



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE
ANTICUERPOS ANTI-OMVS
DE *LECLERCIA ADECARBOXYLATA***

Tesis presentada para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

C. ALEJANDRA SALINAS JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS

D.C. ALEJANDRO CARABARIN LIMA

PUEBLA, PUE.

Mayo, 2025

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y facultad de Cs. Biológicas por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por poner a mi disposición los recursos necesarios.

Al Dr. Alejandro Carabarin Lima por su valiosa guía, paciencia y apoyo a lo largo de este trabajo. Su conocimiento y compromiso fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis y para mi crecimiento personal y profesional.

A mis revisoras Dra. María Cristina González Vázquez y Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia por el tiempo y valioso conocimiento que aportaron durante la revisión de este trabajo. Gracias por su compromiso académico y su disposición a acompañarme en este proceso formativo.

A mamá y papá porque son el pilar de cada logro, porque sus vidas, y personas son el ejemplo perfecto para la mía y ser su orgullo es la motivación de mi vida.

A José Manuel y Mariana, porque su amor, entereza, fuerza, inteligencia y valentía son la inspiración de mi vida.

A Ixcalli porque tu amistad ha sido el hogar que necesitaba lejos de casa.

A Ximena, por abrazar mi vulnerabilidad y acompañar mi camino.

A Araceli por escucharme siempre y ser inspiración.

A José Daniel porque tu amistad hizo más ligera la Uni y la vida.

A Ana Gabriela por ser la mano que me sostuvo toda la carrera.

A Michelle porque has estado en cada paso del proceso.

A María, Paula y Darinkha porque su amistad dentro y fuera del laboratorio fue el abrazo que hizo este proceso tan llevadero y a Sofía, Gabriela, Johana y Uri porque el chiquilab fue el mejor equipo con el que pude haber compartido el trabajo en el laboratorio, por sus consejos, enseñanzas y amistad.

A todas las amistades que estuvieron para escucharme hablar sobre el laboratorio y siempre preguntaban por la tesis, gracias por su compañía.

DEDICATORIA

A mi familia, mamá, papá, hermano, hermana, su amor es la base de todo y sus vidas la inspiración de la mía.

Índice

Índice imágenes.....	6
Índice graficas	6
Resumen	7
1. Introducción.....	8
Patogenicidad y virulencia <i>Leclercia adecarboxylata</i>	9
Infecciones por <i>Leclercia adecarboxylata</i>	9
<i>Leclercia adecarboxylata</i> en México	11
1.2 Características de OMV's	12
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivo general	16
4.1 Objetivos específicos	16
5. Materiales y métodos	17
5.1 Esquema general de trabajo.....	17
5.2 Siembra de Cepas Bacterianas	18
5.3 Producción y purificación de microvesiculas por centrifugación diferencial y filtración EPT	18
5.4 Cuantificación de proteínas presentes en las OMV's por el método de Bradford	19
5.5 Preparación de Extractos Proteicos Totales	19

5.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	20
5.7 Western Blot	20
5.8 Título de Anticuerpos	21
5.9 Isotipificación	22
6. Resultados	23
6.1 SDS-Page	23
6.2 Western – Blot	24
6.3 Título de anticuerpos	25
6.4 Isotipificación	26
7. Discusión	27
8. Conclusiones	36
9. Perspectivas	36
10. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos.....	37
11. Bibliografía	38
12. Anexos	48
12.1 Participación académica	48
12.2 Buffer corrimiento SDS - PAGE 1L	49
12.3 Buffer salino de fosfatos (PBS) 1L	49
12.4 Buffer de carga para SDS - PAGE.....	49
12.5 Buffer de transferencia (Western blot) 1L	50

Índice imágenes

SDS - Page. Extractos totales bacterianos: La. 008 (1 - 4) y La. 012 (5 - 8).	23
SDS - Page. Microvesículas de membrana externa: La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4).	23
Western – Blot Extractos proteicos totales : La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4).	24
Western – Blot Microvesículas de membrana externa: La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4).	24

Índice graficas

Grafica 1. Título e anticuerpos para extractos proteicos totales de La. 008 y La. 012	25
Grafica 2. Título de anticuerpos para microvesículas de membrana externa La. 008 y La.	25
Grafica 3. Isotipificación de proteínas para La. 008 y La. 012 con IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA.....	26
Grafica 4. Isotipificación de OMV's para La. 008 y La. 012 con IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA.....	26

Resumen

Este estudio demuestra que las vesículas de membrana externa (OMV's) de *Leclercia adecarboxylata* comparten similitudes en sus perfiles proteicos con los extractos totales bacterianos (EPT), lo que sugiere un proceso de biogénesis regulado y específico. La técnica SDS-PAGE reveló diferencias significativas entre las bandas de extractos proteicos y OMV's, y se confirmó la capacidad inmunogénica de las OMV's mediante Western Blot, identificando una molécula de aproximadamente 65 kDa, que probablemente corresponde a la proteína OmpA. Esta proteína, altamente conservada en la familia *Enterobacteriaceae*, presenta un papel clave en la virulencia y el crecimiento bacteriano, además de inducir respuestas inmunes humorales y citotóxicas.

Las OMV's se mostraron capaces de activar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, incluyendo la producción de anticuerpos específicos. Mediante ensayos de ELISA, se confirmó que las OMV's inducen respuestas robustas, destacándose las subclases de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b, lo que evidencia la activación de respuestas inmunes humorales y celulares específicas.

Además, se realizó una revisión bibliográfica acerca del papel de las OMV's de diferentes bacterias, como *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bordetella pertussis*, que han demostrado efectos protectores y propiedades inmunomoduladoras. Estos hallazgos refuerzan el potencial de las OMV's como herramientas inmunológicas versátiles para el desarrollo de vacunas o adyuvantes.

En conclusión, las OMV's de *L. adecarboxylata* generan anticuerpos específicos, provocan una respuesta inmune robusta y poseen propiedades inmunogénicas prometedoras, posicionándolas como candidatas para estrategias inmunológicas innovadoras.

1. Introducción

Leclercia adecarboxylata fue inicialmente denominada *Escherichia adecarboxylata* por Leclerc, debido a su similitud fenotípica con *Escherichia coli*. Sin embargo, Tamura y cols, en 1986, basándose en técnicas de biología molecular del ADN bacteriano, la incluyeron en el género *Escherichia*, dejándola como un sólo género y una sola especie a la que clasificaron como *Leclercia adecarboxylata*, dentro del género *Leclercia*, familia *Enterobacteriaceae*, orden *Enterobacterales* y nombrada *L. adecarboxylata* [1], [2].

Se encuentra presente a nivel mundial de forma natural en alimentos, tierra y ambientes de agua fresca, además ha sido aislada de animales y seres humanos como parte de la microbiota intestinal [1].

Las infecciones por esta bacteria son inusuales, se ha encontrado en cultivos polimicrobianos en personas inmunocompetentes, aunque tiene un papel oportunista en pacientes inmunocomprometidos, provocando bacteriemia, infección de tejidos blandos y piel, colecistitis, neumonía y peritonitis, además se han reportado brotes intrahospitalarios de sepsis provocados por nutrición parenteral total contaminada [3].

En cuanto a sus características fenotípicas, *L. adecarboxylata* es móvil, crece de manera óptima a 37°C y en condiciones de aerobiosis. Macroscópicamente, forma colonias mucosas, similares a colonias de *E. coli*. Microscópicamente, se observa como un bacilo Gramnegativo a la tinción de Gram. Es sensible a diversos grupos de antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, y también a tigeciclina y cotrimoxazol. Sin embargo, se han encontrado cepas multi-resistentes capaces de producir β -lactamasas

de espectro extendido (BLEE), así como algunas carbapenemasas de tipo NDM-1 [2] Así mismo, por medio de secuenciación de genoma completo, se han reportado cepas portadoras de plásmidos con genes de resistencia a colistin (*mcr*) [3].

Comentado [MG1]: referencia

Tiene propiedades bioquímicas similares a *E. coli*, aunque *L. adecarboxylata* se identifica por pruebas positivas de hidrólisis de ureasa, para malonato y una pigmentación amarilla y crecer en la presencia de cianuro de potasio en contraste es negativa para las pruebas de lisina y ornitina descarboxilasa [4].

Patogenicidad y virulencia *Leclercia adecarboxylata*

La vía de transmisión y los mecanismos por los cuales *L. adecarboxylata* causa infección aún no están del todo claros. Se han propuesto varias hipótesis, incluyendo la contaminación de heridas cutáneas, la translocación bacteriana a través del tracto gastrointestinal, catéteres o vías urinarias. Aunque se ha demostrado su capacidad de dañar células epiteliales en el laboratorio, se cree que, en muchos casos, requiere de otros microorganismos para establecer una infección, especialmente en individuos inmunocompetentes[5].

Infecciones por *Leclercia adecarboxylata*

La literatura científica reporta un número limitado de casos clínicos asociados a *L. adecarboxylata*. La mayoría de estos casos involucran a pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas como cáncer, leucemia, insuficiencia renal o cirrosis. Las infecciones suelen

manifestarse como bacteriemias, infecciones de heridas, colecistitis y endocarditis o complicaciones de procedimientos médicos como diálisis peritoneal. Es común encontrar a *L. adecarboxylata* en infecciones polimicrobianas, a menudo junto con otros patógenos oportunistas como *Enterococcus spp*, *Haemophilus influenzae* o *Staphylococcus aureus* [6].

Comentado [MG2]: Con que patógenos

En un estudio realizado por Tamura et al. los casos en los que se aisló *Leclercia* en cultivo puro, generalmente de sangre, incluyen pacientes con gastrosquisis y atresia intestinal, leucemia no linfocítica aguda después de un trasplante de médula ósea, cirrosis alcohólica, enfermedad renal en etapa terminal con peritonitis relacionada con el catéter (aislada solo del líquido peritoneal) y leucemia mieloide aguda [7]. La mayoría de las infecciones polimicrobianas se produjeron en pacientes inmunodeprimidos. Estas incluyeron un paciente con una vesícula biliar crónicamente inflamada de tejido mezclado con *Enterococcus spp.*, y un paciente con enfermedad de Still que desarrolló neumonía y sepsis después de una cirugía de hernia; el aislado de esputo se mezcló con *E. coli*, *K. oxytoca* y *H. influenzae*. Ocurrieron otras infecciones mixtas en un paciente con leiomiomasarcoma (de una muestra de sangre y de la punta del catéter se aisló el microorganismo mezclado con *Escherichia hermannii*), un paciente de bypass coronario (muestra de sangre, mezclado con *Enterococcus faecalis* y *E. hermannii*) y un paciente con leucemia linfoblástica aguda (muestra de sangre, mezclado con *Staphylococcus aureus*). Finalmente, tres individuos sanos tenían infecciones polimicrobianas de heridas en las extremidades inferiores [7].

***Leclercia adecarboxylata* en México**

El primer brote de *L. adecarboxylata* identificado en México ocurrió en el 2019. La Secretaría de Salud del Estado de Jalisco confirmó 69 casos de Infección en el Torrente Sanguíneo (ITS) originados a causa de la bacteria que afectaron a 15 hospitales; 13 de la Zona Metropolitana de Guadalajara y 2 en Tepatlán. De dichos casos se reportaron 2 defunciones, de las cuales sólo una fue asociada al brote de la bacteria por parte del Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica [8]. La defunción ocurrió el 22 de mayo del mismo año en el Hospital Civil Juan I. Menchaca, en un recién nacido prematuro extremo. La causa básica de la muerte fue la infección por la bacteria [8]. El total de afectados recibieron Nutrición Parenteral Total (NPT), por lo que se asoció a esta como posible causa del brote, y se confirmó mediante un estudio realizado por Garza – González y col., en tres de los 15 hospitales afectados donde se detectó la contaminación proveniente de las botellas de NPT sin abrir y la cepa de la nueva botella se identificó mediante métodos moleculares para coincidir con la cepa aislada de los pacientes [9]. Los pacientes adultos afectados por el brote sufrían previamente de padecimientos graves como apendicitis aguda con peritonitis generalizada, enfermedad de sistema digestivo no especificada, tumor maligno de páncreas y gastroenteritis por *Clostridium difficile* [9]. En tanto que los menores de un año presentaban enfermedades de base como atresia y estenosis congénita de otras partes especificadas del intestino grueso, dificultad respiratoria, síndrome de Down, cardiopatía congénita, gastrosquisis, hijo de madre toxicómana, hipoxia neonatal, invaginación intestinal, hemorragia intraventricular, anemia del prematuro, sepsis temprana, miocarditis, persistencia conducto arterioso y sepsis abdominal [9]. Es decir, que en todos los casos *L. adecarboxylata* se presentó como

un organismo oportunista.

Como ya se ha mencionado, el brote se convirtió en un problema grave debido a que no se conocía el comportamiento epidemiológico que pudiera tener esta bacteria ni otras características específicas, solamente algunos casos aislados que se habían reportado en la literatura; después de 57 años de ser descrita por primera vez [8].

Este brote destaca la importancia de la investigación básica y clínica para comprender mejor la epidemiología, la patogénesis y la resistencia a los antimicrobianos de *L. adecarboxylata*. Asimismo, subraya la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de prevención y control de infecciones nosocomiales causadas por este y otros microorganismos emergentes.

1.2 Características de OMV's

Las microvesículas de membrana externa (OMV's) son proteoliposomas de tamaño nanométrico que se desprenden de la envoltura celular de todas las especies de bacterias Gram negativas estudiadas hasta la fecha y en las últimas décadas se ha descubierto que algunas bacterias Grampositivas también liberan estructuras similares, aunque por mecanismos distintos [10]. Originalmente consideradas un artefacto de la renovación o lisis de la pared celular, su liberación de la célula bacteriana ahora se reconoce como un sistema de secreción generalizado que contribuye a mejorar la aptitud y facilita las interacciones entre células en el contexto de comunidades bacterianas mixtas y durante las interacciones hospedero - microorganismo [11][12].

Las OMV's tienen típicamente un diámetro de 20 a 200 nm y se liberan durante todas las fases de crecimiento y en todas las condiciones

ambientales estudiadas hasta la fecha [11]. Las OMV's son capaces de entregar una gama químicamente diversa de proteínas (factores de virulencia, enzimas, adhesinas), lípidos (LPS, fosfolípidos), ácidos nucleicos (ARNm, ADN, ARN no codificante), moléculas de señalización (quorum sensing) peptidoglicano y polisacáridos a largas distancias mientras protegen el contenido vesicular del ambiente externo [11]. La carga puede estar contenida como un soluto dentro del lumen de la vesícula, o puede incorporarse o asociarse con la bicapa de membrana [13][14] .

Debido a su versatilidad como vehículo de administración, las contribuciones de las OMV's a la aptitud bacteriana son igualmente variadas, pero de creciente interés es su papel en la colonización del hospedero y la patogénesis de la enfermedad [15]. La secreción de OMV's generalmente se considera una respuesta adaptativa al estrés, y la infección a menudo ocurre dentro de un entorno estresante [16]. En algunos casos, el aumento de la producción de OMV's en condiciones estresantes se correlaciona con una mayor supervivencia, como en presencia de péptidos antimicrobianos, y la vesiculación aumentó la resistencia a la infección por bacteriófagos [17]. Las especies patógenas de bacterias generalmente liberan más OMV's que sus contrapartes no patógenas, y es probable que la secreción de OMV's haya sido adaptada por los patógenos para mejorar su virulencia [18]. Las OMV's de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un paciente con fibrosis quística mostraron una asociación 3 a 4 veces mayor con las células pulmonares que las OMV's de una cepa adaptada al laboratorio, PAO1, a través de la interacción entre la aminopeptidasa de *Pseudomonas* asociada a vesículas (PaAp) y las células pulmonares, lo que sugiere un papel importante para el cargo de OMV's en un entorno de infección [19].

Las OMV's tienen funciones defensivas durante la infección, secuestrando antibióticos y anticuerpos, además de actuar como antígenos señuelo para desviar la atención del sistema inmunológico de la célula bacteriana [20].

La potencia de las OMV's como armas ofensivas se demuestra por su capacidad para inducir sepsis fatal incluso en ausencia de células bacterianas intactas [21].

Las OMV's también pueden administrar una selección de factores de virulencia, incluidas toxinas, adhesinas y moléculas inmunomoduladoras directamente a las células hospederas durante la infección [22]. Si bien muchos de estos factores de virulencia ya se han verificado como cargo de OMV's, y algunos incluso se secretan preferentemente a través de esta vía, como la citolisina ClyA en *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), la enterotoxina termolábil (LT) en *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) y la toxina vacuolante VacA en *Helicobacter pylori*, ha resultado difícil identificar los procesos que permiten la entrega del cargo asociado a OMV's a las células hospederas [23], [24].

Además, se ha informado que las OMV's inducen la presentación de antígenos para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno mediante la entrega de antígenos y adyuvantes de PAMP a células presentadoras de antígeno (APC) [25]. Los macrófagos son una de las APC importantes en el sistema inmunológico innato y realizan funciones clave que incluyen la fagocitosis, la migración, el inicio de respuestas inflamatorias, la producción de citocinas y la presentación de antígenos a las células T [26]. Estas células expresan una variedad de receptores inmunes innatos, incluidos los receptores "scavengers", la lectina de unión a manosa (MBL), los receptores Fcγ, los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo lectina tipo C (CLR), que se distribuyen por toda la

membrana celular, el citoplasma y la cámara de la membrana interna [27]. Durante una infección bacteriana, los macrófagos reconocen los PAMP a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) vesiculares o citoplasmáticos expuestos a la superficie. Luego, fagocitan a los patógenos invasores y liberan mediadores inflamatorios para facilitar las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas [28].

2. Justificación

Leclercia adecarboxylata ha emergido como un patógeno oportunista de creciente importancia clínica. Este proyecto se centra en explorar el potencial de las vesículas de membrana externa (OMV's) de esta bacteria como plataforma para el desarrollo de una vacuna. A través de un modelo murino, se buscó determinar la naturaleza de la respuesta inmune inducida por las OMV's, identificando las proteínas inmunogénicas clave y evaluando la generación de anticuerpos protectores. Los resultados de este estudio no solo ampliarán nuestro conocimiento sobre la interacción hospedero-patógeno, sino que también proporcionarán una base sólida para el diseño de vacunas más eficientes contra las infecciones por *L. adecarboxylata*. La relevancia clínica de este proyecto radica en la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para prevenir y controlar las infecciones causadas por este patógeno, especialmente en poblaciones vulnerables.

3. Hipótesis

La inmunización con vesículas de membrana externa (OMV's) de *Leclercia adecarboxylata* es capaz de inducir una respuesta inmune en un modelo murino, caracterizada por la producción de anticuerpos específicos contra antígenos de superficie presentes en las OMV's.

4. Objetivo general

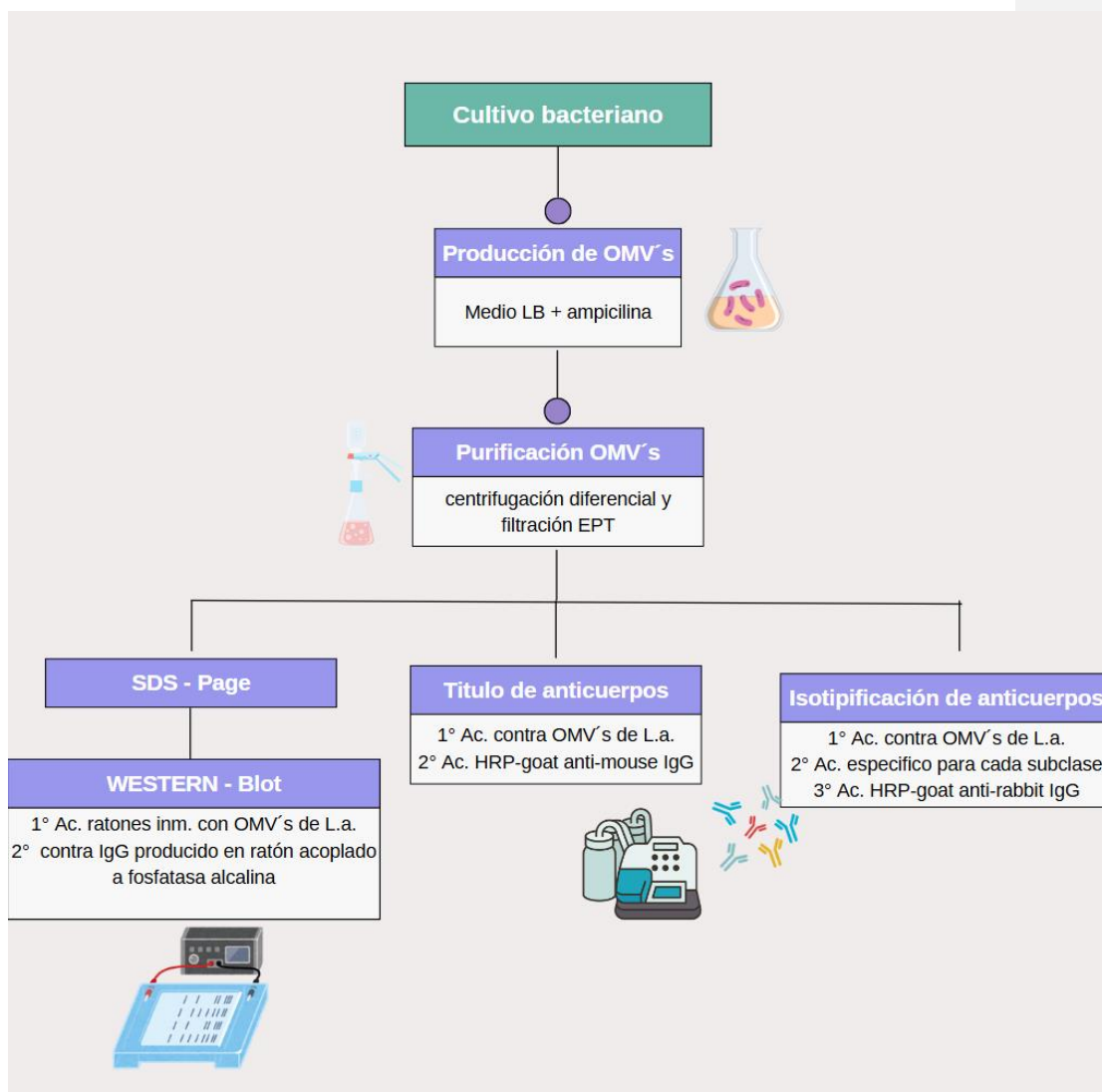
- Caracterizar la respuesta inmune inducida por la inmunización con OMV's de *Leclercia adecarboxylata*, en un modelo murino.

4.1 Objetivos específicos

- Expresar y purificar OMV's de *L. adecarboxylata*.
- Identificar proteínas inmunogénicas asociadas a OMV's mediante SDS-Page y Western Blot.
- Cuantificar la cantidad de anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización con OMV's de *L. adecarboxylata*.
- Caracterizar las diferentes isoclasas de anticuerpos producidos en la respuesta inmune.

5. Materiales y métodos

5.1 Esquema general de trabajo



5.2 Siembra de Cepas Bacterianas

Se llevaron a cabo siembras de las cepas de *L. adecarboxylata* L008 y L012, facilitadas por la Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia del CICM-ICUAP, en placas de agar sólido con medio Luria-Bertani (LB). Las placas fueron incubadas durante 24 hrs a 37 °C. Posteriormente, se realizó una siembra en 40 ml de medio líquido LB y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras este período, se realizaron múltiples centrifugaciones para obtener dos pellets, los cuales se utilizaron para la obtención de extractos proteicos totales.

5.3 Producción y purificación de microvesículas por centrifugación diferencial y filtración EPT

Inicialmente, se inocularon 2 tubos de ensayo con 5 ml de caldo LB conteniendo el cultivo previo de las cepas L008 y L012 y ampicilina a una concentración de 25 µg/mL, para promover la producción de OMV's, se incubaron durante 24 hrs a 37 °C, posteriormente se adicionaron 5 ml del cultivo a un matraz con 100 ml de medio de cultivo LB y ampicilina (25 µg/mL), se incubó a 37 °C durante 48 hrs.

Para llevar a cabo la purificación se realizó una centrifugación de 30 min a 6000 rpm a 4 °C, se recuperó el sobrenadante para posteriormente filtrar a través de una membrana de PVDF de 0.45 y 0.2 micrómetros (Durapore), se adicionó un volumen de acetona fría (JT Baker), se mantuvo a 4 °C durante 24 horas, posteriormente se centrifugó durante 30 min a 6000 rpm para obtener la microvesículas, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de

PBS (0.24 g H_2PO_4 , 0.2 g KCl, 8 g NaCl y 1.44 g NaHPO_4) estéril, se pasó el volumen a tubo eppendorf para centrifugar a 5000 rpm durante 5 min, se descartó sobrenadante y se resuspendieron las OMV's purificadas en 200 microlitros de PBS para conservar.

Finalmente se realizó una prueba de esterilidad sembrando por estría cruzada en placas de Agar LB que se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

5.4 Cuantificación de proteínas presentes en las OMV's por el método de Bradford

Se generó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) utilizando concentraciones de 1, 2, 5, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, empleando el método de Bradford. Estas concentraciones se aplicaron en una microplaca para ELISA, y aparte se cargaron 5 μl de OMV's purificadas, a continuación, se añadieron 50 μl del reactivo de Bradford (SIGMA) y se incubó la mezcla durante cinco minutos a temperatura ambiente se realizó la lectura de las densidades ópticas en un microlector de placas para ELISA Accuris SmartReaderTM 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

5.5 Preparación de Extractos Proteicos Totales

Para la lisis celular y obtención de los extractos proteicos, se adicionaron 500 μl de buffer RIPA (3 mL de cloruro de sodio 5 M, 5 mL de Tris-HCl (1 M, pH 8,0), 1 mL de nonidet P-40, 5 mL de desoxicolato de sodio 10 %, 1 mL de SDS 10 %) al pellet bacteriano. Las muestras

fueron calentadas a 100 °C durante 15 minutos, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 µl de inhibidores de proteasas. Se realizaron dos tratamientos: una muestra se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 130 µl de PBS; la otra muestra se mantuvo en buffer RIPA para su posterior uso en electroforesis.

5.6 Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras de extractos proteicos totales se mantuvieron en buffer RIPA con inhibidores y se les añadió buffer de carga (Tris-HCl a pH 6.8, SDS 10%, Glicerol, Beta-Mercaptoetanol, Agua tridestilada y azul de bromofenol), por otro lado, para la preparación de las OMV's se tomaron 40 microlitros de muestra, se añadieron 40 microlitros de buffer de carga y se llevaron a 100 °C durante 15 minutos. Se cargaron 20 µl de cada muestra en dos geles SDS-PAGE al 10% y se realizó la electroforesis con buffer de corrimiento tris-glicina (Tris – Base, Glicina y SDS al 10%). La migración se llevó a cabo a 70 V tanto para el gel concentrador como para el separador. Posteriormente, se tiñó un gel con azul de Coomassie durante 24 horas y se destiñó hasta obtener bandas bien definidas, el otro gel se utilizó para transferencia a membrana de nitrocelulosa.

5.7 Western Blot

Se realizó el procedimiento de SDS - PAGE, pero en lugar de teñir con coomassie el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, para

ello se colocó en el soporte y buffer de transferencia (Glicina 39 mM, Tris – Base 48 mM y SDS 0.037%) la transferencia se realizó a 70 V durante una hora, al término se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% durante una hora, se realizaron 3 lavados con PBS con Tween 20 al 0.05%, cada uno de 10 minutos en movimiento, posteriormente se agregó el primer anticuerpo anti OMV's de *L. adecarboxylata* obtenido en ratón (generados por el Dr. Carabarin) a una dilución 1:1000 y se dejó 12 hrs en interacción, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBST al 0.05% cada uno de 10 minutos en movimiento para posteriormente agregar el segundo anticuerpo un IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina hecho en cabra en una dilución 1:5000, se incubó durante una hora a 37 °C, finalmente se realizaron 3 lavados con PBST al 0.05% cada uno de 10 minutos en movimiento y la membrana fue revelada adicionando 2 ml de NBT/BCIP (Sigma-aldrich) hasta observar la reacción.

5.8 Título de Anticuerpos

El título de anticuerpos se determinó mediante ELISA. Los antígenos, Extracto Proteico Total bacteriano (EPT) u OMVs integras (No lisadas) se diluyeron para obtener una concentración de 10 µg/ml y se añadieron 30 µl por pozo. Después de incubar a 4 °C durante 12 hrs, se decantó y se bloqueó con 200 µl de BSA al 1% durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron tres lavados con buffer de lavado (PBS-T al 0.05%). Luego, se añadieron 100 µl de anticuerpos anti-OMV's de *L. adecarboxylata* a diferentes diluciones (1:500, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:30,000) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de tres lavados con PBST 0.05%, se añadió 50 µl de

HRP-goat anti-mouse IgG (dilución 1:5,000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados y se añadió 100 µl de sustrato TMB, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó a 630 nm en un lector de microplacas para ELISA Accuris SmartReaderTM 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

5.9 Isotipificación

Se llevó a cabo mediante ELISA. Los antígenos, EPT y/o OMV's , se diluyeron a una concentración de 10 µg/ml y se añadieron 30 µl por pozo. Se incubó a 4 °C durante la noche, luego se bloqueó con 100 µl de BSA al 1% durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron tres lavados con buffer de lavado. Se añadieron 100 µl de anticuerpos anti-OMV's de *L. adecarboxylata* diluidos (1:500) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras tres lavados, se añadieron 50 µl de anticuerpos específicos para subclases IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, e IgGA) en dilución 1:1,000, seguido de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados, se añadieron 50 µl de HRP-goat anti-rabbit IgG en dilución 1:3,000 y se incubó durante 30 minutos. Finalmente, se realizaron cuatro lavados y se añadió 100 µl de sustrato TMB, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó a 630 nm en un lector de microplacas para ELISA Accuris SmartReaderTM 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

6. Resultados

Se estableció un protocolo estandarizado para la obtención y caracterización de extractos proteicos totales de *Leclercia adecarboxylata*, así mismo se logró la expresión y purificación de Microvesículas de membrana externa mediante centrifugación diferencial y filtración EPT.

6.1 SDS-Page

En las imágenes se muestran las mismas bandas tanto entre los extractos totales bacterianos de la cepa *L. adecarboxylata* 008 (carriles 1-4 de la imagen 1) como entre los de la cepa *L. adecarboxylata* 012 (carriles 5-8 de la imagen 1) que oscilan entre los 75 y 25 kDa. Por lo que se puede inferir que los PM observados son coherentes para cada cepa.

Por otro lado, en el caso del análisis para las OMV's se observan pesos moleculares de entre 75 y 37 kDa para la cepa La. 008 (carriles 1 y 2 de la imagen 2) y de entre 100 y 25 kDa para la cepa La. 012 (carriles 3 y 4 de la imagen 2).

Comentado [MG3]: Entre paréntesis la imagen a la cual te haces referencia

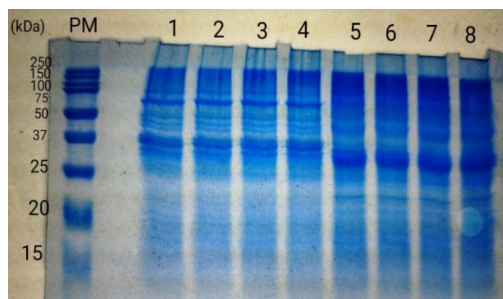


Imagen 1. SDS - Page. Extractos totales bacterianos: La. 008 (1 - 4) y La. 012 (5 - 8).

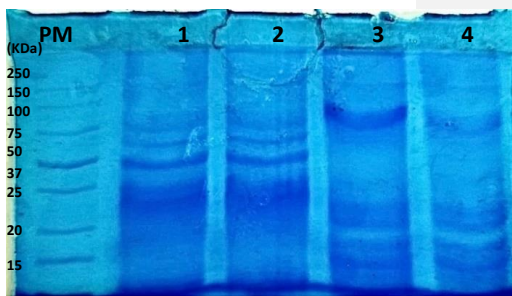


Imagen 2. SDS - Page. Microvesículas de membrana externa: La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4)

6.2 Western – Blot

El anticuerpo primario utilizado fue obtenido de ratones inmunizados previamente con OMV's de *Leclercia adecarboxylata*, el anticuerpo secundario fue contra IgG producido en ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Se observaron las mismas bandas entre cepas tanto para extractos proteicos totales como para extractos de OMV's (imagen 3 y 4).

Comentado [MG4]: Entre paréntesis la imagen a la cual te haces referencia

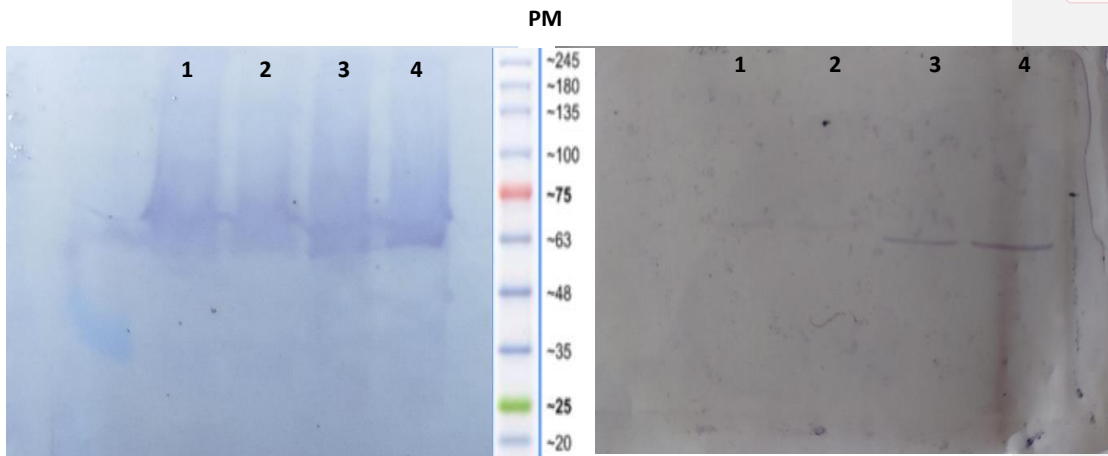


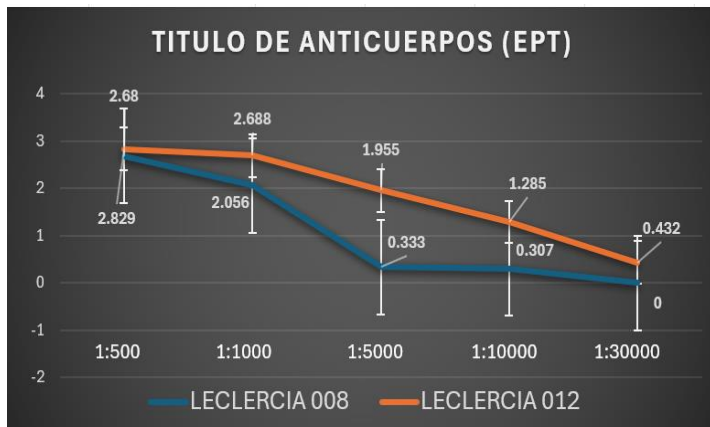
Imagen 3. Western – Blot Extractos proteicos totales : La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4).

Imagen 4. Western – Blot Microvesículas de membrana externa: La. 008 (1 y 2) y La. 012 (3 y 4).

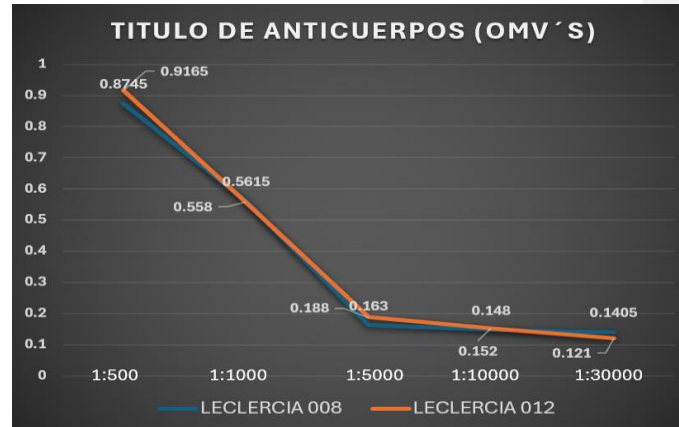
6.3 Título de anticuerpos

Se observa en la gráfica 1 el título de anticuerpos, en el cual tanto la cepa *La. 008* y *La. 012* coinciden con su punto máximo en la dilución 1:500 con 2.82 y 2.68 respectivamente, así como en un descenso gradual conforme a las diluciones y su punto mínimo en la dilución 1:30,000 con 0.43 y 0 respectivamente (gráfica 1). Mientras que para las OMV's se observó el punto máximo en la dilución 1:500 para ambas cepas y de igual forma un descenso gradual de acuerdo con las diluciones estabilizándose en puntos mínimos después de la dilución 1:5000 (gráfica 2).

Comentado [MG5]: Entre paréntesis e la grafica a la cual te haces referencia



Gráfica 1. Título e anticuerpos para extractos proteicos totales de *La. 008* y *La. 012*

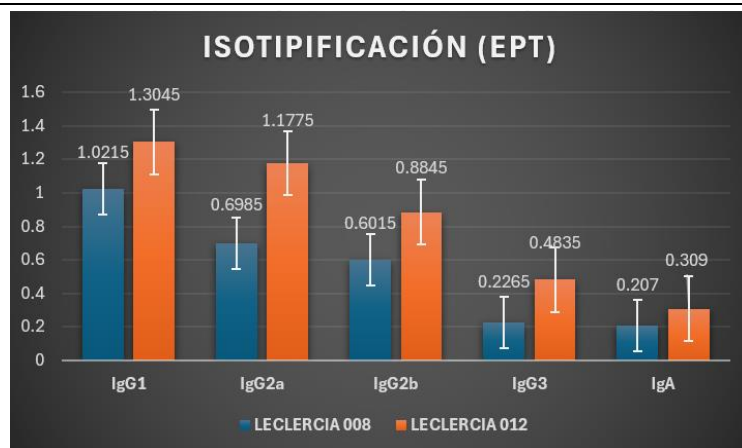


Gráfica 2. Título de anticuerpos para microvesículas de membrana externa *La. 008* y *La. 012*.

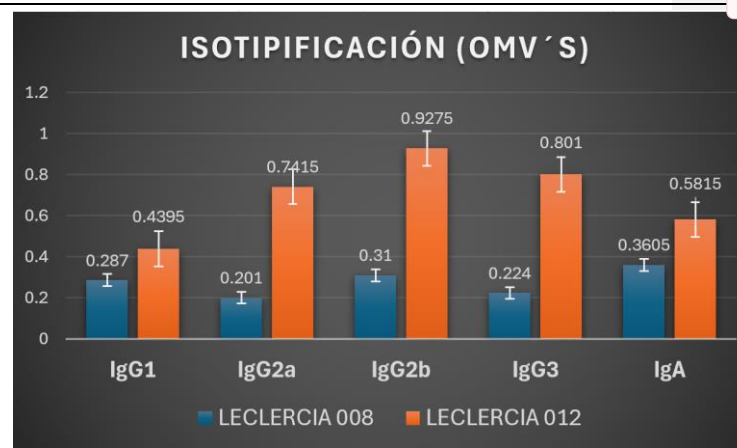
6.4 Isotipificación

Se observa en la gráfica 3 que los subtipos de anticuerpos con mayor presencia en ambas cepas son para los primeros tres isotipos, en el caso de La. 012 se observan valores superiores a 1 para los subtipos IgG1 e IgG2a y muy cercano a 1 para el subtipo IgG2b, lo que indica que hay gran presencia de este, por otro lado, para la cepa La. 008 se muestra alta presencia del subtipo IgG1, aunque también hay presencia considerable de los subtipos IgG2a e IgG2b (gráfica 3). Mientras que, al usar a las microvesículas como antígeno, se observa mayor reacción frente a las subclases IgG2b, IgG3 e IgG2a para la cepa *Leclercia* 012 (gráfica 4).

Comentado [MG6]: Entre paréntesis e la grafica a la cual te haces referencia



Grafica 3. Isotipificación de proteínas para La. 008 y La. 012 con IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA



Grafica 4. Isotipificación de OMV's para La. 008 y La. 012 con IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA

7. Discusión

A través de la técnica de SDS-PAGE fue posible comparar los perfiles proteicos tanto de OMV's de *Leclercia adecarboxylata* como de la bacteria, como se pudo observar hay gran similitud entre los extractos totales de las dos cepas utilizadas, lo que denota similitud entre ellas a nivel de expresión de proteínas, así mismo se observa similitud entre los extractos de OMV's de ambas cepas.

Sin embargo, se logran identificar diferencias entre las bandas de extractos proteicos totales y extractos de microvesículas. Lo cual es importante ya que está vinculado a un proceso regulado y no uno al azar, lo que señala que el cargo está bien definido por la bacteria.

En la investigación de proteínas bacterianas, se observó un patrón diferencial entre extractos proteicos totales y microvesículas en *Escherichia coli*. Mientras que los extractos totales mostraron una distribución uniforme de proteínas estructurales y enzimáticas, las microvesículas contenían específicamente proteínas de membrana, incluyendo una de 30 kDa relacionada con adhesión y otra de 45 kDa involucrada en la regulación génica. Esto indica un mecanismo selectivo de carga proteica para la interacción y supervivencia bacteriana [29].

A medida que se profundiza en el estudio de las OMV's, se considera cada vez más su biogénesis como un mecanismo biológico complejo, conservado y sujeto a una regulación precisa [30].

Diversos estudios han demostrado que la composición molecular de las OMV's es selectiva, enriqueciéndose en ciertas proteínas y lípidos específicos, mientras que excluye otros componentes [31]. Se ha señalado como altamente probable que OMV's liberadas por una misma cepa

Comentado [MG7]: Escribe un ejemplo de aseveración

bacteriana tengan un contenido heterogéneo a causa de los múltiples mecanismos de biogénesis, no obstante, en esta investigación se realizó la comparación entre perfiles proteicos de OMV's de diferentes cepas de *L. adecarboxylata*, así la composición consistente entre OMV's respalda la idea de un proceso de biogénesis no aleatorio, sino específico.

Tal como se ha expuesto en este trabajo, las OMV's exhiben un perfil molecular característico, enriquecido en proteínas de membrana externa y lípidos específicos. Su contenido molecular, que abarca desde proteínas y ácidos nucleicos hasta moléculas de señalización, es dinámico y se ve influenciado por las condiciones de cultivo. Esta heterogeneidad en su composición sugiere que las OMV's pueden mediar diversas funciones biológicas, incluyendo la modulación de la respuesta inmune [32] [33]. Gracias a esta composición, las microvesículas actúan como potentes activadores del sistema inmunitario, tanto innato como adquirido, al presentar moléculas que desencadenan una respuesta inmunológica. Entre estas moléculas se encuentran el lipopolisacárido (LPS) y las porinas de membrana externa, que reconocen receptores específicos en las células inmunitarias, induciendo la producción de citocinas y la activación de células efectoras [34].

Además, gracias al ensayo de Western Blot fue posible demostrar que las Microvesículas de *L. adecarboxylata* presentan propiedades inmunogénicas. Se pudo observar que esta capacidad inmunogénica es causada mayoritariamente por una proteína de alrededor de 65 kDa, presente tanto en extractos totales proteicos como en extractos de Microvesículas, tal como se esperaba debido a su estabilidad estructural, conservación evolutiva y selección durante la formación de vesículas. Su conformación terciaria estable la protege de la degradación enzimática y

permite su preservación durante la extracción [35]. Además, su tamaño sugiere una función biológicamente esencial, lo que explica su conservación en distintos contextos bacterianos. Durante la formación de OMV's, mecanismos específicos seleccionan proteínas críticas para la estructura y función de la membrana, asegurando su inclusión en estas vesículas. Desde el punto de vista inmunológico, la presencia de una o más proteínas en ambos extractos favorece una respuesta inmunitaria consistente, ya que permite su reconocimiento por diferentes vías inmunológicas y mantiene su capacidad antigénica. Su conservación como epitopo clave garantiza una respuesta inmune efectiva y específica, lo que refuerza su relevancia en la interacción hospedero - patógeno y en el diseño de estrategias inmunogénicas [35].

Aunque no hay estudios relacionados con las proteínas inmunogénicas que presenta *L. adecarboxylata*, existen diversas investigaciones en bacterias cercanas filogenéticamente, como es el caso de *K. pneumoniae*, en la que se han identificado diversas proteínas inmunogénicas como, OmpA, OmpK36, FepA, OmpK17, OmpW y proteína receptora de colicina I [36]. La proteína observada en esta investigación por medio del ensayo de Western Blot, podría ser OmpA, ya que coincide con el peso molecular reportado para esta proteína producida por *L. adecarboxylata*, que es de 63,7 kDa (UniProt entry: A0A5B7XS04). Asimismo, se ha reportado en la literatura su presencia con alta actividad inmunogénica en OMV's [37]. Asimismo, se ha identificado que la proteína A de la membrana externa (OmpA) está presente en grandes cantidades en la pared celular de las bacterias, es altamente conservada entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y presenta un papel clave tanto en la virulencia como en el crecimiento bacteriano [38] [39]. Además, se señala que OmpA desempeña un papel

importante en la capacidad de las bacterias Gramnegativas para invadir células de mamíferos. En estudios realizados con ratones, se inocularon cepas de *E. coli* deficientes en OmpA, observándose una atenuación significativa de su virulencia y capacidad invasiva, además de una reducción en su resistencia frente a la actividad bactericida del suero [40]. En cuanto a sus propiedades inmunogénicas, se ha comprobado que la OmpA de distintas especies es capaz de inducir respuestas humorales y citotóxicas específicas incluso en ausencia de adyuvantes [41]. Se ha asociado además con cepas hipervesiculantes, ya que la delección del gen que codifica la proteína OmpA ha demostrado aumentar la producción de microvesículas. No obstante, también se ha observado que las alteraciones en esta proteína conducen a una disminución de la virulencia en cepas de *Klebsiella* [42].

La capacidad de las Microvesículas para activar una respuesta inmune, es decir su capacidad inmunogénica ha sido ampliamente estudiada y claramente descrita, pues son capaces de interactuar con células inmunes innatas, por ejemplo, macrófagos y neutrófilos, así como células inmunes adaptativas y células presentadoras de antígenos, por ejemplo, células dendríticas, y por lo tanto pueden conducir a respuestas inmunes protectoras [43], [44].

Por ejemplo, existen reportes que las microvesículas con propiedades procoagulantes, obtenidas de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con la proteína M1, pueden limitar la propagación y el crecimiento bacteriano [45]. Asimismo, Oehmcke y colaboradores observaron que la formación de trombos plasmáticos está asociada a la interacción entre OMV's procoagulantes y *Streptococcus pyogenes* [46]. Por otro lado, se ha informado que las microvesículas que contienen ARN

de parásitos presentes en eritrocitos infectados por malaria pueden fusionarse con células NK, activándolas para desempeñar un papel crucial en la defensa inicial contra infecciones parasitarias [47].

El impacto de las microvesículas en la patogénesis de coagulopatías se evidenció en casos de meningococemia, fiebre hemorrágica por Ébola [48] y enfermedad de Chagas [49]. Además, las OMV's pueden influir en la función de los macrófagos, fundamentales para la eliminación de patógenos. Por ejemplo, la entrega de toxinas formadoras de poros a los macrófagos a través de OMV's puede inducir su polarización hacia un fenotipo CD14⁺MHCIIⁿⁿCD86ⁿⁿ, caracterizado por una mayor sensibilidad a ligandos bacterianos Grampositivos [50].

También se ha reportado que las microvesículas derivadas de células madre mesenquimales (MSC) poseen potencial terapéutico en modelos murinos de neumonía bacteriana [51]. Monsel *et al.* identificaron varios mecanismos que explican este efecto protector: la estimulación de la fagocitosis por monocitos para mejorar la eliminación bacteriana en los pulmones [51] la modulación de las actividades de monocitos y macrófagos alveolares para reducir el daño pulmonar inducido por citocinas y la permeabilidad de proteínas [52] y el apoyo al metabolismo de las células epiteliales alveolares tipo 2, facilitando la eliminación microbiana mediante enzimas transportadas por las microvesículas [52].

Las OMV's derivadas de *Neisseria meningitidis* y *Vibrio cholera* se han incorporado en formulaciones de vacunas autorizadas [53] [54][55].

Además, se utilizó un ensayo de ELISA (Gráficas 1 y 2) para evaluar la unión de anticuerpos presentes en suero de ratón frente a antígenos (extractos proteicos y microvesículas de membrana externa) diluidos a 10

Comentado [MG8]: Numero de grafic

µg/ml. Las muestras de suero se probaron en distintas diluciones y la detección se realizó mediante un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Los niveles de anticuerpos específicos se cuantificaron mediante la densidad óptica (DO) a 630 nm. A una dilución de 1:500, se observó el valor máximo para ambas cepas (L.a. 008 y L.a. 012) de extractos proteicos con un valor promedio de 2.75, así mismo para los extractos de OMV's con un promedio en el valor máximo de 0.9. Los extractos proteicos totales presentan valores considerables hasta la dilución 1:10000 con valor promedio de 0.796 mientras que para los extractos de OMV's la dilución 1:1000 es en la cual se presentan los valores mínimos considerables con 0.55 de promedio. En diluciones más altas (1:10,000 y 1:30,000), los valores de DO disminuyeron progresivamente, mostrando una relación inversa entre la dilución y la señal detectada.

Los extractos proteicos totales de la bacteria mostraron una respuesta de anticuerpos mayor en comparación con las OMV's en todas las diluciones probadas, esta mayor respuesta de anticuerpos observada con los extractos proteicos totales (EPT) en comparación con las vesículas de membrana externa (OMV's) puede atribuirse a múltiples factores bioquímicos e inmunológicos. Los EPT presentan una mayor cantidad de proteínas en forma libre y desestructurada, lo que facilita su reconocimiento por los anticuerpos debido a una mayor accesibilidad y concentración de epítopos. Además, la ausencia de una membrana limitante permite una exposición directa de antígenos, favoreciendo el reconocimiento mediado por los anticuerpos. Aunque los EPT demuestran reconocimiento inmune más intenso, las OMV's proporcionan una inmunidad específica y duradera al tener una presentación antigénica enriquecida de proteínas bacterianas [56] [57]. Lo que respalda el uso potencial de OMV's como candidatos para futuras estrategias inmunológicas.

Finalmente, el ensayo ELISA desarrollado para la Isotipificación permitió evaluar la respuesta inmune humoral inducida por el antígeno específico mediante la cuantificación de subclases de inmunoglobulinas en suero de ratones inmunizados con OMV's (Gráficos 3 y 4). Los resultados obtenidos reflejan diferencias tanto entre extractos totales bacterianos y OMV's como en los niveles de las distintas subclases de IgG, lo cual aporta información valiosa sobre el tipo de respuesta inmune predominante para cada uno.

Cuando se usaron los EPT como antígenos, se observan niveles de respuesta para las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b, mientras que al utilizar a las OMV's como antígenos, los niveles de respuesta identificados fueron para las subclases IgG2b, IgG3 e IgG2a. Las diferencias en el reconocimiento de los anticuerpos entre los EPT y OMV's como antígenos se debe a la presencia diferencial de antígenos, mayoría en los EPT con respecto a las OMV's, las cuales no están lisadas [58]. Además, los EPT presentan una mezcla de proteínas con conformación desnaturalizadas, facilitando el reconocimiento por epítopos lineales y facilitando la interacción de los anticuerpos IgG1 e IgG2a, las OMV's presentan antígenos en su conformación nativa y estructurada, imitando mejor la presentación natural antigénica. Por otra parte, las OMV's contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en su configuración original, lo que permite la activación de receptores específicos de partículas y genera una respuesta predominante de IgG2b e IgG3 [59].

Así mismo se observa una constante para las subclases IgG2b e IgG2a, este patrón es consistente con estudios previos que destacan la asociación de las subclases de IgG con diferentes tipos de respuesta inmune. IgG1 está asociada a respuestas humorales mediadas por Th2, dirigidas contra antígenos extracelulares, como toxinas y helmintos, y favorecidas por

citocinas como IL-4, [60] IgG2a, en cambio, está vinculada a respuestas celulares mediadas por Th1, esenciales para combatir patógenos intracelulares (virus, bacterias intracelulares), y estimuladas por IFN- γ , promoviendo la fagocitosis y la activación del complemento[60]. Por otro lado, IgG2b tiene un rol inmunomodulador, asociado a una respuesta mixta Th1/Th2 y a la regulación y resolución de la inflamación, frecuentemente generada bajo la influencia de TGF- β . Estas subclases actúan de manera complementaria para brindar protección integral frente a diversos tipos de antígenos [61].

Por ello la generación de anticuerpos de varias subclases indica que el antígeno utilizado es inmunogénico, capaz de inducir una respuesta policlonal y además estos resultados estarían indicando que el contenido del cargo microvesicular es liberado durante el procesamiento antigénico mediado por las células presentadoras de antígeno y de esta manera se generan los anticuerpos del tipo IgG1, sin embargo, se tienen que realizar más estudios para comprobar esta hipótesis.

Investigaciones previas han demostrado que la inmunización con OMV's es eficaz para prevenir infecciones bacterianas. Los estudios realizados con OMV's derivadas de *E. coli* mostraron un alto efecto protector, previniendo de manera efectiva tanto la letalidad inducida por bacterias como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, mediado por las respuestas de las células Th1 y Th17 [62], [63]. Las OMV de *Campylobacter jejuni* representan una opción para la entrega de proteínas a las células hospederas, las cuales poseen actividad citotóxica e inducen una respuesta inmune en las células epiteliales del intestino del hospedero [64]. Las vesículas de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* desencadenan una respuesta proinflamatoria notable de IL-8 en las células

epiteliales pulmonares y provocan inflamación pulmonar mediante el incremento de quimiocinas y citocinas en los pulmones y en los macrófagos alveolares de ratones, según un modelo experimental en roedores [65]. Los ratones inmunizados con OMV's derivadas de *Salmonella*, generaron respuestas sólidas de células B y T, además de estimular significativamente la producción de IFN- γ por una elevada proporción de células T CD4+ en ratones previamente infectados con estas bacterias[66]. Las OMV's derivadas de *Bordetella pertussis* ofrecieron protección contra la infección por tos ferina en un modelo murino, mostrando un efecto comparable al de las vacunas de células completas basadas en la cepa de referencia de la OMS [67]. Por otro lado, en estudios clínicos, la vacuna multicomponente Men-B (4CMenB), que incorpora tres antígenos recombinantes ampliamente conservados en la superficie y OMV's específicas, demostró brindar una protección amplia frente a cepas heterólogas circulantes de MenB. Esta formulación ha probado ser inmunogénica en adultos, adolescentes, lactantes y otros grupos de edad vulnerables [68]. Las OMV's obtenidas de *K. pneumoniae* son nanocomplejos secretores de gran relevancia que desencadenan una respuesta inflamatoria intensa [69]. Las OMV's derivadas de cepas de *E. coli*, tanto enteropatógenas (EPEC) como enterotoxigénicas (ETEC), demostraron generar una fuerte respuesta de anticuerpos específicos, además de presentar una reactividad cruzada heteróloga entre ambas [70].

Como se ha podido apreciar en este trabajo la naturaleza inmunogénica de las microvesículas las convierte en herramientas versátiles en el campo de la inmunología, con aplicaciones potenciales en el desarrollo de vacunas, como adyuvantes y terapias inmunomoduladoras.

8. Conclusiones

Se confirmó que las OMV's son capaces de generar anticuerpos específicos contra *Leclercia adecarboxylata*, además los sueros de ratones inmunizados presentaron un alto título de anticuerpos y finalmente se identificaron los subtipos de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b indicando la activación de una respuesta inmune humoral y celular específica.

9. Perspectivas

1. Secuenciar las proteínas presentes en la banda de 60-65 kD mediante técnicas como MALDI-TOF para identificarlas.
2. Ampliar el estudio sobre los antígenos presentes en las OMV's y su capacidad para inducir respuestas inmunitarias específicas, mediante técnicas como citometría de flujo, para analizar la interacción de las OMVs con células del sistema inmune.

Comentado [MG9]: Escribe con que t
tus perspectivas

10. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: células presentadoras de antígenos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: Ácido ribonucleico interferente

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BCIP/NBT: 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/Nitroazul de tetrazolio

EPT: Extractos proteicos totales

HRP: peroxidasa de rábano picante.

LPS: lipopolisacárido

OMV's: Microvesículas de membrana externa

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Phosphate buffered saline

PBS-T Tween 20: - Phosphate buffered saline

PVDF: Polyvinylidene fluoride filtration membrane

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

11. Bibliografía

- [1] C. Espinoza, M. J. Cabedo, B. González, and C. Ramírez, "Leclercia adecarboxylata," *Revista chilena de infectología*, vol. 39, no. 3, pp. 319–320, Jun. 2022, doi: 10.4067/s0716-10182022000200319.
- [2] E. González-Arenas, D. Zurisadai González-Castillo, L. Gómez-Guillermoprieto, and E. Augusto Ordóñez-Gutiérrez, "Acta Pediátrica de México Volumen 32, Núm. 5, septiembre-octubre," 2011. [Online]. Available: www.nietoeditore.com.mx
- [3] C. Espinoza, M. J. Cabedo, B. González, and C. Ramírez, "Leclercia adecarboxylata," *Revista chilena de infectología*, vol. 39, no. 3, pp. 319–320, Jun. 2022, doi: 10.4067/s0716-10182022000200319.
- [4] M. R. Spiegelhauer, P. F. Andersen, T. H. Frandsen, R. L. M. Nordestgaard, and L. P. Andersen, "Leclercia adecarboxylata : a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients," *Infect Dis*, vol. 51, no. 3, pp. 179–188, Mar. 2019, doi: 10.1080/23744235.2018.1536830.
- [5] R. Muresu, G. Maddau, G. Delogu, P. Cappuccinelli, and A. Squartini, "Bacteria colonizing root nodules of wild legumes exhibit virulence-associated properties of mammalian pathogens," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 97, no. 2, pp. 143–153, Feb. 2010, doi: 10.1007/s10482-009-9396-6.
- [6] C. Espinoza, M. J. Cabedo, B. González, and C. Ramírez, "Leclercia adecarboxylata," *Revista chilena de infectología*, vol. 39, no. 3, pp. 319–320, Jun. 2022, doi: 10.4067/s0716-10182022000200319.
- [7] S. Adapa *et al.*, "Peritonitis from *Leclercia adecarboxylata* : An emerging pathogen," *Clin Case Rep*, vol. 7, no. 4, pp. 829–831, Apr. 2019, doi: 10.1002/ccr3.2094.

- [8] P. Hernández, "El primero identificado en México," 2019.
- [9] E. Garza-González *et al.*, "Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*," *BMC Infect Dis*, vol. 21, no. 1, p. 235, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12879-021-05923-0.
- [10] A. Amano, H. Takeuchi, and N. Furuta, "Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host–parasite interactions," *Microbes Infect*, vol. 12, no. 11, pp. 791–798, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.008.
- [11] K. E. Bonnington and M. J. Kuehn, "Protein selection and export via outer membrane vesicles," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 8, pp. 1612–1619, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.011.
- [12] M. F. Haurat, W. Elhenawy, and M. F. Feldman, "Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles," *Biol Chem*, vol. 396, no. 2, pp. 95–109, Feb. 2015, doi: 10.1515/hsz-2014-0183.
- [13] K. Koeppen *et al.*, "A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles," *PLoS Pathog*, vol. 12, no. 6, p. e1005672, Jun. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005672.
- [14] S. K. Vanaja *et al.*, "Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation," *Cell*, vol. 165, no. 5, pp. 1106–1119, May 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.015.
- [15] M. J. Kuehn and N. C. Kesty, "Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction," *Genes Dev*, vol. 19, no. 22, pp. 2645–2655, Nov. 2005, doi: 10.1101/gad.1299905.

- [16] J. Klimentová and J. Stulík, "Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria," *Microbiol Res*, vol. 170, pp. 1–9, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.micres.2014.09.006.
- [17] A. J. Manning and M. J. Kuehn, "Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense," *BMC Microbiol*, vol. 11, no. 1, p. 258, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-258.
- [18] A. L. Horstman and M. J. Kuehn, "Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane Vesicles," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 17, pp. 12489–12496, Apr. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.17.12489.
- [19] S. J. Bauman and M. J. Kuehn, "*Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells," *BMC Microbiol*, vol. 9, no. 1, p. 26, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-26.
- [20] M. K. Chattopadhyay and M. V. Jaganandham, "Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria," *Front Microbiol*, vol. 6, Jul. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00758.
- [21] T. N. Ellis and M. J. Kuehn, "Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 1, pp. 81–94, Mar. 2010, doi: 10.1128/MMBR.00031-09.
- [22] K. Roy, D. J. Hamilton, G. P. Munson, and J. M. Fleckenstein, "Outer Membrane Vesicles Induce Immune Responses to Virulence Proteins and Protect against Colonization by Enterotoxigenic *Escherichia coli*," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, no. 11, pp. 1803–1808, Nov. 2011, doi: 10.1128/CVI.05217-11.
- [23] A. L. Horstman and M. J. Kuehn, "Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane

- Vesicles,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 17, pp. 12489–12496, Apr. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.17.12489.
- [24] C.-T. Wai *et al.*, “A Simple Noninvasive Index Can Predict Both Significant Fibrosis and Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C,” *Hepatology*, vol. 38, no. 2, pp. 518–526, Aug. 2003, doi: 10.1053/jhep.2003.50346.
- [25] M. Li *et al.*, “Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update,” *Journal of Controlled Release*, vol. 323, pp. 253–268, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.031.
- [26] P. Di Benedetto, P. Ruscitti, Z. Vadasz, E. Toubi, and R. Giacomelli, “Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases,” *Autoimmun Rev*, vol. 18, no. 10, p. 102369, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.autrev.2019.102369.
- [27] D. M. Mosser and J. P. Edwards, “Exploring the full spectrum of macrophage activation,” *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, Dec. 2008, doi: 10.1038/nri2448.
- [28] G. Weiss and U. E. Schaible, “Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria,” *Immunol Rev*, vol. 264, no. 1, pp. 182–203, Mar. 2015, doi: 10.1111/imr.12266.
- [29] “Gomez - Terapias innovadoras basadas en vesículas extracelulares derivadas de células madre mesen...”.
- [30] L. Liu, J. Xu, R. Du, W. Ping, J. Ge, and D. Zhao, “The response surface optimization of exopolysaccharide produced by *Saccharomyces cerevisiae* Y3 and its partial characterization,” *Prep Biochem Biotechnol*, vol. 52, no. 5, pp. 566–577, May 2022, doi: 10.1080/10826068.2021.1972428.
- [31] S. J. Bauman and M. J. Kuehn, “Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-

- 8 response,” *Microbes Infect*, vol. 8, no. 9–10, pp. 2400–2408, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.micinf.2006.05.001.
- [32] A. J. Kulp *et al.*, “Genome-Wide Assessment of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0139200, Sep. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139200.
- [33] N. Orench-Rivera and M. J. Kuehn, “Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export,” *Cell Microbiol*, vol. 18, no. 11, pp. 1525–1536, Nov. 2016, doi: 10.1111/cmi.12676.
- [34] T. N. Ellis and M. J. Kuehn, “Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 1, pp. 81–94, Mar. 2010, doi: 10.1128/MMBR.00031-09.
- [35] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispens, “IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions,” *Front Immunol*, vol. 5, Oct. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [36] P. Kurupati, B. K. Teh, G. Kumarasinghe, and C. L. Poh, “Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis,” *Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 836–844, Feb. 2006, doi: 10.1002/pmic.200500214.
- [37] A. Shahryari, I. Burtcher, Z. Nazari, and H. Lickert, “Engineering Gene Therapy: Advances and Barriers,” *Adv Ther (Weinh)*, vol. 4, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.1002/adtp.202100040.
- [38] A. Pautsch and G. E. Schulz, “Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain,” *Nat Struct Biol*, vol. 5, no. 11, pp. 1013–1017, Nov. 1998, doi: 10.1038/2983.
- [39] P. Kurupati, N. P. Ramachandran, and C. L. Poh, “Protective Efficacy of DNA Vaccines Encoding Outer Membrane Protein A and OmpK36

- of *Klebsiella pneumoniae* in Mice,” *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 82–88, Jan. 2011, doi: 10.1128/CVI.00275-10.
- [40] J. N. Weiser and E. C. Gotschlich, “Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1,” *Infect Immun*, vol. 59, no. 7, pp. 2252–2258, Jul. 1991, doi: 10.1128/iai.59.7.2252-2258.1991.
- [41] S. Godefroy *et al.*, “Outer membrane protein A (OmpA) activates human epidermal Langerhans cells,” *Eur J Cell Biol*, vol. 82, no. 4, pp. 193–200, Apr. 2003, doi: 10.1078/0171-9335-00303.
- [42] P. Kurupati, B. K. Teh, G. Kumarasinghe, and C. L. Poh, “Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis,” *Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 836–844, Feb. 2006, doi: 10.1002/pmic.200500214.
- [43] M. C. Nicolao, C. Rodriguez Rodrigues, and A. C. Cumino, “Extracellular vesicles from *Echinococcus granulosus* larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells,” *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 13, no. 1, p. e0007032, Jan. 2019, doi: 10.1371/journal.pntd.0007032.
- [44] R. Mohammadzadeh, K. Ghazvini, H. Farsiani, and S. Soleimanpour, “*Mycobacterium tuberculosis* extracellular vesicles: exploitation for vaccine technology and diagnostic methods,” *Crit Rev Microbiol*, vol. 47, no. 1, pp. 13–33, Jan. 2021, doi: 10.1080/1040841X.2020.1830749.
- [45] I. Gomez *et al.*, “Neutrophil microvesicles drive atherosclerosis by delivering miR-155 to atheroprone endothelium,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 214, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14043-y.
- [46] S. Oehmcke *et al.*, “A Novel Role for Pro-Coagulant Microvesicles in

- the Early Host Defense against *Streptococcus pyogenes*,” *PLoS Pathog*, vol. 9, no. 8, p. e1003529, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003529.
- [47] W. Ye *et al.*, “Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway,” *PLoS Pathog*, vol. 14, no. 10, p. e1007298, Oct. 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007298.
- [48] T. W. Geisbert, H. A. Young, P. B. Jahrling, K. J. Davis, E. Kagan, and L. E. Hensley, “Mechanisms Underlying Coagulation Abnormalities in Ebola Hemorrhagic Fever: Overexpression of Tissue Factor in Primate Monocytes/Macrophages Is a Key Event,” *J Infect Dis*, vol. 188, no. 11, pp. 1618–1629, Dec. 2003, doi: 10.1086/379724.
- [49] I. Cestari, E. Ansa-Addo, P. Deolindo, J. M. Inal, and M. I. Ramirez, “*Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles,” *The Journal of Immunology*, vol. 188, no. 4, pp. 1942–1952, Feb. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102053.
- [50] R. Köffel *et al.*, “Host-Derived Microvesicles Carrying Bacterial Pore-Forming Toxins Deliver Signals to Macrophages: A Novel Mechanism of Shaping Immune Responses,” *Front Immunol*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01688.
- [51] A. Monsel *et al.*, “Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 192, no. 3, pp. 324–336, Aug. 2015, doi: 10.1164/rccm.201410-1765OC.
- [52] A. Monsel *et al.*, “Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 192, no. 3, pp. 324–336, Aug. 2015, doi: 10.1164/rccm.201410-1765OC.
- [53] A. Kimura, D. Toneatto, A. Kleinschmidt, H. Wang, and P. Dull,

- "Immunogenicity and Safety of a Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine and a Quadrivalent Meningococcal CRM ¹⁹⁷ Conjugate Vaccine against Serogroups A, C, W-135, and Y in Adults Who Are at Increased Risk for Occupational Exposure to Meningococcal Isolates," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, no. 3, pp. 483–486, Mar. 2011, doi: 10.1128/CVI.00304-10.
- [54] A. L. Bishop, A. A. Tarique, B. Patimalla, S. B. Calderwood, F. Qadri, and A. Camilli, "Immunization of Mice With *Vibrio cholerae* Outer-Membrane Vesicles Protects Against Hyperinfectious Challenge and Blocks Transmission," *J Infect Dis*, vol. 205, no. 3, pp. 412–421, Feb. 2012, doi: 10.1093/infdis/jir756.
- [55] M. Sedaghat *et al.*, "Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice," *Iran J Microbiol*, Aug. 2019, doi: 10.18502/ijm.v11i3.1317.
- [56] S. Quero, N. Párraga-Niño, M. García-Núñez, and M. Sabrià, "Proteómica en enfermedades infecciosas," *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 34, no. 4, pp. 253–260, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.eimc.2014.07.015.
- [57] Estrada M., "Identificación de proteínas inmunogénicas de *Acinetobacter baumannii* con enfoque inmunoproteómico," Universidad Autónoma de Querétaro, QUERETARO, 2022.
- [58] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispen, "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions," *Front Immunol*, vol. 5, Oct. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [59] G. Pasternak, A. Lewandowicz-Uszyńska, and K. Pentoś, "Analysis of differences between total IgG and sum of the IgG subclasses in children with suspected immunodeficiency – indication of

- determinants," *BMC Immunol*, vol. 19, no. 1, p. 22, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12865-018-0259-7.
- [60] A. Suárez Reyes and C. A. Villegas Valverde, "Características y especialización de la respuesta inmunitaria en la COVID-19," *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 63, no. 4, pp. 7–18, Jul. 2020, doi: 10.22201/fm.24484865e.2020.63.4.02.
- [61] R. L. Coffman, H. F. Savelkoul, and D. A. Leberman, "Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression.," *Semin Immunol*, vol. 1, no. 1, pp. 55–63, Sep. 1989.
- [62] S. Wang, J. Gao, and Z. Wang, "Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery," *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 2, Mar. 2019, doi: 10.1002/wnan.1523.
- [63] A. Holm and E. Vikström, "Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions," *Front Plant Sci*, vol. 5, Jun. 2014, doi: 10.3389/fpls.2014.00309.
- [64] A. Elmi *et al.*, "Campylobacter jejuni Outer Membrane Vesicles Play an Important Role in Bacterial Interactions with Human Intestinal Epithelial Cells," *Infect Immun*, vol. 80, no. 12, pp. 4089–4098, Dec. 2012, doi: 10.1128/IAI.00161-12.
- [65] S. J. Bauman and M. J. Kuehn, "Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response," *Microbes Infect*, vol. 8, no. 9–10, pp. 2400–2408, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.micinf.2006.05.001.
- [66] R. C. Alaniz, B. L. Deatherage, J. C. Lara, and B. T. Cookson, "Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of *Salmonella typhimurium* That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity In Vivo," *The Journal*

- of Immunology*, vol. 179, no. 11, pp. 7692–7701, Dec. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7692.
- [67] M. L. , M. G. N. , & H. Elizagaray, “CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVS): IMPACTO DE POBLACIONES CELULARES EFECTORAS Y ENTORNO DE ACTIVACIÓN EN LA RESPUESTA PROTECTORA CONTRA PERTUSSIS,” *Investigación Joven*, pp. 187–188, 2021.
- [68] R. Roberts *et al.*, “Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis,” *Vaccine*, vol. 26, no. 36, pp. 4639–4646, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.004.
- [69] F. Martora *et al.*, “Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles,” *Microb Pathog*, vol. 136, p. 103719, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.micpath.2019.103719.
- [70] R. Thwaites, G. Chamberlain, and S. Sacre, “Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis,” *Front Immunol*, vol. 5, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00001.

12. Anexos

12.1 Participación académica



12.2 Buffer corrimiento SDS - PAGE 1L

Tris - Base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS 10%	10 mL

12.3 Buffer salino de fosfatos (PBS) 1L

KH_2PO_4	0.24g
KCl	0.2 g
NaCl	8.0 g
Na_2HPO_4	1.44 g

12.4 Buffer de carga para SDS - PAGE

Tris HCl pH 6.8	1.25 ml
SDS 10 %	2 ml
Glicerol	1 ml
Betaheptamercaptoetanol	1 ml
Agua tridestilada	4.75 ml
Azul de bromofenol	1 pizca

12.5 Buffer de transferencia (Western blot) 1L

Glicina 39 mM	2.9 g
Tris Base 48 mM	5.8 g
SDS 0.037%	0.37 g
Agua tridestilada	800 ml
Metanol	200 ml