergénica de nuestros genes de interés y la región codificante de ambos (Figura 8). El primer par se diseñó de forma manual para amplificar la región intergénica (par: ISAb_a-OXAFw/Rv). Adicionalmente, se diseñaron otros dos pares de *primers* para amplificar regiones de 427 pb de ISAb_a-48 (par: ISAb_a-48Fw/Rv) y 408 pb de bla_{OXA-72} (par: OXA-72Fw/Rv), utilizando la herramienta PrimerQuest™. Estos dos últimos pares se utilizaron como control de la expresión individual de ambos genes. En conjunto, se encontraron las condiciones idóneas de amplificación para este ensayo (tabla 10).

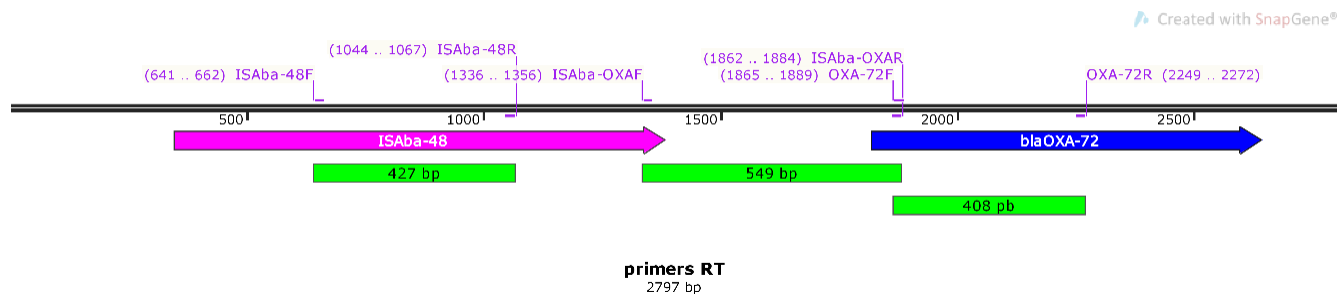


Figura 12. Esquema representativo de la posición de los *primers* para amplificar fragmentos de ISAb_a-48, bla_{OXA-72} y toda la región intergénica. En color morado se muestran los nombres de los *primers* y su posición en la secuencia. Flecha rosa: ISAb_a-48; flecha azul: bla_{OXA-72}; rectángulos verdes: representación de los amplificadores de cada par de *primers* y su tamaño. Figura realizada con SnapGene Viewer.

Tabla 10. Secuencias y condiciones de amplificación de los *primers* diseñados para los ensayos de RT-PCR.

Primer	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)	Condiciones de reacción	Referencia
ISAb _a -48Fw	GGCAGAGTCATCAAGGGAATAG	427	95°C 30 seg 95°C 30 seg 60°C 30 seg 72°C 30 seg 72°C 5 min	Este estudio
ISAb _a -48Rv	CGGTAGAGAACGGTAAACAGTAAA			
OXA-72Fw	TCTCTCAGTGCATGTTTCATCTATTA	408		
OXA-72Rv	CCGCTTTACTTCTTCTGCATTAG			

ISAbA-OXAFw	GCGAGAACAACCTCAGAAAGCC	549		
ISAbA-OXARv	GATGAACATGCACTGAGAGAAAC			

Por otro lado, se estandarizó la técnica de extracción de RNA de *A. baumannii* por el método de fenol caliente, ya que esta fue la que nos permitió obtener un mejor rendimiento y calidad de muestra de todos los protocolos probados (TRIzol, RNeasy mini kit Qiagen, columna de sílica). Todas las cepas seleccionadas para este ensayo portan el mismo plásmido que contiene a blaOXA-72 en asociación con ISAbA-48, pero reportan diferentes resistencias a los carbapenémicos (Verdugo-Yocupicio, 2020) y diferente fondo genético (Tabla 3). Las cepas AE19 y AE38 se crecieron a una concentración de 100 µg/ml de IMP y MEM y la cepa AE16 fue crecida en medio con MEM a una concentración de 50 µg/ml y de IMP a 100 µg/ml. Posteriormente, se obtuvo el cDNA de las muestras utilizando los *primers* reversos diseñados para este experimento. Antes de realizar las RT-PCR punto final, fue necesario comprobar que las muestras de RNA obtenidas previamente no estuvieran contaminadas con DNA, aún si en la electroforesis no se observaba. Para esto, se realizaron PCRs usando como molde cada extracción de RNA. Se utilizó el par de los *primers* para amplificar la región intergénica diseñado para este trabajo. Como controles positivos, se usaron muestras de DNA total de las cepas AE19 y AE16.

Las muestras de RNA fueron consideradas idóneas para continuar con la RT-PCR si al revelar las PCRs resultaban negativas debido a la ausencia de DNA. Con este ensayo se pudo corroborar que los genes ISAbA-48 y blaOXA-72 se transcriben en presencia de IMP y MEM en todas las cepas (Figura 13: A y B). Sin embargo, la región intergénica solo resultó positiva para la cepa AE16 crecida en IMP, sugiriendo que bajo esta condición se está transcribiendo blaOXA-72 en un mRNA largo (Figura 13 C).

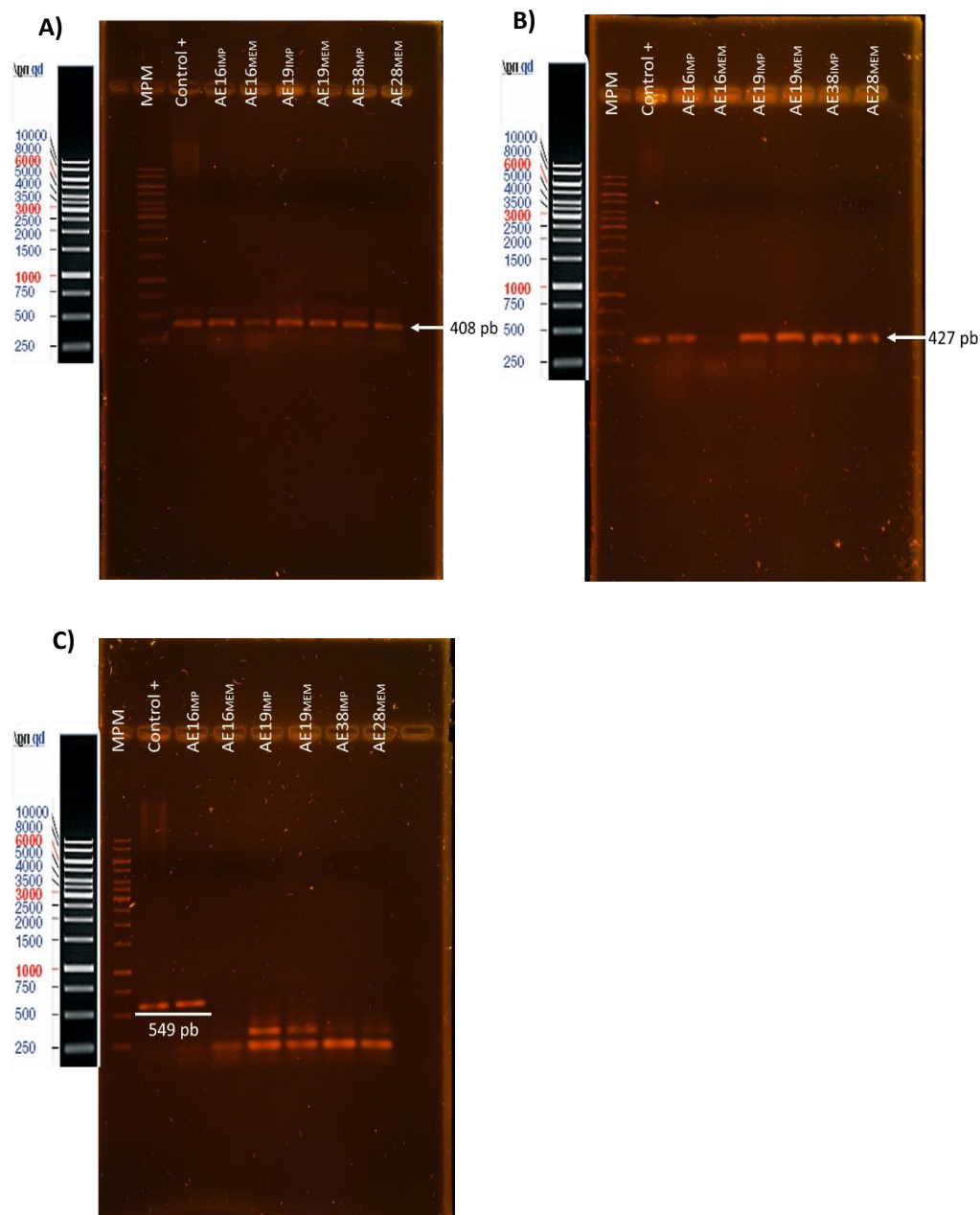


Figura 13. Electroforesis de las RT-PCR punto final. A) RT-PCR del gen *bla*_{OXA-72}, todas las muestras fueron positivas a la expresión del gen en presencia de IMP y MEM. **B)** RT-PCR del gen *ISAb*_{a-48}. **C)** RT-PCR de la región intergénica, solo AE16 crecida en IMP [100 ug/ml] resultó positiva. En todos los geles se cargaron las muestras de la siguiente manera: carril 1 MPM, carril 2 control positivo, carril 3 AE16_{IMP}[100 ug/ml], carril 4 AE16_{MEM}[50 ug/ml], carril 5 AE19_{IMP}[100 ug/ml], carril 6 AE19_{MEM}[100 ug/ml], carril 7 AE38_{IMP}[100 ug/ml], y carril 8 AE38_{MEM}[100 ug/ml].

9.3. Construcción de un vector estable en *A. baumannii*

Para poder analizar las regiones reguladoras determinadas con el ensayo bioinformático, y para contrarrestar la problemática de una falta de disponibilidad de vectores comerciales estables en *A. baumannii* se decidió construir un derivado del plásmido RSF1010, cuyos derivados han demostrado ser estables en esta bacteria (Jie et al., 2021).

Se decidió modificar el derivado de RSF1010, pKT230 (Figura 14 A) para generar nuestro vector final. Este vector se modificó clonando un gen reportero (*lacZ*), que se obtuvo por PCR del vector pUMATcLacZ (Figura 14 B), este amplificado contenía sitios de restricción *Pst*I y *Hind*III que permitieron su clonación. LacZ fue seleccionado como reportero ya que *A. baumannii* es una bacteria no fermentadora y no posee el operon *lac* en su genoma. Adicionalmente, se clonó un marcador de selección, un casete de resistencia a gentamicina (Gm), que se obtuvo por restricción con *Hind*III y *Bam*HI del vector pBSL141 (Figura 14 C). Toda la modificación de pKT230 fue realizada en colaboración con la alumna de la licenciatura en biotecnología Ana Karen Avendaño Gutiérrez cuya tesis está en proceso.

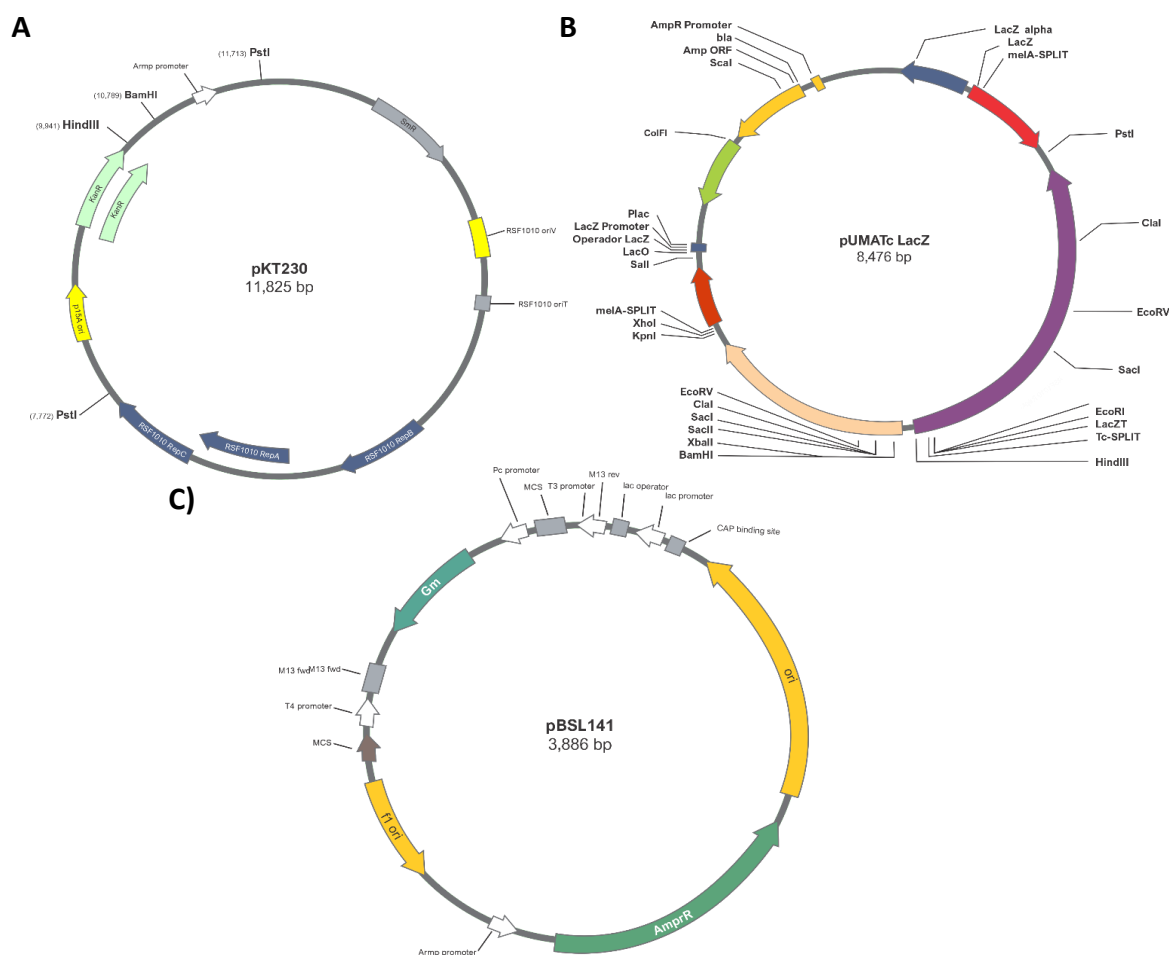


Figura 14. Esquemas de los vectores utilizados para construir pKT230LacZTGM2. A) pKT230 original. B) pUMATcLacZ, plásmido del que se amplificó el reportero LacZT. C) pBSL141, plásmido del que se obtuvo mediante enzimas de restricción el casete de resistencia a Gm

El vector final se nombró pKT230LacZTGM2 (Figura 15). Este vector contó por completo con 2 casetes de selección, al anteriormente descrito para resistencia a Gm y otro para resistencia a Sm. Se escogió como gen reportero para generar fusiones transcripcionales el gen *lacZ*, que codifica para β -galactosidasa. El casete de resistencia a Gm y el gen *lacZ* fueron insertados en direcciones opuestas uno de otro para evitar que el propio promotor del casete influyera en la expresión de *lacZ* y por consiguiente causara problemas en los ensayos de expresión.

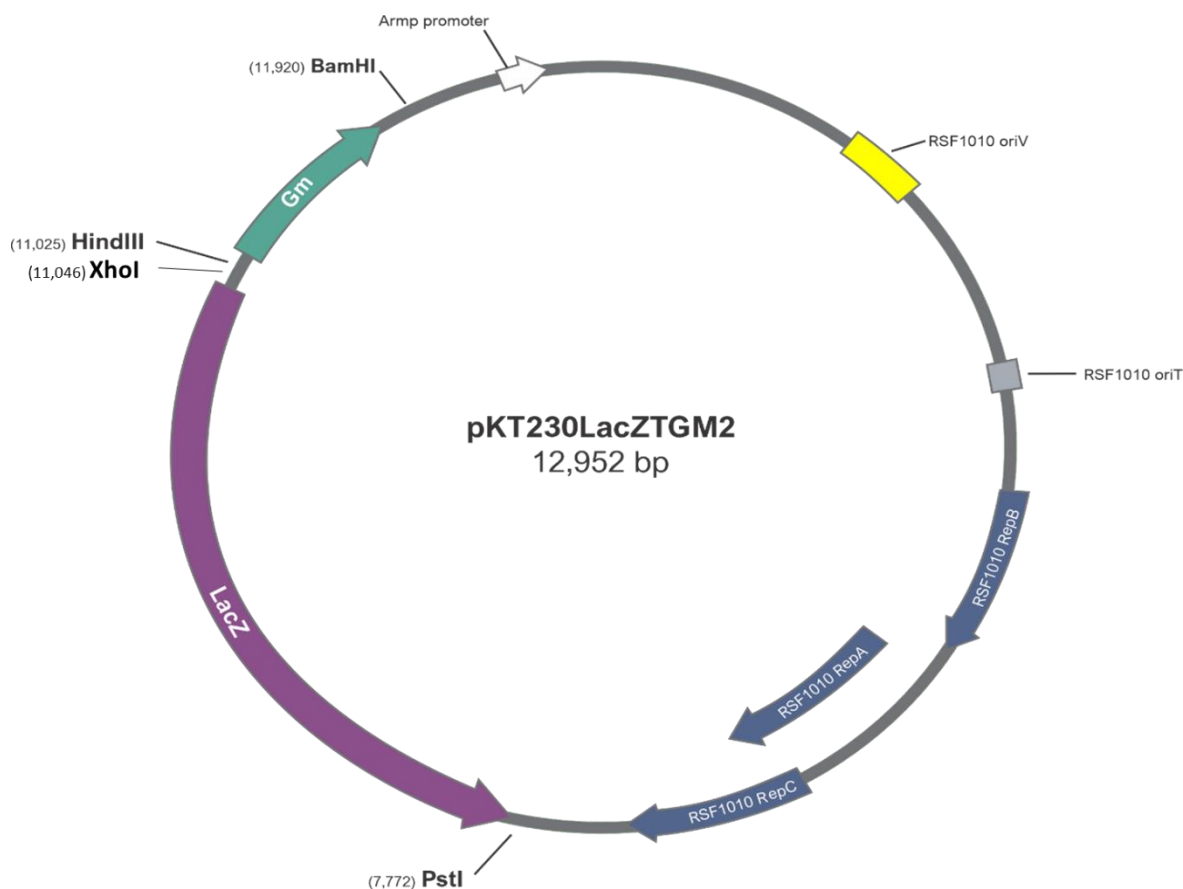


Figura 15. Esquema del vector pKT230LacZTGM2. De morado se encuentra señalado el reportero lacZT y en verde el casete de resistencia a Gm. En amarillo se encuentra señalado el oriV del plásmido y en gris el oriT,

Antes de insertar las regiones reguladoras a estudiar en el vector pKT230LacZTGM2, se decidió estandarizar el método por el cual clonar el vector en cepas de *A. baumannii* origen hospitalario eligiendo a las cepas AE12, AE15 y AE20 como receptoras para este ensayo. Inicialmente, se intentó hacerlo por electroporación de acuerdo con la metodología de Jie *et al.*, 2021. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, por lo que se decidió intentarlo por conjugación biparental utilizando a la cepa de *E. coli* S-17 como donadora, transformándola previamente con nuestro vector purificado por miniprep y se utilizaron las cepas AE15, AE20 y AE12 como receptoras.

Posterior a la conjugación, se procedió a seleccionar candidatas para determinar si en realidad portaban y mantenían el plásmido pKT230LacZTGM2. Se seleccionaron 4 colonias probables transconjugantes AE15, AE20 y AE12 de cada ensayo y se

sembraron por estría cruzada en placas de LB [30 µg/ml de Gm, 20 µg/ml de Km] y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente, se resembraron con las mismas concentraciones de antibióticos a las 24 h, 48 h y 72 h para comprobar la estabilidad del vector, en conjunto se hicieron resiembras de las mismas candidatas pero son la presencia de los antibióticos de selección para comprobar si el vector seguía estable en las transconjugantes sin la presión de selección. Con la resiembra de 72 h en antibiótico, se realizó un cultivo en LB líquido con las mismas concentraciones de antibiótico y también se realizaron cultivos de la resiembra de 72 h sin antibiótico, para realizar extracciones de plásmido por perclorato a cada una. Adicionalmente, se usó como control la extracción por perclorato de *E. coli* DH5α :: portando el vector pKT230LacZTGM2 (12.9kb). Así se confirmó que todas las transconjugantes efectivamente habían adquirido el vector (Figura 16 A) tanto en presencia del antibiótico de selección como sin él. Para garantizar que se trataba de pKT230LacZTGM2, se amplificó el gen *lacZ* (Figura 16 B) utilizando como molde las extracciones anteriores de plásmido de la cepa AE15, resultando positivas tanto en la extracción plasmídica de la cepa crecida en presencia de los antibióticos de selección, como sin ellos (producto de 3 kb). Así, se comprobó que el pKT230LacZTGM2, siendo un derivado del RSF1010, es estable y aceptado por cepas de *A. baumannii* de origen clínico.

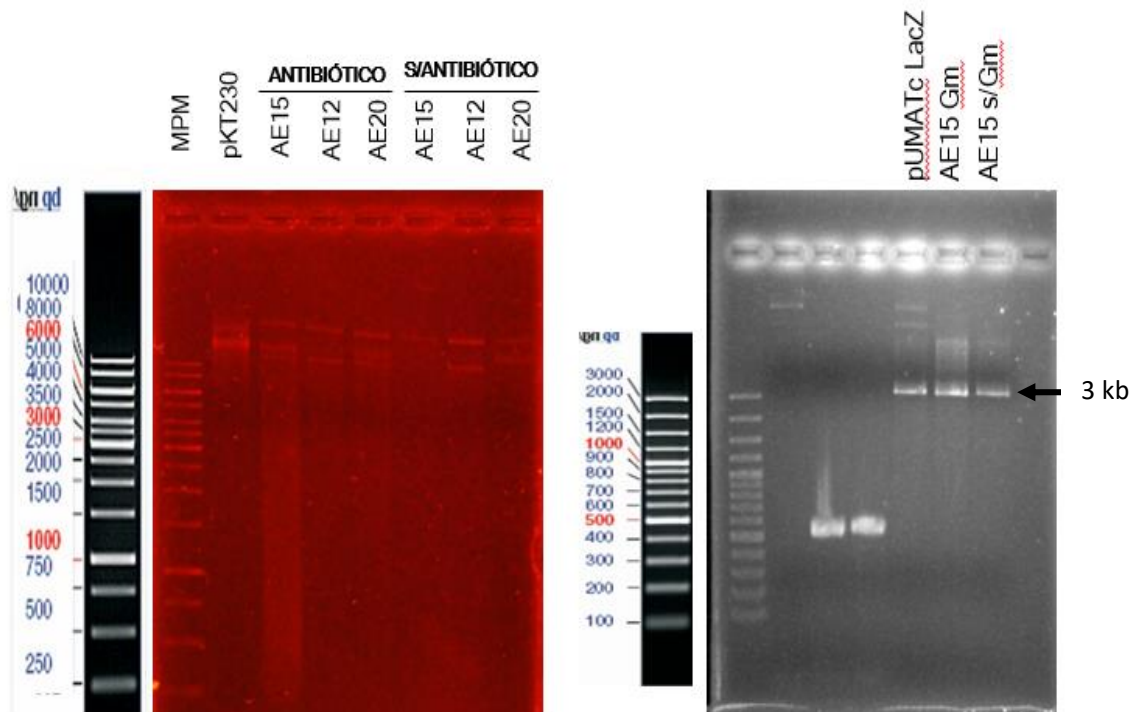


Figura 16. Presencia de pKT230LacZTGM2 en las transconjugantes obtenidas. A) extracción de plásmidos tras 72 h de las transconjugantes crecidas en medio suplementado con Gm. **Carril 1** MPM, **Carril 2** control positivo, extracción del pKT230 de un *E. coli* DH5 α , **Carril 3** transconjugante 1 de AE15 en pases con Gm, **Carril 4** transconjugante 1 de AE12 en pases con Gm, **Carril 5** transconjugante 1 de AE20 en pases con Gm, **Carril 6** transconjugante 1 de AE15 en pases sin Gm, **Carril 7** transconjugante 1 de AE25 en pases sin Gm, **Carril 8** transconjugante 1 de AE20 en pases sin Gm, B) PCR realizada para comprobar la identidad de pKT230LacZTGM2 amplificando *lacZ* la transconjugante 1 de la cepa AE15: **Carril 1** MPM, **Carriles 2,3 y 4** inespecificidades, **Carril 5** control positivo (pUMATcLacZ), **Carril 6** AE15 crecida con Gm, **Carril 7** AE15 crecida sin antibiótico.

Conociendo que pKT230LacZTGM2 puede ser utilizado como herramienta para la manipulación y estudio genético en *A. baumannii*, es que se puede proseguir con la inserción de las regiones reguladoras seleccionadas y amplificadas con éxito. Sin embargo, debido a la falta de tiempo, este paso será abordado en futuros proyectos.

10. DISCUSIÓN

Acinetobacter baumannii ha emergido como una de las causas predominantes de IAAS en todo el mundo, siendo un problema principalmente en las UCI, provocando brotes de largo plazo. Adicionalmente, las infecciones que causa son de difícil tratamiento debido a que posee resistencia a múltiples antibióticos, tanto intrínseca como adquirida (El-Shazly *et al.*, 2015; Strateva *et al.*, 2023).

Se considera que la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* está principalmente mediada por enzimas del tipo OXA (El-Shazly *et al.*, 2015), que son predominantemente acarreadas en plásmidos, pero también se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023).

Actualmente, *bla*_{OXA-72} es el gen que codifica para una carbapenemasa en *A. baumannii* más frecuentemente reportado en hospitales mexicanos (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014; Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Fernández-Vázquez *et al.*, 2023). Con los primeros reportes de la asociación de *bla*_{OXA-72} con la IS*Aba-48* en cepas mexicanas, se decidió estudiar el impacto que esta asociación tendría en la expresión de la carbapenemasa y por consiguiente en los índices de resistencia a carbapenémicos. Para hacer esto, se inició con un análisis *in silico* de este entorno genético. De acuerdo con los estudios realizados por Fernández-Vázquez *et al.* y Jiménez-Villalpando, los plásmidos que portan la asociación IS*Aba-48-bla*_{OXA-72} tienen un tamaño desde el más pequeño con 5,464 bp hasta el más grande con 10,062 bp. Siendo más específicos, los plásmidos de las cepas AN71 y AE38, usadas en este estudio, poseen un tamaño de 9,990 pb y 10,017 pb, respectivamente (Fernández-Vázquez *et al.*, 2023; Jiménez-Villalpando, 2022).

Por esta diferencia de tamaños, se inició el análisis de las regiones intergénicas entre la asociación IS*Aba-48-bla*_{OXA-72} y sin la asociación para determinar si eran diferentes entre algunos de los plásmidos reportados, pues es sabido que la regulación de la transcripción es generalmente mediada a través de la unión secuencia-específica de factores de transcripción y a su vez de los sitios de unión

de estos factores que se encuentran principalmente en la región intergénica río arriba de los genes (Molina & Nimwegen, 2008).

Aquí hay que recalcar que el tamaño de una secuencia intergénica depende de la dirección en que se transcriben los genes que la componen. Existen 3 tipos de secuencias intergénicas (Figura 15), la primera se forma a partir de 2 genes que se transcriben de forma unidireccional, por lo que dicha región contendrá sitios de terminación del gen que se transcribe río arriba y la región promotora (así como regulatoria) del gen río abajo. El segundo tipo se forma de genes que se transcriben de manera convergente, en esta región solo se incluirían los terminadores de ambos genes. Y el tercer tipo, se forma con genes que se transcriben de forma divergente, por lo que en esta región se incluirían los promotores y otras secuencias regulatorias de ambos genes (Rogozin *et al.*, 2002).

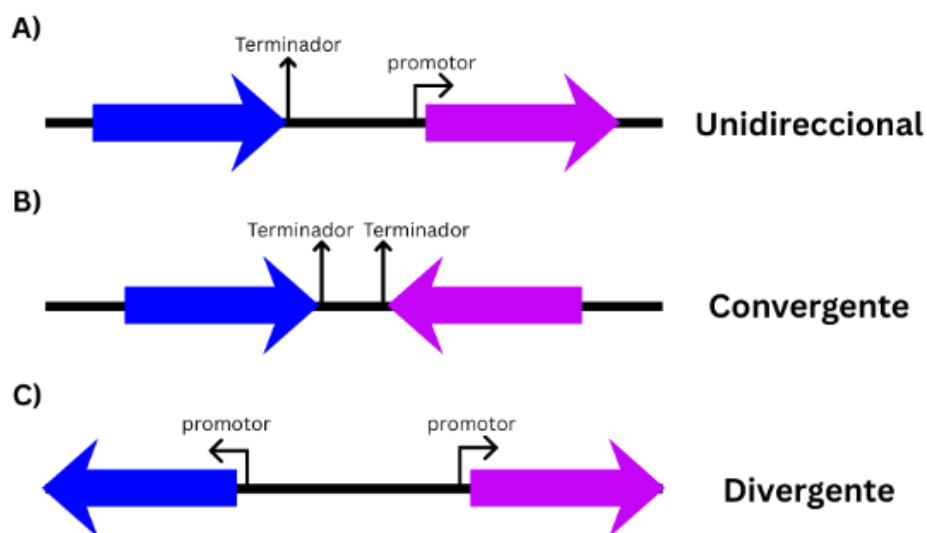


Figura 15. Tipos de regiones intergénicas. **A)** Por genes unidireccionales: los genes se transcriben en la misma dirección, en la región se encuentra el terminador del gen río arriba y la región regulatoria del gen río abajo. **B)** Por genes convergentes: los genes se transcriben hacia el mismo punto, por lo que en la región intergénica solo se encuentran los terminadores. **C)** Por genes divergentes: los genes se transcriben en direcciones opuestas, en la región intergénica se encuentran las regiones reguladoras de ambos genes, es el tipo más largo.

En nuestro análisis, las regiones intergénicas en los plásmidos que portan la asociación de interés, fue de 432 pb, mientras que en plásmidos sin esta asociación

se encontraron tamaños de 358 pb y 608 pb. Las regiones de 358 pb y 432 pb, se forman a partir de genes que se transcriben de manera unidireccional, y la de 608 pb por genes que se transcriben de manera divergente, por lo que no es de extrañar que sea más larga, ya que se ha reportado que estas regiones al ser doble-regulatorias, son de un tamaño mayor, a comparación de los otros dos tipos (Molina & Nimwegen, 2008).

En los plásmidos pA52-OXA-72 y pAbIHIT32296 encontramos río arriba de *bla_{OXA-72}* a los genes EHF38_RS19420 y HPG26_RS00020 respectivamente, ambos genes codifican para una N-acetiltransferasa de la familia GNAT. Esto es una observación importante, ya que, aunque no se conoce cuál es la función específica de estos genes, existe la posibilidad de que sean N-acetiltransferasas utilizadas para resistencia a antibióticos como aminoglucósidos, o que incluso tengan una función como anti-toxina. Se ha reportado que algunas transferasas de esta familia tienen la capacidad de inhibir toxinas como la tabtoxina, que inhibe a la glutamina sintetasa y que conlleva a la muerte celular bacteriana (Rachel M Burckhardt, 2020). En caso que la función de estas proteínas sea como antitoxina, podría tratarse de un módulo toxina-antitoxina en estos plásmidos, lo que posiblemente contribuya al mantenimiento de estos en la bacteria (Lucidi *et al.*, 2018).

Curiosamente, en el plásmido pIII_JAB108, donde se encontró una región intergénica más larga, también encontramos a *bla_{OXA-72}* en asociación río arriba con un gen que aparentemente codifica para una proteína perteneciente al sistema toxina-antitoxina tipo II de la familia RelE/ParE, que es MTT03_RS20380. La importancia de estos módulos en el mantenimiento de los plásmidos radica en que permiten su estabilización a través de la eliminación post-segregacional de células libres del plásmido (Gerdes, 2025).

En contraste con los plásmidos anteriores, pAba10042a, pAbaAN71 y pAbaAE38 no parecen contar con módulos de estabilidad por sistemas toxina-antitoxina (Jiménez-Villalpando, 2022), al menos no del tipo II. Sin embargo, existen sistemas toxina-antitoxina del tipo I y III, que a diferencia del tipo II que se basa en sistemas proteicos, estos utilizan RNAs anti-sentido para bloquear la acción de la toxina

(Gerdes, 2025). En el análisis de marcos de lectura abierto que se realizaron en la región intergénica de pAbaAN71, se encontraron cuatro posibles marcos de lectura abiertos, y aunque no hubo resultados concluyentes de que estuvieran transcribiendo péptidos pequeños, podría ser una región importante considerar para la transcripción de pequeños RNAs moduladores lo cual se tendría que corroborar en futuros estudios.

Actualmente, los pequeños RNA no codificantes (sRNA) han sido bastante estudiados como mediadores y reguladores de la expresión de genes implicados en la replicación de plásmidos, virulencia bacteriana y respuesta a estrés ambiental. Su tamaño generalmente va de unos 50 a 500 nucleótidos. Por desgracia, la validación y determinación de los mecanismos de acción de los sRNA permanece distante, principalmente por la complejidad que conlleva su regulación y a que el mayor desafío para su estudio es que sRNA que comparten la misma función no necesariamente comparte la misma estructura o que aquellos que tienen la misma estructura, no tienen la misma función en diferentes organismos (Tsai *et al.*, 2015), pero estos sRNA juegan un papel importante y podrían ser parte del sistema de regulación en estos plásmidos aparentemente sin sistemas de estabilización canónicos.

Adicionalmente, las regiones intergénicas son el objetivo de estudio para estos sRNA, y se ha observado que regiones intergénicas conservadas están mayormente enriquecidas con estos reguladores, a comparación de aquellas que no se conservan (Tsai *et al.*, 2015), lo que podría dar un indicio de la conservación de la región de aproximadamente 100 pares de bases que observamos en todas las secuencias intergénicas analizadas. Incluso, se ha evidenciado la importancia de los sRNA en cepas resistentes a carbapenémicos de *A. baumannii*, en las que se han encontrado 19 posibles sRNA que regulan este genotipo de resistencia (Wei *et al.*, 2024).

En cuanto a la regulación por promotores de *bla*_{OXA-72}, se consideraron tres posibles candidatos, el primero en la secuencia intergénica *IS**Aba-48-bla*_{OXA-72}, el segundo al final de la secuencia de *IS**Aba-48* y el tercero río arriba de *IS**Aba-48*. Estos dos

últimos promotores tan alejados del codón de inicio de *bla_{OXA-72}* se consideraron por la teoría que afirma que las *ISAb_a* estarían proporcionando un promotor fuerte que influye la transcripción de los genes río abajo (Figueiredo *et al.*, 2009; Słoczyńska *et al.*, 2021), sin embargo, no se ha descrito la posición en la que este promotor está, si dentro de la secuencia de la IS o río arriba de esta.

Los promotores (-10 TTAAAAAAT; -30 ATGACT) y (-10 GGCTATAGT; -30 TTGTGA) ubicados en la región intergénica y al final de *ISAb_a-48*, reportaron sitios de unión a reguladores como LexA y Lrp. Ambos reguladores son muy importantes para el mantenimiento celular bacteriano. El sistema de proteína regulatoria sensible a leucina (Lrp, por sus siglas en inglés), participa en los procesos de adaptación y fitness al ambiente en las bacterias, se considera como uno de los principales reguladores de la transcripción y, al menos en *E. coli*, se ha descrito que participa en la regulación de alrededor un tercio de todo su genoma (De la Cruz *et al.*, 2025). Por su parte, LexA es un bien conocido regulador que participa en el sistema SOS ante estrés celular, principalmente en respuesta al daño directo al DNA (Wang, 2024).

El promotor de la región intergénica y el ubicado río arriba de *ISAb_a-48* (-10 CATTAACCTT; -30 TTAAAA) comparten sitios de unión a ArcA, que pertenece al sistema de control respiratorio aeróbico (*arc*, por sus siglas en inglés), este es un sistema de doble componente que consta de ArcB que es un sensor-cinasa que responde a estrés redox; mientras ArcA es el regulador de respuesta (Zhou *et al.*, 2022).

En los 3 promotores encontramos reguladores de la familia *rpoD*: en esta familia los reguladores *rpoS* (σ_{38}) participan en la regulación de genes ante situaciones de estrés por factores oxidantes, falta de nutrientes o choque térmico, por citar algunas; mientras que *rpoH* (σ_{32}) es importante cuando hay exposición a altas temperaturas, y *rpoD* (σ_{70}) es el factor *housekeeping* primario que se encarga de regular la expresión de genes en condiciones normales de crecimiento celular (Park *et al.*, 2024). Con la presencia de todos estos reguladores se resalta la importancia que tomarían cada uno de ellos ante diferentes condiciones a las que se enfrenta A.

baumannii en los procesos de colonización y mantenimiento dentro del hospedero, pues se puede ver envuelta en diferentes microambientes dependiendo del ciclo de la infección, la respuesta inmune, el sitio anatómico y el tratamiento que se esté administrando.

Por otro lado, es bien sabido que la exposición bacteriana a una mayor concentración de antibióticos puede modificar el transcriptoma de la bacteria, y por consiguiente, afectará un análisis de expresión génica (Lucidi *et al.*, 2019). Se ha demostrado que el grado de expresión de los genes *bla*_{OXA} se puede ver influido por el tipo de carbapenémico utilizado y la exposición constantes a ellos, aumentando su expresión (Chang *et al.*, 2014).

En nuestro ensayo, detectamos una variación en la forma en que se expresa *bla*_{OXA-72}. Con las RT-PCR observamos que AE16, expuesta a una concentración de IMP [100 µg/ml], posiblemente expresa de manera conjunta *ISAbA-48* y *bla*_{OXA-72}, mientras que en AE19 y AE38 no. Sin embargo, es importante destacar que en nuestras cepas analizadas varía el fondo genético de todas ellas, encontrando la presencia de otras β-lactamasas en sus genomas. En la cepa AE38 además de *bla*_{OXA-72}, se encuentra *bla*_{NDM}, que codifica para una Metallo-β-lactamasa de la clase B de Ambler (Verdugo-Yocupicio, 2020). Se ha reportado la presencia en conjunto de *bla*_{NDM} con diversos genes *bla*_{OXA} además de *bla*_{OXA-72}, como *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, (Carascal *et al.*, 2024; Odih *et al.*, 2022) *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-90}, *bla*_{OXA-66} y *bla*_{OXA-70} (Abordo *et al.*, 2023). En el caso de la cepa AE19 porta *bla*_{OXA-72} junto con *bla*_{IMP} (Verdugo-Yocupicio, 2020), otra β-lactamasa clase B, que se ha reportado en conjunto con otras variantes como *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-66} y *bla*_{OXA-70} (Abordo *et al.*, 2023).

La variación en expresión de *bla*_{OXA-72} que observamos podría deberse a la concentración de carbapenémicos en la que se condujo el experimento, además de que se podría considerar en un futuro analizar al mismo tiempo si *bla*_{NDM} o *bla*_{IMP} están siendo expresadas o no bajo estas condiciones.

En otros experimentos se ha demostrado que cepas que contienen *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} o *bla*_{KPC} resultan negativas a OXA-23, posiblemente por la concentración o tiempo de exposición al antibiótico bajo los que se condujeron los ensayos (Adeyemi *et al.*, 2025). Aunque nosotros pudimos detectar que *bla*_{OXA-72} se está transcribiendo en todas las cepas, no sabemos a qué grado y si realmente está influyendo en el fenotipo de resistencia.

Curiosamente, existen varios reportes, en los que se observan discrepancias en cuanto a los resultados fenotípicos de resistencia a carbapenémicos y el repertorio genético en *A. baumannii*. En estos se pudo observar a *A. baumannii* con perfiles de susceptibilidad o bajos niveles de resistencia a carbapenémicos a pesar de contar con uno o varios genes de carbapenemasas, sugiriendo que la expresión de estos determinantes de resistencia está condicionado por la concentración y tiempo de exposición a los antibióticos y no a su sola presencia (Abordo *et al.*, 2023; Carascal *et al.*, 2024; Odih *et al.*, 2022). Incluso, en este tipo de cepas, se ha mencionado que estos genes que no se expresan o se expresan a muy bajos niveles bajo ciertas condiciones, son genes crípticos o silenciosos. Sin embargo, es difícil afirmar que realmente vemos una expresión diferente de *bla*_{OXA-72} entre nuestras cepas porque en unas se mantiene como gen críptico debido a la presencia de otros genes (*bla*_{NDM} o *bla*_{IMP}), ya que también es importante considerar que a pesar de que los experimentos se conducen asemejando lo mejor posible un ambiente “natural”, las “condiciones de laboratorio” nunca serán lo realmente cercanas a lo que una bacteria regula en el día a día (Stasiak *et al.*, 2021), y al mismo tiempo no podemos olvidar que otros mecanismos de regulación están siendo activados para mantener el fitness celular bajo estas condiciones, como puede ser la participación de proteínas universales de estrés (USP, por sus siglas en inglés) que participan en la evolución antibiótico-resistente. De estas, se ha descrito que Usp1413 juega un papel importante en la resistencia a MEM en *A. baumannii* (Zhang *et al.*, 2025).

Por todo lo anteriormente descrito, el estudio de cepas clínicas es realmente complicado, ya que se ha demostrado que el uso de antibióticos y el ambiente del hospedero resultan en una presión selectiva que dirige a *A. baumannii* a una rápida

evolución molecular *in vivo* durante la colonización (Li *et al.*, 2021). Eso y la falta de vectores disponibles para la manipulación genética de esta bacteria nos hicieron construir un vector estable que permitiera estudiar la región reguladora de *bla*_{OXA-72} en cepas clínicas de *A. baumannii*.

Hasta el momento, se han utilizado vectores como pWH1277, que fue aislado de *Acinetobacter calcoaceticus* BD413, es un plásmido críptico de la bacteria y se caracteriza por ser de estrecho rango de hospedero (Lucidi *et al.*, 2019) como base para construir modificados que fueran estables en *A. baumannii*. Un ejemplo es el vector pWH126, que se obtuvo de unir el vector pWH1277 con el plásmido pBR3226 de *E. coli*. Sin embargo, no contiene marcadores de resistencia idóneos para trabajar con cepas MDR (Lucidi *et al.*, 2018) por lo que se descartó su uso.

Los vectores pVRL1 y pVRL2 también han sido probados como vehículos de clonación en *A. baumannii*. Es pVRL1 un vector que se construyó a partir de la ligación de pWH1277 (que confiere un origen de replicación para *Acinetobacter* spp.) y el origen de replicación ColE1-like de *E. coli*. Este vector contiene el gen *aacC1* que permite una selección utilizando Gm o el gen *ble* para resistencia a Zeomicina, y ha demostrado una alta estabilidad en *A. baumannii* ATCC 17978, permaneciendo en el 65% de las células cultivadas por 24 h sin presencia de Gm como presión de selección (Jie *et al.*, 2021; Lucidi *et al.*, 2018).

Derivados del vector pVRL1 también han sido estudiados como posibles vectores de expresión en *A. baumannii*. Los vectores de la serie pLPV han reportado un alto número de copias en las cepas de *A. baumannii* ATCC 19606^T, ATCC17978, ACICU y AYE, y destacaron por su posible utilidad para analizar fusiones transcripcionales (Lucidi *et al.*, 2019).

Por otro lado, otros derivados del vector pVRL1, nombrados como pJL03 y pJL04, reportaron ser de alto número de copias, pero, a pesar de eso, también reportaron una menor eficacia en expresión proteica, incluso cuando los promotores y las condiciones de inducción eran idénticas a las probadas con vectores derivados del plásmido pDSK519, nombrados como pJL01 y pJL02. El vector pDSK519 es un

derivado del plásmido RSF1010, que pertenece al grupo de incompatibilidad IncQ, y se ha reportado que puede replicarse establemente en *A. baumannii*. Con todo esto, pDSK519 también ha reportado una alta estabilidad en esta bacteria, así como la capacidad de ser clonado por electroporación y conjugación tanto biparental como triparental (Jie *et al.*, 2021)

Con esto, Jie y colaboradores en 2021 dieron el antecedente de que los plásmidos derivados del RSF1010, con el grupo de incompatibilidad IncQ, son aceptados y estables en *A. baumannii* (Jie *et al.*, 2021). Así fue como se tomó la decisión de modificar el plásmido pKT230, que es un derivado del RSF1010, obteniendo a pKT230LacZTGM2. Este vector se clonó en las cepas clínicas de *A. baumannii* AE12, AE15 y AE20, observando que son estables incluso después de pases consecutivos cada 24h durante 72 h en presencia y ausencia de Gm como antibiótico de selección, corroborando así lo reportado por Jie *et al.*, quienes reportan que no es inesperado que vectores derivados del RSF1010 sean capaces de replicarse autónomamente en *A. baumannii* debido a su bien establecido amplio rango de hospedero, pues se ha observado que vectores del grupo IncQ han sido utilizados en patógenos todavía más restrictivos como *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* (Jie *et al.*, 2021). Una de las razones por las que el plásmido RFS1010 es de amplio rango de hospedero es que codifica maquinaria de inicio de replicación independiente del hospedero (Bishe *et al.*, 2019).

Aunque se conoce que algunas especies del género *Acinetobacter* son naturalmente competentes y pueden servir como modelos de estudio, en *A. baumannii*, los vectores disponibles para análisis genéticos son escasos (Ramirez *et al.*, 2010), otra razón para seguir en la búsqueda de vehículos que permitan el estudio de esta bacteria. En este trabajo no se comprobó la capacidad natural de competencia de *A. baumannii*, sin embargo, para clonar pKT230LacZTGM2 se intentó por electroporación, obteniendo resultados desfavorables, y conjugación biparental, consiguiendo transconjugantes; aunque también hay reportes de que la conjugación triparental es eficiente para clonar vectores en esta bacteria (Jie *et al.*, 2021).

Ya que se comprobó que pKT230LacZTGM2 es estable en cepas clínicas de *A. baumannii*, se puede continuar con los ensayos de clonación de nuestras posibles regiones reguladoras, que ya han sido purificadas y tratadas con XhoI de forma exitosa. Sin embargo, la clonación de insertos en nuestro vector, se continuará en trabajos posteriores debido a la limitación de tiempo a la que nos enfrentamos.

11. CONCLUSIONES

Se determinaron *in silico* tres posibles promotores que podrían participar en la expresión de blaOXA-72 en asociación con ISAbA-48. Adicionalmente, en la cepa AE16 crecida con IMP [100 µg/ml], blaOXA-72 se transcribe en un mRNA largo y se comprobó que el derivado del plásmido RSF1010, pKT230LacZTGM2, se mantiene en cepas clínicas de *A. baumannii*.

12. PERSPECTIVAS

- Clonar las regiones reguladoras en el vector pKT230LacZTGM2.
- Generar las fusiones transcripcionales y medir la expresión a través de la actividad β-galactosidasa en las cepas AE16, AE19 y AE38 con los vectores finales.
- Realizar ensayos de RT-PCR de los otros determinantes de resistencia bla_{NDM} en la cepa AE38 y bla_{IMP} en la cepa AE19.
- Analizar la presencia de sRNA en las regiones intergénicas ISAbA-48-blaOXA-

72.

13. ANEXOS

Anexo 1. Marcos de lectura abiertos encontrados en la secuencia intergénica IS*Aba-48-bla*_{OXA-72}.

ORF	Longitud	Coincidencia proteica en BLAST	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Organismo	Número de acceso
ORF1	93 nt 30 aa	Transportador de tipo MFS no caracterizado YfcJ (392 aa)	100%	45.16%	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> serovar 62:z4,z23:-	A9MJ53
		Serin proteasa 7 transmembranal (843 aa)	80%	37.5 %	Homo sapiens	Q7RTY8
ORF2	102 nt 33 aa	β -glucosidasa 3 (505 aa)	55%	50%	Oryza sativa Japonica Group	Q8RZL1
		β -glucosidasa no-cianogénica (493 aa)	55%	50%	<i>Trifolium repens</i>	P26204
		β -glucosidasa 1 (517 aa)	97%	37.5%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q3ECW8
		β -glucosidasa 6 putativa (379 aa)	73%	41.67%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q682B4
		β -glucosidasa 7 (502 aa)	100%	33.33%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LZJ1
		STE5 (917 aa)	58%	52.63%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	P32917
ORF3	84 nt 27 aa	Helicasa de ARN dependiente de ATP (848 aa)	74%	55%	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q09719

ORF4	126 nt 41 aa	Sin coincidencias.
------	---------------------	--------------------

A)

CGATACGGTACATAGCAATTTGTGAAAAATCAAAACATTGTTCCGATGTGAATGGTTTATATCAGAAAAA
GGTGGATAACCTCTTAGAGCTAGAAATGCATTAATTTCTCTACCATGGATCGAGCTCAAAACATGTTTTAA
AACCTAATAAAGATAAAGTCCAATTGTAAATCCCCCTTAAAGGTTAGGACTTACGCTTAACTTGCAAT
TCTTACAGAAAAGGTAGAGCTAGGATGTAGCCTACAATTATAAGATATTGTAATTAATGAATAAAGTATCA
AATGGTTAGATTTTCTGAGGACTATTGTGAGTTCTGATCGTGAGCAAAAAAATCTCACTCAACCTATT
TTGCCAATACATCAAAAGCTATCTCATGACCATCAACCGCTATTGAACTCTGATCAGATCAGCTCTG
CTGATATTTGGACAGAAAGCTCATATTATCCCGAGTAATAAAGGCTATTATTATTTGATGATAGT
TIATTGATAAAACTCTCTACCAAAATGAAATGGTTCGCGCAGTACAGCGGTAATGCAGGCAGAGTCA
TCAAGGGAATAGGTGTTTACCTGTGTGTATGTGAATCCAGAAATAGATCAATATTGGATAATTGATAAAC
GTTTTATGATATAGATACGGACAATAAGACTAAATACACATGTTAAAGATATGTTAATGACACGATTG
ATCATAAAAAGCTGGCATTACACACTATTATGGAATCGTGGTATGCGGTCAAAATGGCTGATGTTATTGA
TAGAAAGTCGAGGGATATTATTATTGCCCCGATTAAAGTAATAGAAATGTCAATAAAATAGTAATTTAG
AGATTAACATCAACGAGTTGACAGCCTGACATGGACAGATGAACAACATCAGTATGGGCATAGCGCCAT
TTACGCGGTTTTCCCAAGGTCATTCAATCAGGTTTACTTTTACCGTTCTCTACCGAAGCTACAGATTATA
TTGTGACGAATGCAACAACGACTACACTGTGATGAGATCAAAACAATCTGTGAGTTCGCTGGCGTATTG
AGCAGGTGCATCGGAGTTAAAAACAACGACAGGTATAGAACGTTGCCAGTGTGCAAGGGTCAAGTCA
ACGAAATCATATAGCTTGTGTATATTTGGTGTGCATCGTTGATCGCCTTAGCGAGAAAATGGAAACGA
CGATTTATAAGTAAAGCAAGGCTACTCAGTTCTATATGCGAGAACACTCAGAAAGCCTGATATGCGA
TGCTATTTCTGCTATATGTCATTATTTTTTACTTTTATGCGTAAGTCCTAAGGTCACATTTTTATTGTTCC
AAATCCTCTTTACAGTTTTTTTGTCTCTACTTACAATTGACTTGGGAAATATCCGATGTTTGTCCGAGG
AAATGGGGATAAAAGTGGTTATTGGAGCATTGAGAAATCAGGAAAAATTAATTTTTGAGTATTTTTTAA
TCGATTTTGTGGCTAAAAGTGACAAAGTTGCTTAAAAAGCATCCGACTGTTTCCAGTGGGCTTTTACCT
ATTTTTAGTCTGATCAATTCTATAAATAATAAAAATAATAACTTTTCATAATTTATTCGCATAACGCC
ATTATGTATAAATTAAGAGTTTTAACTTTTTTAATAAAGTATTATACTCTAAGCCCCAAATTTCCCTAAC
ATGAATTTGATGAAAAATTTATCTCTATATTCAGCATCTTATCTAGTTTCTCTCAGTGATGTTCA
TCTATTAAACTAAATCTGAAGATAATTTTCATATTTCTCTCAGCAACATGAAAAAGCTATTAAAAAGCTATT
TGATGAAGCTCAAAACAGGGTGTAAATTATTATAAAGAGGGTAAAAATCTTAGCAGCTATGTAATGCTCT

B)

Promoter Pos:	1707	LDF-	8.21	
-10 box at pos.	1692	TTAAAAAT	Score	32
-35 box at pos.	1672	ATGACT	Score	31
Promoter Pos:	1395	LDF-	6.35	
-10 box at pos.	1380	GGCTATAGT	Score	61
-35 box at pos.	1362	TTGTGA	Score	30
Promoter Pos:	934	LDF-	6.28	
-10 box at pos.	919	CAATAAAAT	Score	57
-35 box at pos.	900	TTAAAA	Score	37
Promoter Pos:	290	LDF-	5.05	
-10 box at pos.	275	CATTAACCT	Score	30
-35 box at pos.	254	TTTAAA	Score	41
Promoter Pos:	614	LDF-	2.31	
-10 box at pos.	598	TACCAAAAT	Score	41
-35 box at pos.	582	TTGATA	Score	58
Promoter Pos:	176	LDF-	1.69	
-10 box at pos.	161	TTGTATATT	Score	67
-35 box at pos.	140	TCAACG	Score	0

C)

For promoter at 290:				
arcA:	AATTGTAA	at position	240	Score - 16
fnr:	TGTAAATC	at position	243	Score - 9
rpoH2:	CCCTTTAA	at position	251	Score - 10
rpoD16:	TTGCAAT	at position	282	Score - 5
rpoD15:	AAGGTAGA	at position	299	Score - 7
For promoter at 1395:				
lrp:	TATTTTTT	at position	1393	Score - 11
lrp:	ATTTTTTT	at position	1394	Score - 11
lexA:	TTTTTTTA	at position	1395	Score - 16
rpoD17:	TTTTACTT	at position	1398	Score - 8
For promoter at 1707:				
lrp:	TATTTTTT	at position	1660	Score - 11
lexA:	ATAAATAA	at position	1684	Score - 14
rpoD16:	AAATAATT	at position	1686	Score - 15
argR:	AATAATTA	at position	1687	Score - 17
arcA:	TAATTAAA	at position	1689	Score - 11
fis:	AAAAATAA	at position	1695	Score - 9
phoB:	TTTTCATA	at position	1707	Score - 13

Anexo 2. Resultados de Bprom y su ubicación en la secuencia de la asociación IS*Aba-48-bla*_{OXa-72}.

A)

```

CTATCTAACTATATGAATCTTCGGTGATGTTGTATACCTAATTGCCTGAAAAATAGCCATAGAGCTATGTTG
CGATACTGGTACATAGCAATTTGTGAAAAATCAAACCTTGTTCGGATGTGAATTGGTTTATATCAGAAAAA
GGTGGATAACCTCTTAGAGCTAGAAAATGCATTAAATTTCTTACCATTGGATCGAGCTCAAACATGTTTTAA
AACCTAATAAAGATAAAGTCCAATTGTAAATCCCTTTAAAGGTTAGGACTTACGCATTAACTTGCAAAAT
TCTTACAGAAAGGTAAGAGAGGATGTAGCCTACAATATATAAGATATTGTAATTAATGAATAAAGTATCA
AATGGTTTAGATTTTTCGTAGGACTATTGTCACTTTCTGATCGTGAGCCAAAAAACTTCACTCAAACCTATT
TTGCCGAACATACCAAAAGCTATACTCATGACCAGATCAACCGCTATTTGAAGCTGATCAGATCAGCTCTG
CTGATATTTGGACAGAAAGCAAAAGCTCATATTATCCCGAGTAATAAAGGCTATTTATTATTGATGATCTG
TTATTGATAAAAACTACTCTACCAAAATTGAAATGGTTCGCCAGTACAGCGTAATGCAGGCAGAGTCA
TCAAGGGAATAGGTGTTGATTACCTGTGTATGTGAATCCAGAAATAGATCAATTTGGATAATTGATAAAC
GTTTTATGATAGATACGGACAATAAGACTAAATTACAACATGTTAAAGATATGTTAATGACACGATTG
ATCATAAAAAAGCTGGCATTTACAACACTATTAATGGATTCTGGTATGCGGTCAAATGGCTGATGTTATTGA
TAGAAAGTCGAGGGATTATTTATTATGCCCCGATTAAAGTAATAGAAATGTCAAATAAAGTAATTAG
AGATTAACATCAACGAGTTGACAGCCTGACATGGACAGATGAACAACATCAGTATGGGCATAGCGTCCAT
TTACGCGGTTTCCCAAAGGTCATTCTTACAGGTTTACTGTTTACCGTTCTCTACCGAAGCTACAGATTATA
TTTGTGAGCAATGCAACCAAGCTCACTACATGTAGATCAAAACATCTGTGCGAGTTCGCTGCGCTATTG
AGCAGGTGCATCGGGAGTTTAAACAAACGACAGGTATAGAACGTTGCCAGTGTGCAAGGGTCAAAGTCA
ACGAAATCATATAGCTGTGTTATATTGTGTGGCATCGTTGATCGCTTACGAGAAATGGAAGCA
CGATTATAAGTTAAAGCAAGGCTTACTCAGTCTTATATGCGAACAACCTCAGAAAGCTGATATTGTGA
TGCTATTTCTGGGCTATAGTGCAATTATTTTACTTTTATGCGTAAGTCTAAAGTCACTTTTGTGTC
AAATCCTCTTTTCTTTTGTTCCTACTTTACAATTTGACTTGGGAATTAATCCGATGTTGTCCGCGAGG
AAATGGGGATAAAAGTGGGTTATTGGAGCATTGAGAAATCAGGAAAAATTAAATTTTGGATTTTAA
TCGATTTTGTGTAAGGTTAGCAAAAGTTGCTTGTAGCATCCGACTGTTTCCAAGTCGGCTTTTCACCT
ATTTTGTAGTATGACTAATCTATAAATAATTAATAATACTTTTCATAATTTATTCGCATAACGCC
ATTATGTTAAATTAAAGAGTTTAAATTTTAAATAAAGATATCTAAGCCCCAAATTTCCCTAAC
ATGAATTTGTAATGAAAAAATTATACCTCTATATTACGACTTCTATTCTAGTTCTCTCAGTGCACTGTCA
TCTATTAAAACTAAATCTGAAGATAATTTTATATTCTCTCAGCAACATGAAAAAGCTATTAAAGCTATTT
-10 box at pos. 1692 TTAAAAAAT Score 32
-35 box at pos. 1672 ATGACT Score 31

```

B)

```

2. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 160
P-value: 0.002595
GAGACTAGGATGTAGCCTACAAT TATAAG

11. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 940
P-value: 0.001527
GTGACGAAATGCAACAACGACTCA TACACT

12. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 1233
P-value: 0.004365
TGGGCTATAGTGCAATTTT TACTTT

13. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 1285
P-value: 0.002449
TTTITA TTGTTCCAAATCTCTT TACAGT

15. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 1324
P-value: 0.001101
TCTACT TTACAATTGACTTGGGA AATTAT

16. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 1527
P-value: 0.004971
ATGACT AATTCCTATAAATAATTA AAAAAAT

17. ISABA-OXA
strand: +
estimated TSS: 1611
P-value: 0.009132
TTTAAC TTTTATAAATAAAGTAT TATACT

```

Anexo 3. Resultados de SAPHIRE y su ubicación en la secuencia de la asociación ISAb α -48-*bla*_{OXA-72}

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abordo, A. M. S., Carascal, M. B., Remenyi, R., Dalisay, D. S., & Saludes, J. P. (2023). *Clinically Isolated β -Lactam-Resistant Gram-Negative Bacilli in a Philippine Tertiary Care Hospital Harbor Multi-Class β -Lactamase Genes.*
- Adeyemi, F. M., Akinlade, E. A., Yusuf-omoloye, N. A., Ajigbewu, H., Dare, A. P., Wahab, A. A., & Oyedara, O. O. (2025). *Carbapenem-resistance in Acinetobacter baumannii: prevalence , antibiotic resistance profile and carbapenemase genes in clinical and hospital environmental strains.*
- Agoba, E. E., Govinden, U., Peer, A. K. C., Osei Sekyere, J., & Essack, S. Y. (2018). ISAb α 1 regulated OXA-23 carbapenem resistance in acinetobacter baumannii strains in Durban, South Africa. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1289–1295. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0172>
- Alcántar-Curiel, M. D., García-Torres, L. F., González-Chávez, M. I., Morfín-Otero, R., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., Fernández-Vázquez, J. L., Giono-Cerezo, S., Rodríguez-Noriega, E., & Santos-Preciado, J. I. (2014). Molecular Mechanisms Associated with Nosocomial Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Mexico. *Archives of Medical Research*, 45(7), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.10.006>
- Armstrong, T., Fenn, S. J., & Hardie, K. R. (2021). JMM Profile: Carbapenems: a

- broad-spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*, 70(12), 0–4. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001462>
- Bishe, B., Taton, A., Golden, J. W., & Bishe, B. (2019). *Modification of RSF1010-Based Broad-Host-Range Plasmids for Improved Conjugation and Cyanobacterial Bioprospecting*. *Modification of RSF1010-Based Broad-Host-Range Plasmids for Improved Conjugation and Cyanobacterial Bioprospecting*. 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.002>
- Bocanegra-Ibarias, P., Peña-López, C., Camacho-Ortiz, A., Llaca-Díaz, J., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Rodríguez-Flores, A. M., & Garza-González, E. (2015). Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(3), 309–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.022>
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 1–20.
- Bush, K. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 33(2), 1–37.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1–22.
- Carascal, M. B., Destura, R. V., & Rivera, W. L. (2024). Molecular genotyping reveals multiple carbapenemase genes and unique bla OXA - 51 - like (oxaAb) alleles among clinically isolated *Acinetobacter baumannii* from a Philippine tertiary hospital. *Tropical Medicine and Health*. <https://doi.org/10.1186/s41182-024-00629-w>
- Chang, K., Kuo, H., Tang, C. Y., Chang, C., Lu, C., Liu, C., Lin, H., Chen, K., & Liou, M. (2014). *Transcriptome profiling in imipenem-selected Acinetobacter baumannii*. 1–13.
- Coppens, L., & Lavigne, R. (2020). SAPPHERE: a neural network based classifier for $\sigma 70$ promoter prediction in *Pseudomonas*. In BMC Bioinformatics. *Springer Science and Business Media LLC*, 21(1). <https://doi.org/10.1177/https>
- De la Cruz, M. A., Valdez-salazar, H. A., Rodríguez-valverde, D., Mejia-ventura, S., Robles-leyva, N., Rascón-cruz, Q., León-montes, N., Soria-bustos, J., Chimal-cázares, F., Rosales-, R., Cedillo, M. L., Yañez-santos, J. A., Ibarra, J. A., Torres, J., Girón, J. A., Fox, J. G., & Ares, M. A. (2025). *genes involved in the biosynthesis of tilimycin and tilivalline*. 10(1), 1–19.
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 1–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

- Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 244(June), 114006. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006>
- El-Shazly, S., Dashti, A., Vali, L., Bolaris, M., & Ibrahim, A. S. (2015). Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.016>
- Fernández-Vázquez, J. L., Hernández-González, I. L., Castillo-Ramírez, S., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Mateo-Estrada, V. E., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Santos-Preciado, J. I., & Alcántar-Curiel, M. D. (2023). Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from different clones and regions in Mexico have a similar plasmid carrying the bla OXA-72 gene. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1278819>
- Figueiredo, S., Poirel, L., Croize, J., Recule, C., & Nordmann, P. (2009). In vivo selection of reduced susceptibility to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* related to ISAba1-mediated overexpression of the natural bla OXA-66 oxacillinase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2657–2659. <https://doi.org/10.1128/AAC.01663-08>
- Garza-Ramos, U., Rodríguez-Medina, N., Córdova-Fletes, C., Rubio-Mendoza, D., Alonso-Hernández, C. J., López-Jácome, L. E., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Rojas-Larios, F., Vázquez-Larios, M. del R., Ponce-de-Leon, A., Choy-Chang, E. V., Franco-Cendejas, R., Martínez-Guerra, B. A., Morales-de-La-Peña, C. T., Mena-Ramírez, J. P., López-Gutiérrez, E., García-Romo, R., Ballesteros-Silva, B., ... Garza-González, E. (2023). Whole genome analysis of Gram-negative bacteria using the EPISEQ CS application and other bioinformatic platforms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 33, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.02.026>
- Gerdes, K. (2025). *Mono- and multidomain defense toxins of the RelE/ParE superfamily*. 16(4), 1–20.
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12), 1–24. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*, 48(10), 6987–6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- Iovleva, A., Fowler, V. G., & Doi, Y. (2025). Treatment Approaches for Carbapenem-

- Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Drugs*, 85(1), 21–40. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02104-6>
- Jean, S. S., Harnod, D., & Hsueh, P. R. (2022). Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(March), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
- Jia, H., Sun, Q., Ruan, Z., & Xie, X. (2019). Characterization of a small plasmid carrying the carbapenem resistance gene *bla* OXA-72 from community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 880 in China. 1545–1553.
- Jie, J., Chu, X., Li, D., & Luo, Z. (2021). A set of shuttle plasmids for gene expression in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 16(2 February), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246918>
- Jiménez-Villalpando, J. A. (2022). Estudio parcial de plásmidos portadores de carbapenemasa en cepas de *acinetobacter baumannii*. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/18246>
- Li, H., Zhang, J., Wang, Z., Yin, Y., Gao, H., Wang, R., Jin, L., Wang, Q., Zhao, C., Wang, Z., & Wang, H. (2021). Evolution of *acinetobacter baumannii* in clinical bacteremia patients. *Infection and Drug Resistance*, 14(August), 3553–3562. <https://doi.org/10.2147/IDR.S320645>
- Lucidi, M., Runci, F., Rampioni, G., Frangipani, E., & Leoni, L. (2018). New Shuttle Vectors for Gene Cloning and Expression in Multidrug-resistant *Acinetobacter Species*. 1–19.
- Lucidi, M., Visaggio, D., Prencipe, E., Imperi, F., & Leoni, L. (2019). New Shuttle Vectors for Real-Time Gene Expression Analysis in Multidrug-Resistant *Acinetobacter Species*: In Vitro and In Vivo Responses to Environmental Stressors. June, 1–21.
- Ma, J., Song, X., Li, M., Yu, Z., Cheng, W., Yu, Z., Zhang, W., Zhang, Y., Shen, A., Sun, H., & Li, L. (2023). Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiological Research*, 266(August 2022), 127249. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127249>
- Marino, A., Augello, E., Stracquadanio, S., Bellanca, C. M., Cosentino, F., Spampinato, S., Cantarella, G., Bernardini, R., Stefani, S., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2024). Unveiling the Secrets of *Acinetobacter baumannii*: Resistance, Current Treatments, and Future Innovations. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13). <https://doi.org/10.3390/ijms25136814>
- Molina, N., & Nimwegen, E. Van. (2008). Universal patterns of purifying selection at noncoding positions in bacteria. 148–160. <https://doi.org/10.1101/gr.6759507.number>
- Montealegre, M. C., Maya, J. J., Correa, A., Espinal, P., Mojica, M. F., Ruiz, S. J.,

- Rosso, F., Vila, J., Quinn, J. P., & Villegas, M. V. (2012). First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3996–3998. <https://doi.org/10.1128/AAC.05628-11>
- Müller, C., Reuter, S., Wille, J., Xanthopoulou, K., Stefanik, D., Grundmann, H., Higgins, P. G., & Seifert, H. (2023). A global view on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 14(6), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mbio.02260-23>
- Noel, H. R., Petrey, J. R., & Palmer, L. D. (2022). *Mobile genetic elements in Acinetobacter antibiotic-resistance acquisition and dissemination*. 166–182. <https://doi.org/10.1111/nyas.14918>
- Núñez Quezada, T., Rodríguez, C. H., Castro Cañarte, G., Nastro, M., Balderrama Yarhui, N., Dabos, L., Acosta Mosquera, Y., Plaza Moreira, N., & Famiglietti, A. (2017). Outbreak of blaOXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Chemotherapy*, 29(5), 321–324. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1158936>
- Odihi, E. E., Sunmonu, G. T., Okeke, I. N., & Dalsgaard, A. (2022). *wastewater of a Nigerian hospital*. 11(6), 1–17.
- Pandey, D., Singhal, N., & Kumar, M. (2023). *β -LacFamPred: An online tool for prediction and classification of β -lactamase class , subclass , and family*. January, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1039687>
- Park, J. Y., Minchang, J., Lee, S., Woo, J., Lee, E., & Kim, D. (2024). *Unveiling the novel regulatory roles of RpoD- family sigma factors in Salmonella Typhimurium heat shock response through systems biology approaches*. 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011464>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. En *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 31, Número 4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>
- Rachel M Burckhardt, J. C. E.-S. (2020). *Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria*. April, 1–33.
- Ramirez, M. S., Don, M., Merkier, A. K., Bistué, A. J. S., Zorreguieta, A., Centrón, D., & Tolmasky, M. E. (2010). Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1488–1490. <https://doi.org/10.1128/JCM.01264-09>
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in

- Acinetobacter baumannii. Review of their dissemination in Latin America. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.006>
- Rogozin, I. B., Makarova, K. S., Natale, D. A., Spiridonov, A. N., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Yin, J., & Koonin, E. V. (2002). *Congruent evolution of different classes of non-coding DNA in prokaryotic genomes*. 30(19), 4264–4271.
- Rombel, I. T., Sykes, K. F., Rayner, S., & Johnston, S. A. (2002). *ORF-FINDER : a vector for high-throughput gene identification*. 282, 33–41.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Katoh, P. (2011). *Fast , scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. 539, 1–6. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Słoczyńska, A., Wand, M. E., Tyski, S., & Laudy, A. E. (2021). Analysis of BLACHDL genes and insertion sequences related to carbapenem resistance in acinetobacter baumannii clinical strains isolated in Warsaw, Poland. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22052486>
- Solovyev, V., & Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Science Publishers, 61–78.
- Stasiak, M., Maćkiw, E., Kowalska, J., & Kucharek, K. (2021). *Silent Genes : Antimicrobial Resistance and Antibiotic Production*. 70(4), 421–429.
- Strateva, T. V., Sirakov, I., Stoeva, T. J., Stratev, A., & Peykov, S. (2023). Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Isolates from Bulgarian Intensive Care Unit Patients. *Microorganisms*, 11(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040875>
- Tsai, C., Liao, R., Chou, B., Palumbo, M., & Contreras, M. (2015). *Genome-Wide Analyses in Bacteria Show Small-RNA Enrichment for Long and Conserved Intergenic Regions*. 197(1), 40–50. <https://doi.org/10.1128/JB.02359-14>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Verdugo-Yocupicio, R. R. (2020). *DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN Acinetobacter spp . DEL HOSPITAL*.

- Wang, W. (2024). *LexA*, an SOS response repressor, activates TGase synthesis in *Streptomyces mobaraensis*. May, 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1397314>
- Wei, Y., Xin, X., Zhang, J., Liao, Q., & Rong, Y. (2024). *Genome-wide sRNA and mRNA transcriptomic profiling insights into carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*. July, 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1419989>
- Yazdansetad, S., Najari, E., Ghaemi, E. A., Javid, N., Hashemi, A., & Ardebili, A. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying blaOXA genes with upstream ISAba1: First report of a novel OXA subclass from Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 95–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.011>
- Zhang, S., Wang, J., Yu, R., Liu, H., Liu, S., Luo, K., Han, B., Chen, Y., Han, S., Yang, E., Xun, M., & Han, L. (2025). Current Research in Microbial Sciences The role of universal stress protein Usp1413 in meropenem adaptive resistance and environmental stress responses in *Acinetobacter baumannii*. *Current Research in Microbial Sciences*, 8(December 2024), 100332.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100332>
- Zhou, Y., Pu, Q., Chen, J., Hao, G., Gao, R., Ali, A., Stock, A. M., Goulian, M., & Zhu, J. (2022). *Thiol-based functional mimicry of phosphorylation of the two-component system response regulator ArcA promotes pathogenesis in enteric pathogens*. 37(12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110147>. Thiol-based

15. ACTIVIDADES ACADÉMICAS RELACIONADAS CON EL PROYECTO

- Asistencia y presentación del cartel titulado “Analysis of *bla_{oxa-72}* gen regulstory región in *Acinetobacter baumannii*” en el XXXIV Congreso Nacional de Bioquímica.
- Asistencia y presentación del cartel titulado “Determinación de los posibles promotores involucrados en la expresión de *bla_{oxa-72}* en asociación con *ISAb_{a-48}* y construcción de un vector estable en *Acinetobacter baumannii*” en el XLIX Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica.

16. ACTIVIDADES DE RETRIBUCIÓN SOCIAL

- Asistencia y participación en el concurso de presentación de carteles con el trabajo titulado “Análisis de entornos genéticos de genes de resistencia a quinolonas y amonoglucósidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*” ganando el primer lugar, en el Primer Congreso NEXUS: De la Bioinformática a lo Experimental.
- Asistencia y presentación del cartel titulado “Análisis de entornos genéticos de genes de resistencia a quinolonas y amonoglucósidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*” en el XXIX Congreso Internacional de la AMEIN.
- Participación como expositora en el Verano Científico Infantil ICUAP 2024.
- Ponente en el marco del Día Internacional de la Mujer y la Niña en la Ciencia en el Consejo de Bachilleres del Estado de Puebla en el 2024.
- Participación en el 3er concurso de Infografías del ICUAP en 2024.