



# **BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

## **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

### **IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS ASOCIADAS A MICROVESÍCULAS E INVOLUCRADAS EN LA PATOGENICIDAD DE *Leclercia adecarboxylata***

**Tesis para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**C. GABRIELA ELIZABETH CASTOLO ARELLANO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA**

**PUEBLA, PUE.**

**Junio 2023**



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo está dedicado principalmente a mis padres, gracias por siempre apoyar mis sueños, por su comprensión, sus sacrificios, desvelos, esfuerzo y todo el amor tan grande que me han dado, sus palabras quedan guardadas en mi corazón para toda la vida, y estoy segura de que me seguirán durante mis siguientes logros, que son suyos también.

A mi hermana Paola, gracias por estar a mi lado en cada una de nuestras etapas escolares, creciendo juntas en lo académico y lo personal. Eres una gran persona y hermana, nunca olvides lo importante que eres para mí.

A mi hermana Ángela Sofía, gracias por ser ese faro de luz que aparece en mis momentos más oscuros, tu compañía me brinda mucho amor y felicidad, siempre me ayudas a crecer como persona.

A mi tía Mago y a mi tío Eliseo, gracias por ser como unos segundos padres para mí, por preocuparse, por apoyarme de muchas formas y estar presentes en los momentos más importantes de mi vida.

A mi asesor de tesis Dr. Alejandro Carabarán, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de alumnos de laboratorio, por permitirme desarrollar este trabajo de tesis con usted, gracias por su paciencia, sus conocimientos, sus consejos y su apoyo para guiarme por este camino y motivarme a superarme como profesionalista.

A mis compañeros de laboratorio, Andy, Adri, Araxie, Aylin, Migue, Héctor, Fasa y Alan, gracias por su amistad y su apoyo en el laboratorio.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias de la Electrónica, los Salados, Kevin, Migue, Robert, Víctor, Benony, Ángel y en especial a mi amado Luis que siempre cree en mí. Gracias por estar en las buenas y en las malas y hacerme sentir como un segundo hogar, son las mejores personas que pude haber conocido y espero llevar su amistad para toda la vida.

A los mejores amigos que pude encontrar en la carrera, Omar y Noel, sin ustedes no hubiera superado una de las etapas más difíciles en mi vida, gracias por su amistad tan sincera y su apoyo tanto en los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla gracias por consolidarme de manera personal y profesional, dentro de los salones, laboratorios y espacios de la universidad me llevo buenas experiencias y recuerdos junto a muchas personas con las que tuve la suerte de coincidir y compartir.

Este trabajo es la culminación de la etapa más importante de mi vida hasta ahora y es producto de mucho esfuerzo, compromiso y dedicación, pero también de errores y aprendizajes significativos. El camino definitivamente no fue sencillo, pero disfruté cada momento investigando y experimentando al respecto, me ayudó a descubrirme a mí misma y a motivarme a continuar por el camino de la investigación.

*“El mundo necesita que sigamos nuestros sueños. No me asusto, no me canso y no me detengo... La vida es demasiado corta para tener miedo. Vivir es pelear, ¡vive tu vida, busca lo que deseas! ¿Qué más podría importar?”*

*A mis Padres:*

Elizabeth Arellano Morales y Roberto Castolo  
González

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS .....                                                            | 2  |
| ABREVIATURAS.....                                                                | 7  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                           | 8  |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS .....                                                         | 8  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                          | 8  |
| RESUMEN .....                                                                    | 10 |
| INTRODUCCIÓN .....                                                               | 11 |
| 1.1 <i>Leclercia adecarboxylata</i> .....                                        | 11 |
| 1.2 Patogénesis de <i>L. adecarboxylata</i> .....                                | 12 |
| 1.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos .....                               | 15 |
| 1.4 Microvesículas de membrana externa (OMV's) .....                             | 16 |
| 1.4.1 Biogénesis de OMV's.....                                                   | 17 |
| 1.5 Función de las OMV's en la patogenicidad de bacterias Gramnegativas ....     | 18 |
| ANTECEDENTES GENERALES .....                                                     | 19 |
| 2.1 Antecedentes directos .....                                                  | 20 |
| 2.2 Justificación .....                                                          | 21 |
| 2.3 Hipótesis .....                                                              | 21 |
| 2.4 Objetivo General .....                                                       | 21 |
| 2.5 Objetivos Específicos.....                                                   | 21 |
| METODOLOGÍA E INVESTIGACIÓN .....                                                | 23 |
| 3.1 Diseño Experimental .....                                                    | 23 |
| 3.2 Cepas de <i>L. adecarboxylata</i> .....                                      | 24 |
| 3.3 Cultivo de <i>L. adecarboxylata</i> .....                                    | 24 |
| 3.4 Tinción de <i>L. adecarboxylata</i> .....                                    | 24 |
| 3.4.1 Tinción de Gram para <i>L. adecarboxylata</i> .....                        | 24 |
| 3.4.2 Tinción de Hiss para <i>L. adecarboxylata</i> .....                        | 25 |
| 3.5 Purificación de OMV's .....                                                  | 25 |
| 3.6 Microscopia Electrónica de Trasmisión .....                                  | 26 |
| 3.7 Determinación de la concentración de OMV's de <i>L. adecarboxylata</i> ..... | 26 |

|                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|
| 3.8 Lisis de OMV's .....                                    | 27  |
| 3.9 Electroforesis de proteínas (SDS-Page) para OMV's ..... | 27  |
| 3.9 Inmunofluorescencia indirecta .....                     | 28  |
| 3.10 Ensayo de resistencia a antibióticos .....             | 30  |
| 3.10.1 Control Positivo y Negativo .....                    | 31  |
| 3.11 Análisis estadístico.....                              | 31  |
| RESULTADOS .....                                            | 31  |
| 4.1 Purificación de OMV's .....                             | 31  |
| 4.2 Identificación cualitativa de OMV's mediante TEM .....  | 33  |
| 4.4 Identificación cualitativa de OMV's.....                | 34  |
| 4.3 Visualización de Proteínas en SDS-PAGE .....            | 37  |
| 4.5 Ensayos de resistencia a antibióticos .....             | 38  |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....                               | 40  |
| CONCLUSIONES.....                                           | 44  |
| PERSPECTIVAS.....                                           | 44  |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                          | 45  |
| ANEXOS .....                                                | 533 |

## ABREVIATURAS

| Abreviatura  | Significado                                |
|--------------|--------------------------------------------|
| (-)          | Negativo                                   |
| (+)          | Positivo                                   |
| °C           | Grados Celsius                             |
| µg/µL        | Microgramo/Microlitro                      |
| µL           | Microlitro                                 |
| µm           | Micrómetro                                 |
| BSA          | Albúmina de suero bovino                   |
| DH5α         | Células DH5-alfa                           |
| DO600nm      | Densidad óptica de 600 nanómetros          |
| FITC         | Isotiocianato de fluoresceína              |
| IFI          | Inmunofluorescencia indirecta              |
| IgG          | Inmunoglobulina G                          |
| KPC          | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa |
| <i>L. a.</i> | <i>Leclercia adecarboxylata</i>            |
| LB           | Medio Luria-Bertani                        |
| mg/mL        | Miligramo/Mililitro                        |
| mL           | Mililitro                                  |
| nm           | Nanómetro                                  |
| OM           | Membrana externa                           |
| OMV's        | Microvesículas de membrana externa         |
| PBS          | Solución salina amortiguada por fosfatos   |
| PG           | Proteína G                                 |
| pH           | Potencial de hidrógeno                     |
| PVC          | Cloruro de vinilo                          |
| rpm          | Revoluciones por minuto                    |
| TEM          | Microscopía electrónica de transmisión     |

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
|-----|---------------------------------|

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Título                                                               | Página |
|-------|----------------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | Susceptibilidad de <i>L. adeecarboxylata</i> a diversos antibióticos | 14     |
| 2     | Determinación de la concentración de OMV's                           | 26     |
| 3     | Lisis de OMV's                                                       | 27     |
| 4     | Esquema SDS-PAGE para OMV's                                          | 28     |
| 5     | Esquema para ensayo de resistencia a antibióticos.                   | 30     |

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

| Gráfica | Título                                                                                 | Página |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1       | Reporte de casos de infección por <i>L. adecarboxylata</i> alrededor del mundo         | 13     |
| 2       | Ensayo de resistencia a antibióticos en cepa de <i>E. coli</i> no resistente con OMV's | 39     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Título                                             | Página |
|--------|----------------------------------------------------|--------|
| 1      | Tinción de Gram de <i>Leclercia adecarboxylata</i> | 11     |
| 2      | Composición general de las OMV's                   | 16     |
| 3      | Biogénesis de OMV's                                | 18     |
| 4      | Primera parte de Inmunofluorescencia Indirecta     | 29     |
| 5      | Segunda parte de Inmunofluorescencia Indirecta     | 30     |

|           |                                                                 |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6</b>  | Tinción de Gram de OMV's de <i>Leclercia<br/>adecarboxylata</i> | <b>32</b> |
| <b>7</b>  | Tinción de Gram de OMV's de <i>Leclercia<br/>adecarboxylata</i> | <b>32</b> |
| <b>8</b>  | TEM de <i>L.a.</i> 012                                          | <b>33</b> |
| <b>9</b>  | TEM de <i>L.a.</i> 008                                          | <b>34</b> |
| <b>10</b> | IFI de OMV's. Cepa 008                                          | <b>35</b> |
| <b>11</b> | IFI de OMV's. Cepa 012                                          | <b>35</b> |
| <b>12</b> | IFI de OMV's. Cepa 028                                          | <b>36</b> |
| <b>13</b> | IFI de OMV's. Cepa 029                                          | <b>36</b> |
| <b>14</b> | SDS-PAGE de proteínas de OMV's                                  | <b>37</b> |
| <b>15</b> | Tubo de ensayo de resistencia a ampicilina                      | <b>38</b> |

## RESUMEN

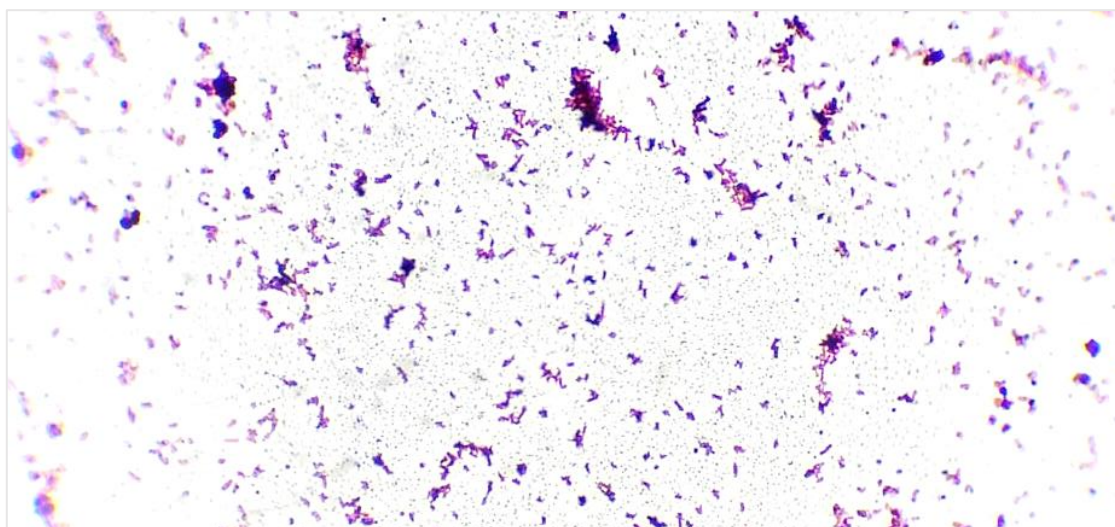
*Leclercia adecarboxylata* es una bacteria Gramnegativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Está catalogada como un microorganismo patógeno oportunista que proviene de ambientes acuáticos. Afecta a largo plazo, principalmente a pacientes inmunocomprometidos debido a su carácter infeccioso, además de ser resistente a varios antibióticos, entre ellos, la ampicilina. En estudios recientes, se ha observado la secreción de unas estructuras más pequeñas de un tamaño entre 20 y 200  $\mu\text{m}$ , productos de la biogénesis de esta bacteria, conocidas como microvesículas de membrana externa (OMV's, por sus siglas en inglés). En el laboratorio, se estudiaron cuatro muestras provenientes de diferentes pacientes, etiquetadas como L.a 008, L.a 012, L.a 028 y L.a 029. Estas muestras fueron cultivadas por separado, posteriormente se crecieron en medio de cultivo con ampicilina para generar una condición de estrés que permitiera la secreción de OMV's de cada cepa. Mediante la visualización de las OMV's con inmunofluorescencia indirecta se confirmó la presencia cualitativa de las mismas y mediante microscopia electrónica de transmisión se determinó su tamaño, a través de un ensayo de resistencia a antibióticos realizado por triplicado con una bacteria de *E. coli* susceptible a ampicilina, se determinó que las OMV's fueron capaces de conferirle a *E. coli* resistencia al antibiótico con un crecimiento exponencial el cual aumentaba en relación a el aumento en la concentración en  $\mu\text{g}$  de las OMV's. Finalmente, se determinó que los resultados obtenidos son significativos para afirmar que las OMV's secretadas por *L. adecarboxylata* son capaces de transferir la resistencia a antibióticos a bacterias no resistentes, siendo este el primer estudio donde se demuestra que la secreción de OMV's de *L. adecarboxylata* puede transfiere genes codificantes para la resistencia a antimicrobianos como la ampicilina.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Leclercia adecarboxylata*

*Leclercia adecarboxylata*, anteriormente conocida como *Escherichia adecarboxylata*, es una bacteria patógena oportunista descubierta en 1962 por H. Leclerc, un biólogo francés quien hábilmente logró diferenciarla de *E. coli* a través de la relación de ADN, a pesar de las similitudes que presentaban ambas en la producción de sus pigmentos. Años más tarde, Tamura *et al.* en 1986 lograron establecer un nuevo género *Leclercia* y una especie *adecarboxylata* gracias a la tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, diferenciándola fenotípicamente del resto de las especies *Enterobacteriaceae*. Su crecimiento se favorece a una temperatura ambiente de entre 30-37°C en condiciones aerobias. Su morfología es una estructura de bacilo gramnegativo, oxidasa negativa y en su formación de colonia su textura es mucosa con una pigmentación amarillo-blanquecina (Correa *et al.*, 2012). Es visible mediante microscopía óptica realizando tinciones Gram (**Figura 1**).

Está ampliamente distribuida por todo el mundo y ha sido aislada de diferentes fuentes, que van desde cuerpos de agua y tierra, hasta alimentos de diferentes grupos como maíz, algodón y trigo. Con menor frecuencia también se ha logrado



**Figura 1.** Tinción de Gram de *Leclercia adecarboxylata* en aumento de 40X.

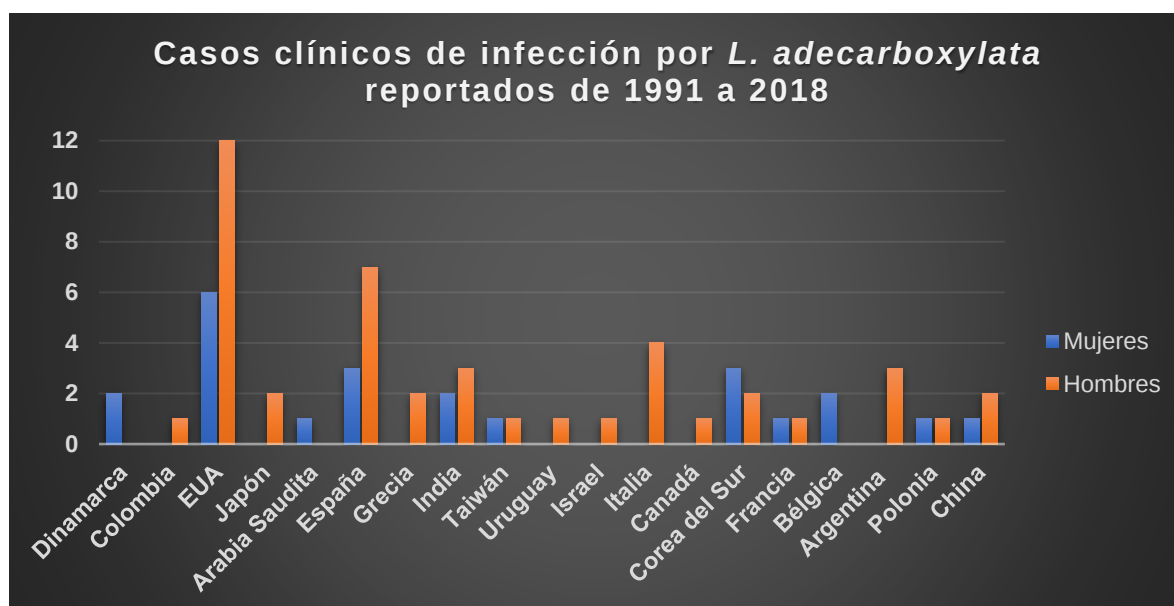
aislar de muestras de sangre, heces, esputo, orina y heridas de humanos y animales (Espinoza *et al.*, 2022)

## 1.2 Patogénesis de *L. adecarboxylata*

Alrededor del mundo se han reportado múltiples casos de personas, en grupos de edad desde niños hasta adultos mayores, que han sido afectados por esta bacteria. Sin embargo, actualmente no existe una cifra oficial por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que estime el número de personas afectadas anualmente por este microorganismo patógeno.

Se han realizado diversas publicaciones de estudios clínicos y de investigación de casos reportados en niños y adultos, en los que se han evidenciado la susceptibilidad que presenta a ciertos grupos de antibióticos. En un estudio titulado “*Leclercia adecarboxylata*: reporte de un caso y revisión de la literatura de 74 casos que demuestran su patogenicidad en pacientes inmunocomprometidos” se reportaron casos de 74 pacientes inmunocomprometidos, cuyos factores de riesgo por enfermedades como hipertensión, diabetes mellitus, neumonía, VIH, leucemia, gatroquiasis, cirrosis hepática, cáncer de diferentes tipos, así como otros tratamientos que mantienen el sistema inmune de los pacientes inmunosuprimidos, tales como diálisis, hemodiálisis, quimioterapias, trasplantes de órganos, transfusiones sanguíneas, entre otras, propiciaron la infección por *L. adecarboxylata*. Estos casos clínicos fueron reportados de 1991 a 2018 en 19 países y afectando a un total de 51 hombres y 23 mujeres de diferentes grupos de edad (**Gráfico 1**). La infección causada por este patógeno se manifestó en diferentes partes del cuerpo de estos pacientes y se logró aislar a la bacteria en muestras sanguíneas, de orina, líquido peritoneal, líquido sinovial y heridas. Los pacientes lograron recuperarse a través de tratamientos con diferentes grupos de antibióticos; el 97% de los casos reportados lograron su recuperación exitosamente, mientras que el 3% de estos resultaron en los decesos de los mismos. No obstante, debido a la similitud que *L. adecarboxylata* comparte con el género *Escherichia*, aunado a la falta de recursos para realizar una adecuada identificación de su

morfología y propiedades metabólicas, se cree que existen muchos casos pasados por alto ocasionados por este organismo patógeno (Spiegelhauer *et al.*, 2018).



**Gráfico 1.** Reporte de casos clínicos de infección por *L. adecarboxylata* en 19 países de 1991 a 2018 (Spiegelhauer *et al.*, 2018)

De manera particular, en 2021 se reportó el caso de una mujer de 74 años con bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata*, que falleció a causa de la patogenia de la misma a pesar de ser tratada con antibióticos de alto espectro. Este es el único caso conocido de un paciente no inmunocomprometido que desarrolló la infección sin un factor de riesgo previo (Shaikhain *et al.*, 2021).

Hasta la fecha, el mecanismo de patogenicidad de *L. adecarboxylata* aún no ha sido descrito. Sin embargo, algunos autores consideran la traslocación bacteriana a través de barreras mucosas del tracto gastrointestinal, del contacto genitourinario o la entrada de catéteres o heridas como las posibles vías de contaminación del hospedero (Arab *et al.*, 2021). Gracias a la documentación de los diferentes casos clínicos, también se respalda la suposición de que *L. adecarboxylata* propicia la coinfección con otras bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterococcus faecalis*,

*Pantoea agglomerans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas spp.*, entre otras (Spiegelhauer et al., 2018).

Dentro de los reportes de los casos clínicos también se han realizado diferentes pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En un estudio realizado por Zayet y colaboradores, titulado “*Leclercia adecarboxylata* como patógeno emergente en infecciones humanas: características clínicas y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana” se identificaron 8 muestras recuperadas de 8 pacientes diferentes (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). En todos los casos, las diferentes cepas obtenidas de *L. adecarboxylata* demostraron ser sensibles a los grupos de antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y misceláneos (Zayet et al., 2021).

**Tabla 1.** Aislados de *L. adecarboxylata* susceptibles a antibióticos.

| Grupo de antibiótico   | Antibióticos probados         | Aislados de <i>L.a.</i> susceptibles |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Penicilinas</b>     | Ampicilina                    | 8/8                                  |
|                        | Amoxicilina/ácido clavulánico | 8/8                                  |
|                        | Ticarcilina/ácido clavulánico | 5/5                                  |
|                        | Piperacilina/tazobactam       | 8/8                                  |
| <b>Cefalosporinas</b>  | Cefazolina                    | 3/3                                  |
|                        | Cefoxitina                    | 6/6                                  |
|                        | Ceftriaxona                   | 8/8                                  |
|                        | Cefotaxima                    | 8/8                                  |
|                        | Ceftazidima                   | 8/8                                  |
|                        | Cefepima                      | 8/8                                  |
| <b>Carbapenémicos</b>  | Imipenem/cilastatina          | 8/8                                  |
|                        | Ertapenem                     | 8/8                                  |
| <b>Aminoglucósidos</b> | Amikacina                     | 8/8                                  |
|                        | Gentamicina                   | 3/3                                  |

|                                             |                            |     |
|---------------------------------------------|----------------------------|-----|
|                                             | Tobramicina                | 1/1 |
| <b>Fluoroquinolonas</b>                     | Ácido nalidíxico           | 3/3 |
|                                             | Norfloxacin                | 5/5 |
|                                             | Ofloxacin                  | 2/2 |
|                                             | Ciprofloxacina             | 6/6 |
| <b>Inhibidores de la síntesis de folato</b> | Trimetoprim/sulfametoxazol | 3/3 |
| <b>Nitrofuranos</b>                         | Nitrofurantoína            | 2/2 |
| <b>Ácido fosfónico</b>                      | fosfomicina                | 1/2 |

Recuperado de: (Zayet *et al.*, 2021).

### 1.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos

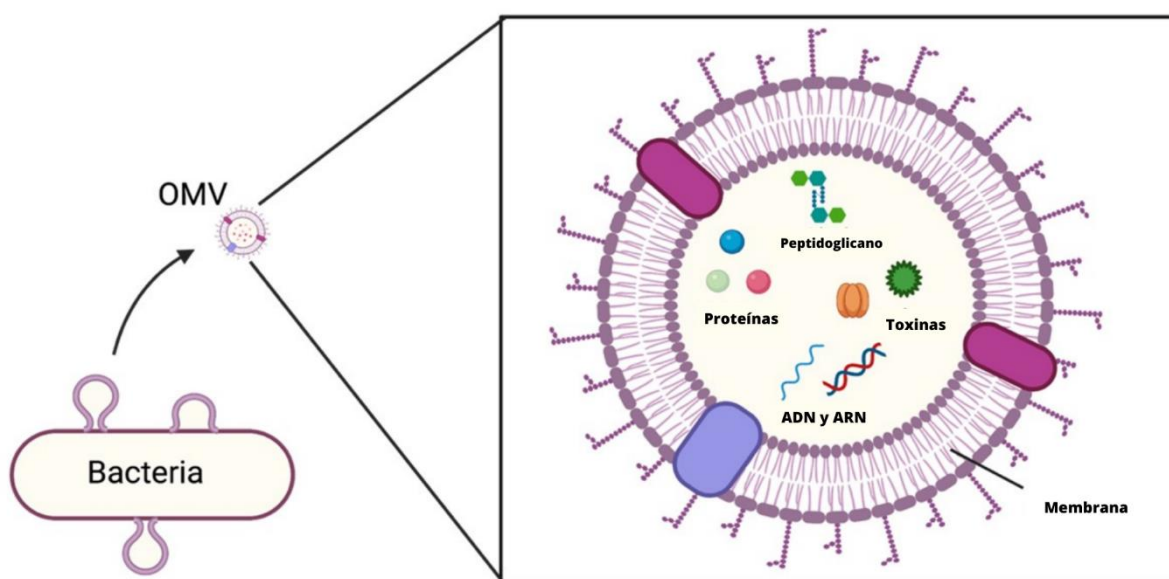
La resistencia a antibióticos en las bacterias patógenas es una amenaza latente a la salud que aumenta a niveles peligrosamente altos en todas partes alrededor del mundo, lo que lo convierte en uno de los temas de salud pública más urgentes. De acuerdo a la información brindada por parte del centro de control de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), en 2019 la resistencia a antimicrobianos cobró la vida de al menos 1,27 millones de personas en el mundo, y la situación solo ha empeorado a raíz de la pandemia SARS-CoV-2; tan solo en México, se detectó un aumento en la resistencia a carbapenémicos para *K. pneumoniae* (López *et al.*, 2022).

Para las bacterias, adquirir la resistencia a antibióticos es el resultado de la interacción entre diferentes organismos y su entorno (Munita *et al.*, 2016). Existen varios mecanismos moleculares que pueden conducir a la resistencia, mismos de los que ya han sido investigados a detalle y se clasifican en tres principales grupos: (i) reducción de las concentraciones intracelulares de antibióticos, (ii) modificación del objetivo del antibiótico y (iii) inactivación del antibiótico (Huemer *et al.*, 2020). De manera particular, se ha demostrado que las OMV's secretadas por las bacterias patógenas son capaces de conferirles protección a diferentes clases de antibióticos, estrés físicoquímico y péptidos antimicrobianos. Estas OMV's pueden ofrecer

protección inmediata al actuar como señuelos que puedan unirse o absorber antibióticos (Kim *et al.*, 2018). Por ejemplo, *Acinetobacter baumannii* es una bacteria patógena resistente a carbapenémicos, pero que a través de las OMV's que secreta puede llevar a cabo una transferencia horizontal de genes que se relacionaría con la resistencia a este grupo de antibióticos, además de que demostró que las OMV's son capaces de secuestrar al antibiótico y degradarlo (Rumbo *et al.*, 2011).

#### 1.4 Microvesículas de membrana externa (OMV's)

Las microvesículas de membrana externa (OMV's, por sus siglas en inglés), son estructuras esféricas nanométricas que son secretadas al medio extracelular por las bacterias. Estas estructuras pueden contener proteínas bioactivas, toxinas, lípidos, ácidos nucleicos y también factores de virulencia (**Figura 2**) (Collins *et al.*, 2021). Juegan un papel importante y fundamental en la interacción bacteria-hospedero y hospedero-patógeno, dada la naturaleza de las bacterias patógenas de lidiar con un entorno hostil continuamente, la composición de las OMV's puede modular la respuesta inmunitaria del hospedero y la secreción de proteínas efectoras bacterianas (Manning *et al.*, 2011).

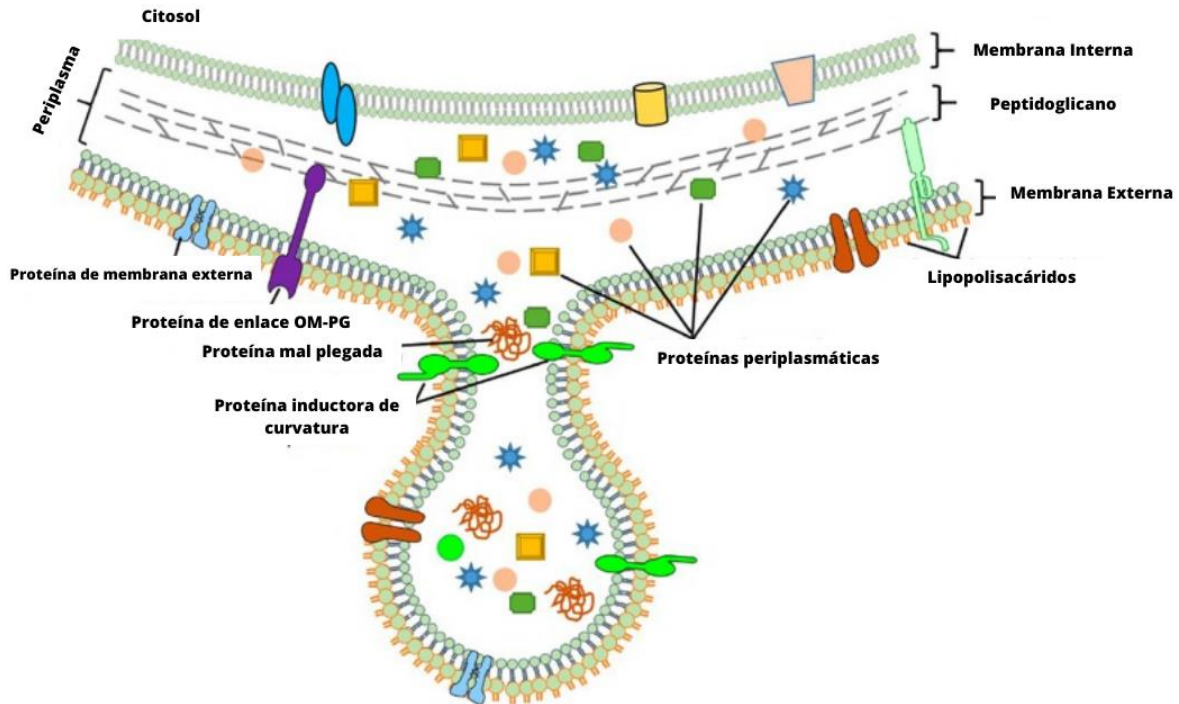


**Figura 2.** Composición intracelular de las OMV's secretadas por las bacterias gramnegativas. Modificado de: (Barron, 2021).

### 1.4.1 Biogénesis de OMV's

Ya que alguna vez fueron consideradas como estructuras que se producían como el desecho de celular o de desprendimiento por el rejuvenecimiento de la membrana, el proceso de formación de OMV's resultó ser complejo y elusivo de describir (Gould *et al.*, 2021). En las últimas décadas, ha habido un aumento en el interés por demostrar que estas pequeñas estructuras desempeñan un papel mucho más importante del que habríamos imaginado en las funciones bacterianas y, en el caso de las bacterias gramnegativas, de su interacción bacteria-hospedero y patógeno-hospedero. Dada la evidencia generada a través de varios estudios bioquímicos y genéticos, se han propuesto varios modelos para la producción mecánica de OMV's. Un primer estudio realizado por Murray y colaboradores en 1976, sugirió que la reducción del entrecruzamiento entre el peptidoglicano (PG) y la OM (membrana externa) desencadena su formación (Burdett *et al.*, 1974). Dado que después se demostró que la lipoproteína Lpp contribuye a la formación del enlace OM-PG, también se planteó la hipótesis de que la hipervesiculación podría deberse a mutaciones en el gen Lpp y dar lugar a una lipoproteína diferente involucrada en la síntesis y degradación de PG, y que se asoció con la producción de OMV's de *E. coli* y una cepa de *E. coli* K12 (Rolhion *et al.*, 2005). El aumento en la presión de turgencia de las bacterias también propicia la formación de ampollas en la OM, lo que conllevaría a un aumento en la producción de las OMV's. Sin embargo, el empaquetamiento de las moléculas citosólicas en las OMV's aún no está del todo claro (**Figura 3**).

También se ha sugerido que cuando la OM presenta un alto contenido de fosfolípidos, endotoxinas y otras moléculas, estas provocan una curvatura de la OM que conduce a la formación de OMV's (Mashburn *et al.*, 2005). En un trabajo más reciente, realizado por Lee y colaboradores, se utilizó a *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de estudio del mecanismo de producción de OMV's. En él, se reveló que, al realizar modificaciones a la curvatura de la OM con la inserción de moléculas de detección de quórum, resultaba en biogénesis de estas estructuras. Además, esta producción mejoró considerablemente con la adicción de agentes quelantes (Lee *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Biogénesis de la producción de OMV's en bacterias. Modificado de: (Jan, 2017).

### 1.5 Función de las OMV's en la patogenicidad de bacterias Gramnegativas

La diversidad de funciones que presentan las OMV's es variada, pero en el caso de las bacterias Gramnegativas como *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* y *Neisseria gonorrhoeae*, estas estructuras han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de contribuir a la patogenicidad bacteriana a través del transporte de factores de virulencia. A las OMV's secretadas por estas bacterias se les han atribuido funciones de citotoxinas, formación de biopelículas, adhesión a las células hospederas, interrupción de procesos fisiológicos de la célula hospedera, moléculas de detección de quórum, enzimas degradativas, inducción de la muerte celular a través de OM, entre otras. Estas funciones delegadas a través de las OMV's funcionan como vehículos que viajan a través de largas distancias y estrechos conductos para comprometer las defensas del hospedero y sobresalir dentro de su nicho (Villageliu *et al.*, 2022). Sin embargo, actualmente no existen publicaciones

que describan las funciones de OMV's, utilizando a *L. adecarboxylata* como modelo de estudio.

## ANTECEDENTES GENERALES

En un estudio realizado por Kim y colaboradores llamado “Vesícula de la membrana externa: interacciones de la célula hospedero” se observó la formación de OMV's con el objetivo de identificar su ruta intracelular durante la invasión de células hospedero utilizando cepas de *Escherichia coli*. Se destacó que durante el mecanismo de la formación de OMV's, estas están compuestas en gran parte por proteínas en su membrana externa, además de fosfolípidos y polisacáridos. De manera importante, se plantea la posibilidad de que exista un mecanismo de clasificación que es altamente específico para enriquecer a las OMV's con proteínas inmunogénicas que median la transmisión de factores de virulencia, además de otros componentes adquiridos de la envoltura bacteriana, hacia las células del hospedero (Kim *et al.*, 2008).

En otro estudio realizado por Ciofu y colaboradores, llamado “La  $\beta$ -lactamasa cromosómica se empaqueta en vesículas de membrana y es secretada por *Pseudomonas aeruginosa*” se establece que existe una gran cantidad de proteínas que las bacterias exportan a través de OMV's. A través de un modelo de estudio utilizando una bacteria gramnegativa, *Pseudomonas aeruginosa*, muchas de estas proteínas mejoran las capacidades invasivas de las de las bacterias y de igual manera, facilitan su adherencia. La actividad de una proteína en particular asociada a OMV's, la  $\beta$ -lactamasa, es clave en el aumento a la resistencia de penicilinas y cefalosporinas. Sus conclusiones resultan relevantes, pues plantean la posibilidad de que otras bacterias patógenas gramnegativas sean capaces de conferir en la biogénesis de OMV's la resistencia antimicrobiana que beneficie a toda una población bacteriana en cuestión, además de que puedan existir componentes adicionales bien regulados por los mecanismos de secreción de OMV's que sean capaces de dañar a las células hospederos a través de la segregación de toxinas (Ciofu *et al.*, 2000)

## 2.1 Antecedentes directos

La bacteria *L. adecarboxylata* aún no ha sido reportada como una principal fuente de infecciones nosocomiales o de atención a la salud, sin embargo, el referente que se tiene es el brote que ocurrió en Jalisco en el año 2019 en una población expuesta de 204 pacientes hospitalizados, ocasionado por una solución parenteral contaminada con la bacteria. Al concluir el brote epidemiológico, se identificaron 69 casos de infección originados a causa de *L. adecarboxylata*, de los cuales se presentaron dos fallecimientos, de los cuales sólo uno fue asociado al brote de la bacteria por parte del Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica (Secretaría de Salud, 23 de mayo de 2019). Esta bacteria se ha aislado de diferentes ambientes y tiene la capacidad de generar infecciones en humanos, aunado a su movilidad, tiene una plasticidad genómica para adquirir genes de resistencia a antibióticos lo cual hace más difícil el tratamiento en los hospitales.

En un trabajo previo realizado por Guerra y colaboradores, “Microvesículas bacterianas secretadas y su potencial uso en el desarrollo de vacunas” establecieron un protocolo para la extracción y purificación de OMV's secretadas por *Leclercia adecarboxylata*. Si bien el proceso para la purificación quedó establecido, no es clara aún la relación entre la secreción de OMV's de *L. adecarboxylata* y su papel en la generación de una respuesta inmune, debido a los factores de virulencia implicados en la adhesión y evasión de los tejidos del hospedero (Guerra *et al.*, 2023).

Además, de manera reciente se notificó en Puebla la presencia de la cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae* que contiene el gen KPC, el cual otorga resistencia a carbapenémicos (ISSSTE, 2022), el cual puede ser transferido a otras bacterias como *L. adecarboxylata*. Por lo anteriormente descrito es necesario determinar los mecanismos que tiene *L. adecarboxylata* para adquirir o transferir proteínas o sus genes codificantes a otras bacterias y, por lo tanto, convertirse en un alto riesgo como reservorio de genes de resistencia a antibióticos en bacterias intrahospitalarias.

## 2.2 Justificación

*Leclercia adecarboxylata* es un patógeno oportunista que representa un peligro latente a la salud en pacientes inmunocomprometidos, principalmente en hospitales y centros médicos de cuidados intensivos. Poco se conoce al respecto sobre los factores de virulencia que puede generar esta bacteria en los pacientes, y la información respecto al papel de las OMV's secretadas por esta bacteria es aún más limitada. Además, aún no está claro su papel en el transporte de factores de virulencia y genes que puede conferir a otras bacterias. En este estudio se busca demostrar la capacidad de las OMV's de *L. adecarboxylata* de presentar proteínas inmunogénicas en su superficie y conferir resistencia a antimicrobianos como la ampicilina a través de ensayos de resistencia en una cepa susceptible.

## 2.3 Hipótesis

Las OMV's secretadas por *Leclercia adecarboxylata* son capaces de transportar en su membrana proteínas inmunogénicas involucradas en la patogenicidad de la bacteria.

## 2.4 Objetivo General

Evaluar la presencia de proteínas inmunogénicas en la membrana de las OMV's secretadas por *Leclercia adecarboxylata*, capaces de conferir resistencia a antibióticos como la ampicilina.

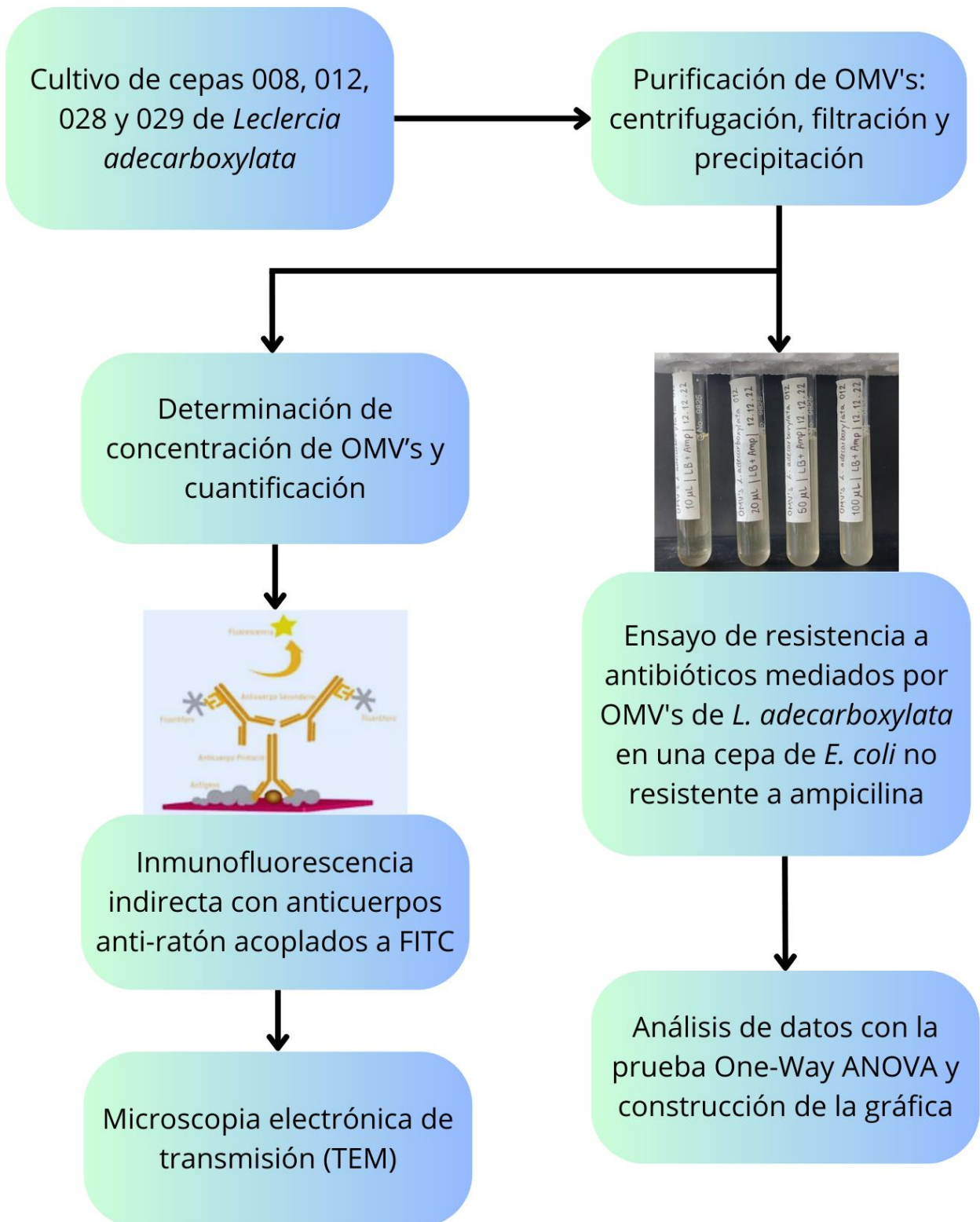
## 2.5 Objetivos Específicos

- Obtener OMV's a partir de los aislados clínicos de las cuatro cepas disponibles de *L. adecarboxylata* a través de centrifugación diferencial y filtración en membranas de PVDF.

- Examinar la presencia de proteínas contenidas dentro de la membrana externa e interna de las OMV's mediante la técnica de SDS-PAGE y mediante TEM.
- Identificar cualitativamente a las proteínas en la membrana de las OMV's a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.
- Realizar ensayos de resistencia a ampicilina en una cepa de *E. coli* no resistente para determinar si existe o no crecimiento en presencia de las OMV's purificadas de las cuatro cepas de *L. adecarboxylata*.

## METODOLOGÍA E INVESTIGACIÓN

### 3.1 Diseño Experimental



### **3.2 Cepas de *L. adecarboxylata***

Se dispuso de cuatro cepas de *L. adecarboxylata*, donadas por el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del CICM, ICUAP de la BUAP, aisladas de diferentes pacientes en el brote ocurrido en Jalisco en el año 2019. Para fines de este estudio, se etiquetaron a estas cuatro muestras con los números *L. a* 008, *L. a.* 012, *L. a.* 028 y *L. a.* 029.

### **3.3 Cultivo de *L. adecarboxylata***

A partir de las cuatro cepas de *L. adecarboxylata* preservadas en congelación a -80 °C se tomó una asada de cada una y se cultivaron utilizando el medio de cultivo LB sólido a 37 °C por 24 horas. Pasadas las 24 horas, se procedió a tomar una asada de las bacterias que crecieron en cada una de las cajas de Petri y se colocaron nuevamente en medio de cultivo líquido (250 mL) en matraces de vidrio, adicionados con 25 µg/µl de ampicilina para ser llevadas a una incubadora de agitación, donde permanecieron por 3 días a 25 °C.

### **3.4 Tinción de *L. adecarboxylata***

#### **3.4.1 Tinción de Gram para *L. adecarboxylata***

Con la tinción de Gram se comprobó el bajo crecimiento bacteriano y la secreción de OMV's después de ser sometidas al estrés con el antibiótico. En un portaobjetos, se colocaron 20 µL de PBS y 10 µL de muestra de cada uno de los matraces con medio líquido, se fijó utilizando calor y se realizó la tinción con 1 gota de cristal violeta al 1%, Lugol, alcohol-acetona y safranina, dejando pasar un intervalo de 1 minuto entre cada gota, para después lavar con agua destilada.

### **3.4.2 Tinción de Hiss para *L. adecarboxylata***

Para la tinción de Hiss se utilizó una gota de suero biológico y una toma de muestra por cada cepa. Se dejó secar al aire y se fijó suavemente con calor. Posteriormente se cubrió con 2 gotas de cristal violeta al 1% y se pasó por calor durante 2 minutos sin dejar secar la gota de cristal violeta. Se lavó con una solución de sulfato de cobre al 20%, se dejó secar y se observó al microscopio óptico.

### **3.5 Purificación de OMV's**

Se tomaron las cuatro muestras en los cultivos líquidos con medio LB adicionados con ampicilina y se colocaron en tubos Falcon para realizar la centrifugación en el equipo CENTURION® a 6000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Al terminar, se recolectó el sobrenadante en nuevos tubos Falcon. Se realizó una nueva centrifugación a 6000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Al retirar los tubos de la centrifuga se realizó la filtración del sobrenadante completo del tubo para extraer las OMV's y realizar la filtración. La filtración se realizó gota a gota con ayuda de un filtro de 0.20 µm y una jeringa de 50 mL. Al terminar la filtración de las cuatro muestras, se completó el contenido del tubo Falcon con acetona fría para su precipitación y se refrigeraron durante toda la noche.

Después de dejar en precipitación con acetona fría durante toda la noche, se procedió a realizar una nueva centrifugación en el equipo CENTURION® a 6000 rpm y 5 °C durante 15 minutos. Una vez terminada la centrifugación, se decantaron los tubos dejando únicamente la pastilla con las OMV's contenidas en el fondo. En los tubos con las cepas 008 y 012 se añadieron 2 mL de PBS estéril, mientras que en los tubos con las cepas 028 y 029 se añadieron 3 mL de PBS, con lo que se mezcló la pastilla y se agitó con cuidado. Se recolectó el contenido de cada tubo en tubos Eppendorf de aproximadamente 1.5 mL. Finalmente se procedió a realizar nuevamente una tinción de Gram de cada muestra para identificar las OMV's purificadas. Estas OMV's se sembraron en placas de LB y se incubaron a 37°C durante 24 horas con la finalidad de determinar la nula presencia de bacterias. Las OMV's obtenidas de la purificación se conservaron en un congelador a -20 °C.

### 3.6 Microscopia Electrónica de Trasmisión

Posterior a la purificación, las OMVs se lavaron dos veces con buffer de cacodilato 0.1 M y se posijaron durante 1 h con tetróxido de osmio al 1 % en tampón de cacodilato. Las OMVs se sedimentaron por centrifugación, se deshidrataron y se incluyeron en resinas de policap. Posteriormente, las muestras se polimerizaron a 60 °C durante 24 h. Las secciones delgadas (70 nm) se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011.

### 3.7 Determinación de la concentración de OMV's de *L. adecarboxylata*

Se preparó un stock de BSA de 10 mg/mL de una solución 1:10 para obtener una dilución de BSA 10 µg/mL. Para esto, se prepararon 200 µL de un stock de 10 µg/µL en 180 µL de agua para tener BSA a 1 µg/µL. La determinación de la concentración de OMV's se realizó cuantificando el contenido de proteínas presentes en 1 µL de OMV's por medio del método de Bradford. En tubos Eppendorf, se colocaron los volúmenes mostrados en la **Tabla 1**, donde el tubo marcado con X fungió como nuestro tubo control.

**Tabla 1.** Esquema para la determinación de la concentración de OMV's.

| Tubo | BSA (µL) | Agua (µL) | Reactivo de Bradford (µL) |
|------|----------|-----------|---------------------------|
| 1    | 0        | 200       | 50                        |
| 2    | 0.5      | 199.5     | 50                        |
| 3    | 1.0      | 199       | 50                        |
| 4    | 5.0      | 195       | 50                        |
| 5    | 10.0     | 190       | 50                        |
| 6    | 20.0     | 180       | 50                        |
| 7    | 30.0     | 170       | 50                        |
| X    | 5.0      | 195       | 50                        |

Se mezclaron los tubos cuidadosamente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió en un microlector de placas BioTek Elx800® a 595 nm.

### 3.8 Lisis de OMV's

Se lisaron las muestras de OMV's en nuevos tubos de Eppendorf con el contenido mostrado en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Esquema para la lisis de OMV's.

| Componentes                                   | Volumen       |
|-----------------------------------------------|---------------|
| OMV's                                         | 40 µL         |
| Buffer RIPA (Tris HCl, NaCl, SDS 0.01%, EDTA) | 200 µL        |
| Inhibidor de Proteasas                        | 20 µL         |
| Buffer de carga                               | 60 µL         |
| Contenido Final                               | <b>320 µL</b> |

Posteriormente se hirvieron las muestras contenidas en los tubos Eppendorf en la parrilla de calentamiento para tubos durante 15 minutos a 100°C. Las muestras hervidas se conservaron en refrigeración a 4°C.

### 3.9 Electroforesis de proteínas (SDS-Page) para OMV's

Para el gel SDS-PAGE se preparó gel separador al 12% y gel concentrador como se muestra en la **Tabla 3**. El marcador utilizado de peso molecular utilizado fue MaestroGen® y el buffer de carga seleccionado para correr el gel fue Tris-Glicina al 4%. Después de preparar los geles, se colocaron en recipientes con azul de coomassie sobre un oscilador de laboratorio durante 24 horas. Posteriormente, se utilizó solución desteñidora con carbón activado para visualizar las bandas.

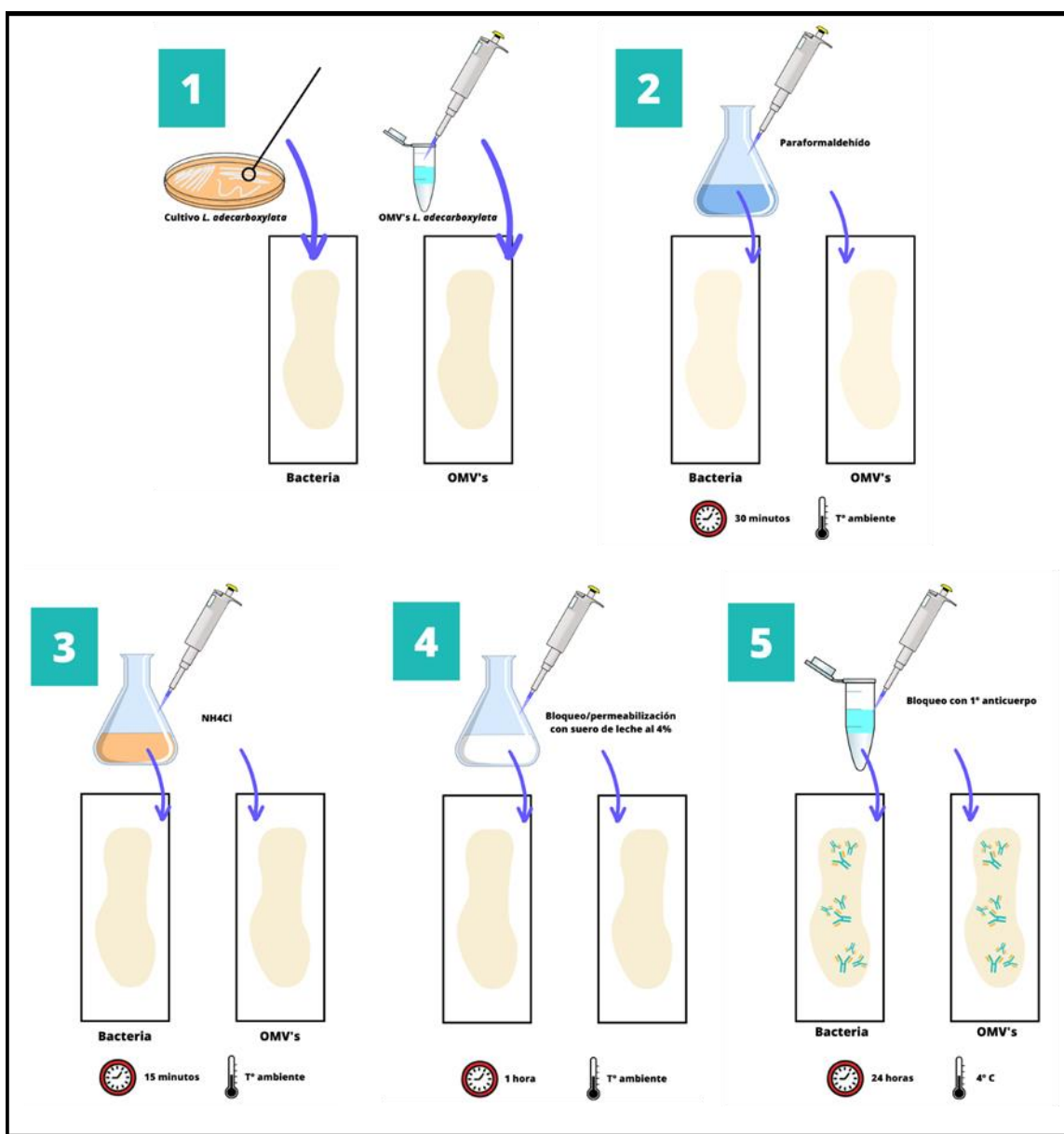
**Tabla 3.** Esquema para SDS-PAGE de OMV's.

| Componentes                          | Gel Separador 12% | Gel Concentrador |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|
| Agua                                 | 1.45 mL           | 1.04 mL          |
| Acrilamida al 30%                    | 3.23 mL           | 320 µL           |
| Bis acrilamida al 2%                 | 1.31 mL           | 130 µL           |
| Tris HCl 1.5M<br>PH 8.8<br>SDS 0.4%  | 2 mL              | -                |
| Tris HCl 0.5 M<br>PH 6.8<br>SDS 0.4% | -                 | 500 µL           |
| Persulfato de amonio<br>10%          | 64 µL             | 40 µL            |
| TEMED                                | 8 µL              | 3 µL             |

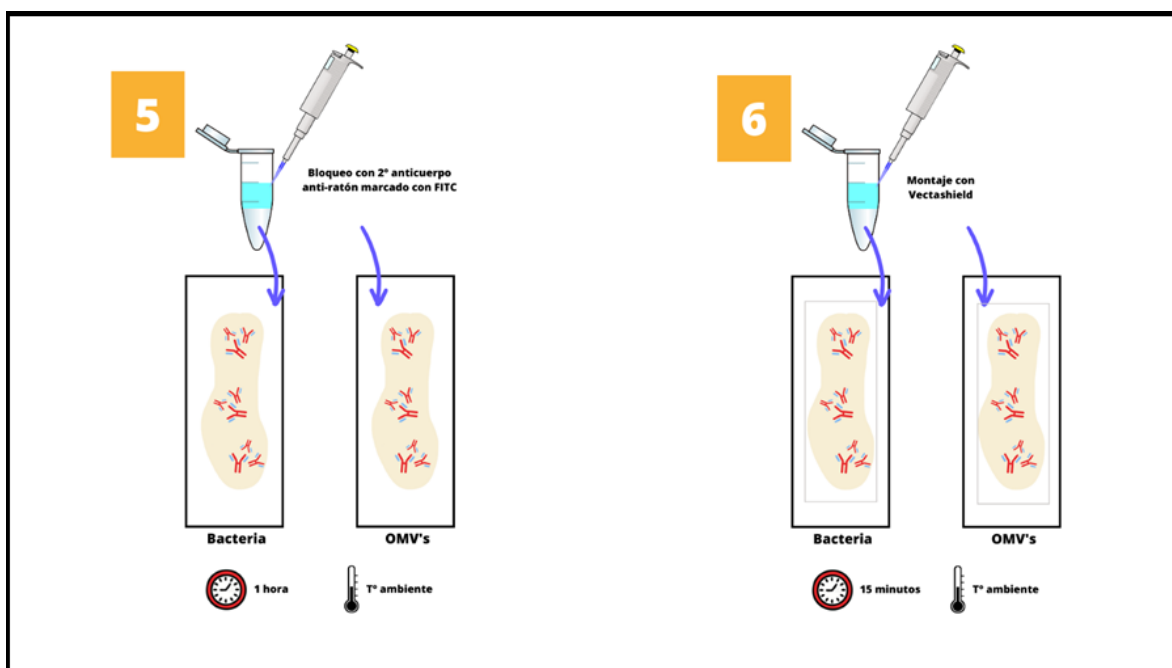
### 3.9 Inmunofluorescencia indirecta

Para la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se usó un cultivo de nuestras cepas 008, 012, 028 y 029 de *L.a.* y las muestras de OMV's de cada cepa. En portaobjetos colocamos una asada del cultivo de cada cepa y en otro 20 µL de las OMV's purificadas con una gota de PBS estéril. Se fijaron las muestras con una gota de paraformaldehído fresco al 4% y pH 7.4 a temperatura ambiente por 30 minutos. Se limpiaron las muestras nuevamente con 3 mL de PBS estéril de manera lenta y uniforme para después lavar con cloruro de amonio durante 15 minutos a temperatura ambiente; pasado el tiempo se lavaron nuevamente con PBS estéril. Posteriormente se realizó el bloqueo y permeabilizado de las muestras con 25 µL de suero de leche al 4% por 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubó con el primer anticuerpo policlonal anti-OMV's de *K. pneumoniae* en una dilución 1:1000 en PBS estéril durante toda la noche a una temperatura de 4°C (**Figura 4**).

Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS estéril durante 5 minutos en 3 ocasiones. Se incubó con el segundo anticuerpo monoclonal IgG anti-ratón hecho en cabra y marcado con FITC durante 1 hora a 37 °C en una cámara oscura. Pasado ese tiempo, se lavaron nuevamente con PBS estéril durante 5 minutos en 3 ocasiones. Se realizó el montaje con 8  $\mu$ L de Vectashield® y se cubrieron con cubreobjetos. Sellamos los preparados con barniz transparente y se conservaron a 4 °C durante toda la noche en cámara oscura hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Motic) (**Figura 5**).



**Figura 4.** Primera parte de Inmunofluorescencia Indirecta.



**Figura 5.** Segunda parte de Inmunofluorescencia Indirecta.

### 3.10 Ensayo de resistencia a antibióticos

Se preparó medio de cultivo LB líquido adicionado con 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ampicilina de un stock de 100 mg/mL y se distribuyó su contenido en tubos de ensayo con 5 mL cada uno. La distribución del contenido de OMV's para cada tubo se realizó en concentraciones crecientes de 10, 20, 50 y 100  $\mu\text{g}$  para cada OMV's purificadas de las cepas de estudio indicadas en la **Tabla 4**; este ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

**Tabla 4.** Esquema para el ensayo de resistencia a antibióticos.

| Tubos con Medio LB + Ampicilina |                  |                  |                  |                   |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Cepa OMV's                      | 1                | 2                | 3                | 4                 |
| 008                             | 10 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |
| 012                             | 10 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |
| 028                             | 10 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |
| 029                             | 10 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |

Después de realizar la distribución de las muestras en los tubos, se conservaron en una incubadora de agitación donde permanecieron durante 2 horas a 37 °C, posteriormente se adicionaron  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de una *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , la cual es susceptible a ampicilina. Se dejaron los tubos en incubación a 37°C durante 24 hrs. Finalmente se midió la densidad óptica a 600 nm para determinar el crecimiento de *E. coli* en las diferentes concentraciones de OMVs. Como control positivo se usó *E. coli* crecida en medio LB sin ampicilina y como control negativo la cepa de *E. coli* crecida en un medio LB con ampicilina.

### **3.10.1 Control Positivo y Negativo**

En el control positivo se utilizó el medio de cultivo adicionado con antibiótico en la misma cantidad, con una asada de un cultivo de *E. coli* no resistente a ampicilina. En el control negativo se utilizó medio de cultivo sin antibiótico y se le adicionó una asada del mismo cultivo de *E.coli* no resistente a ampicilina.

### **3.11 Análisis estadístico**

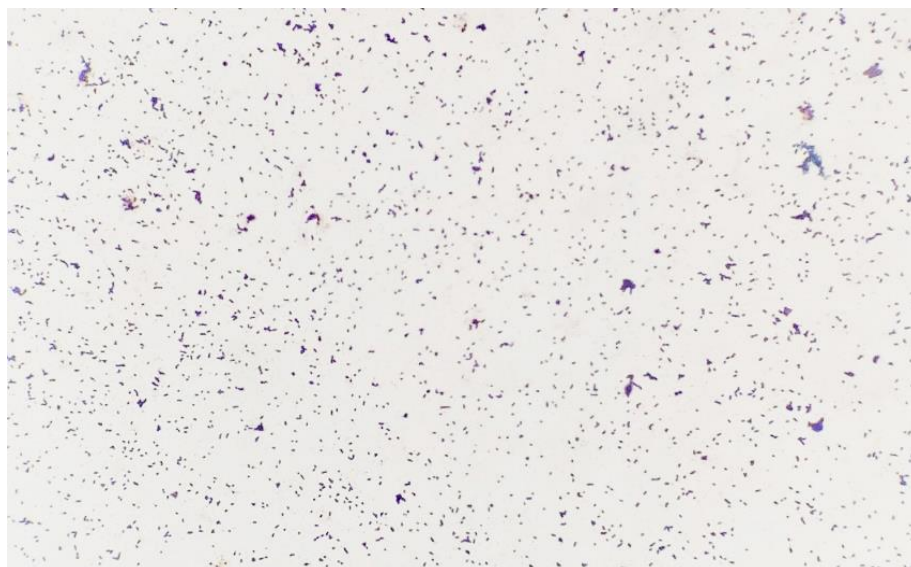
Todos los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba de One-Way ANOVA, seguida por la prueba de Tukey con la finalidad de determinar diferencias estadísticamente significativas utilizando el servidos Astatsa.

## **RESULTADOS**

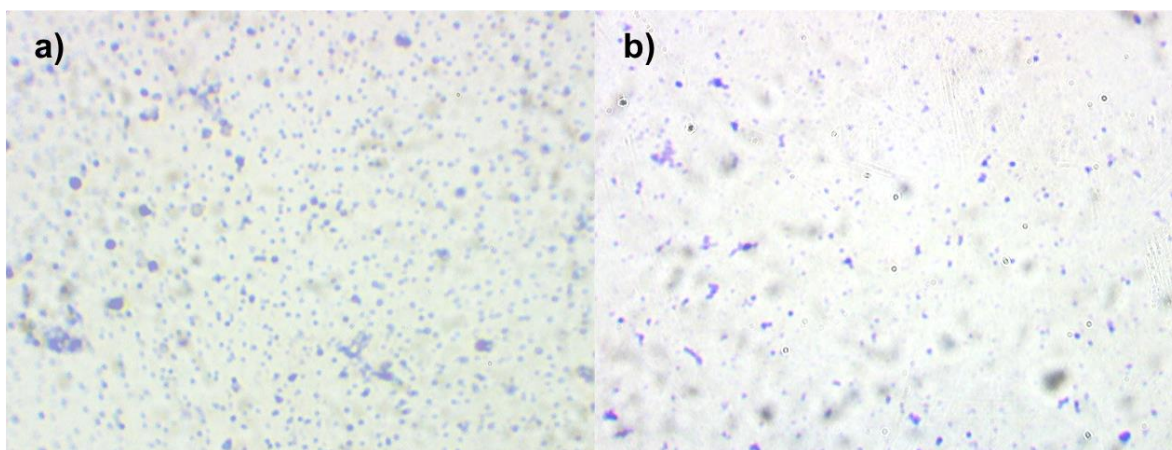
### **4.1 Purificación de OMV's**

La técnica de recuperación de OMV's más común se logra a través del método de centrifugación diferencial, no obstante, este método puede presentar un riesgo de que también se aísle material que no pertenece propiamente a la membrana externa bacteriana (Novoa, 2021). Para evitarlo, las OMV's recuperadas de las cepas *L. a.* 008, *L. a.* 012, *L. a.* 028 y *L. a.* 029 además de someterse a centrifugación

diferencial, se combinó la filtración y la precipitación en acetona fría para garantizar una alta especificidad en la recuperación de estas estructuras, descartando otro tipo de contaminantes y sales. Para comprobar la eficacia de la combinación de estos métodos, los componentes presentes en la membrana de las OMV's permitieron su identificación mediante tinción Gramnegativa mostrando una coloración púrpura-rojiza, correspondiente a este grupo bacteriano (**Figura 6 - Figura 7**). De esta forma, se obtuvieron las OMV's altamente purificadas.



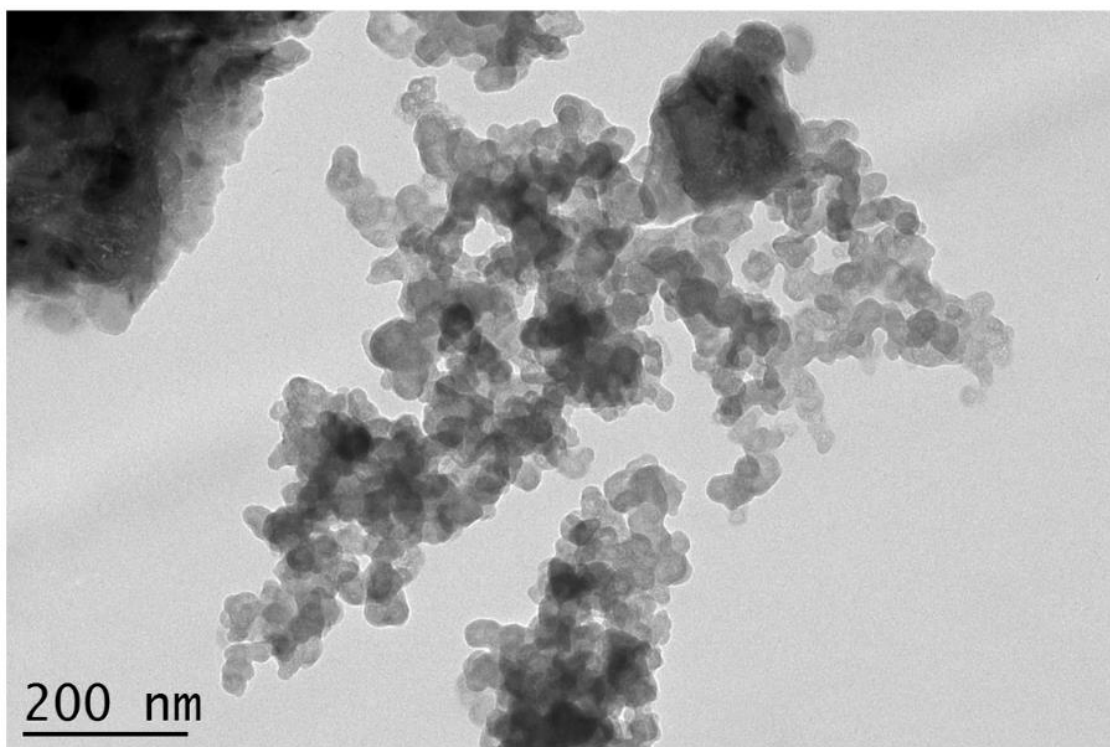
**Figura 6.** Tinción de Gram de OMV's de *Leclercia adecarboxylata*. Cepa 008 en aumento 10X.



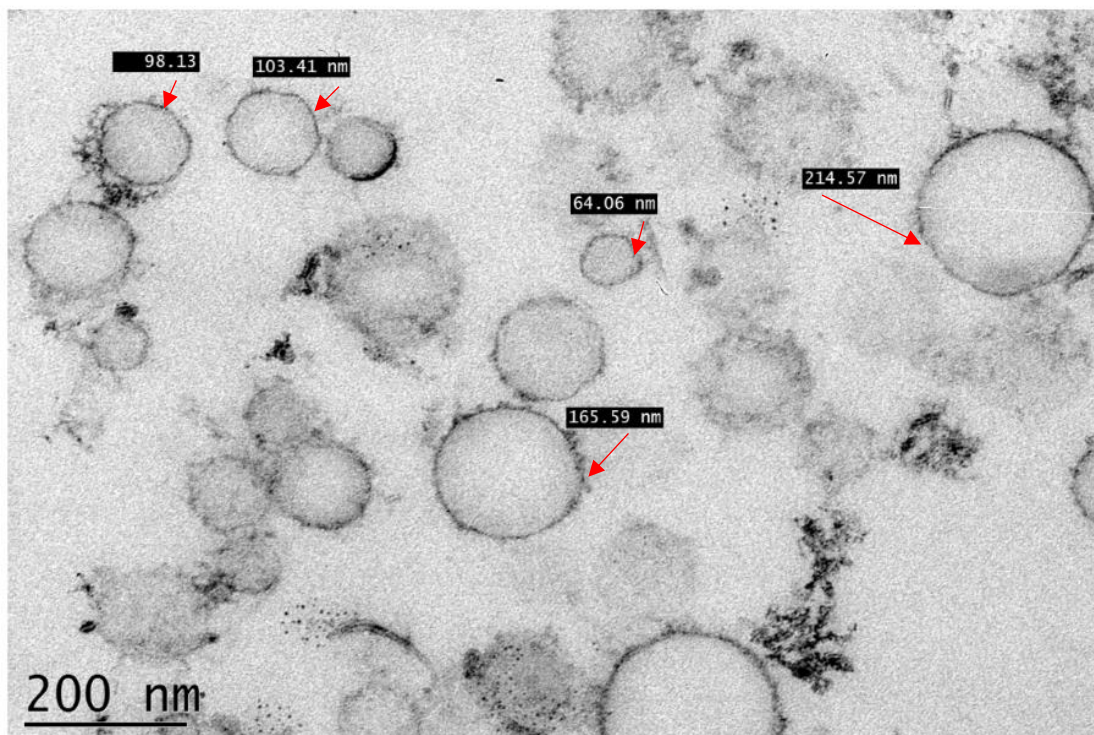
**Figura 7.** Tinción de Gram de OMV's de *Leclercia adecarboxylata*. Presentan morfología esférica y tienden a formar agrupaciones. a) Cepa 008 y b) cepa 012 son las que presentan imágenes más nítidas que las obtenidas de las cepas 028 y 029. Aumento 100X.

## 4.2 Identificación cualitativa de OMV's mediante TEM

Las OMVs purificadas se identificaron mediante TEM (microscopía electrónica de transmisión) por su capacidad de amplificar los detalles estructurales de las OMV's, demostrándose la agrupación entre ellas (**Figura 8**), así como la presencia de una variedad de tamaños entre 45-250 nm, más aún se observó la presencia de proteínas en la membrana, en el interior de las OMVs e incluso se aprecia la secreción al medio de proteínas por parte de las OMV's (**Figura 9**). Con la obtuvimos dos imágenes de las cepas *L.a.* 012 (**Figura 8**) y la cepa *L.a.* 008 (**Figura 9**).



**Figura 8.** TEM de OMVs de cepa *L.a.* 012 mostrando agrupaciones entre las OMVs. Aumento de 20 000X.



**Figura 9.** TEM de OMVs de cepa *L. a.* 008, demostrando diferentes tamaños, así como presencia de proteínas en membrana y secretadas al medio. Aumento de 20 000X.

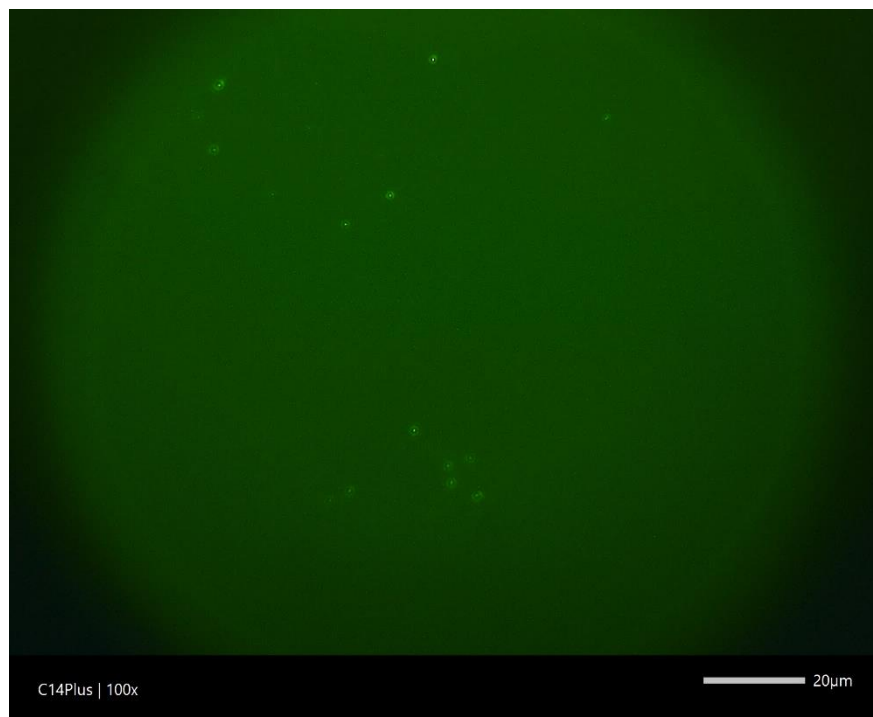
#### 4.4 Identificación cualitativa de OMV's

Para este estudio, se optó por el método de IFI considerando que ayuda en la determinación de proteínas contenidas en moléculas de bajo peso molecular (Anaya *et al.*, 2008). La OMV's secretadas por las cuatro cepas de *L. a.* fueron purificadas e identificadas con microscopía de fluorescencia usando los anticuerpos heterólogos de las OMVs de *K. pneumoniae*.

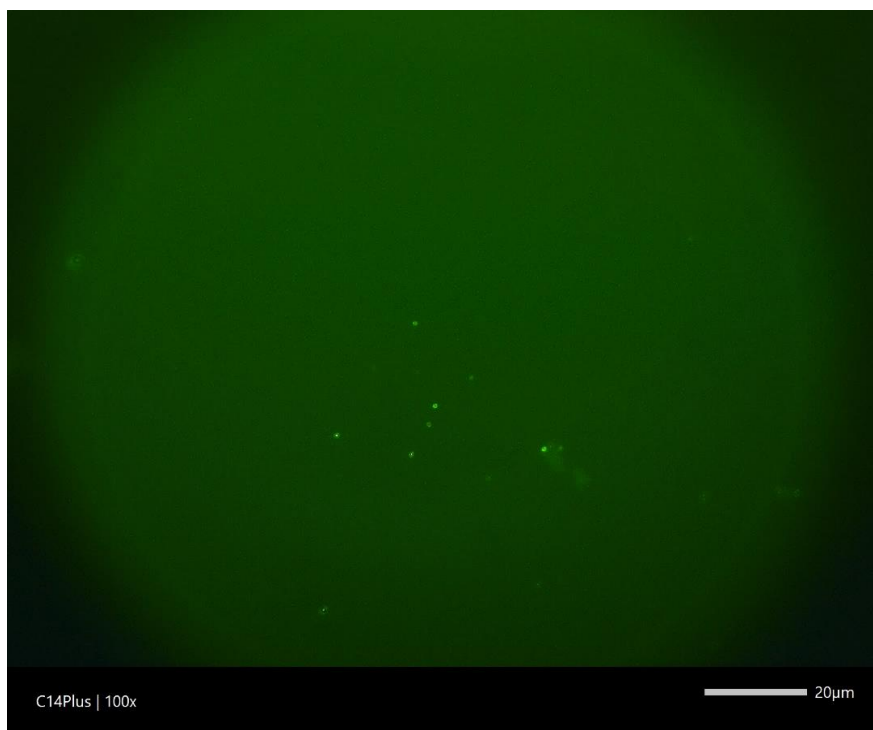
La visualización de proteínas se realizó en el microscopio de epifluorescencia Motic® y la cámara ProgRES C14Plus®. Las imágenes mostradas permiten ver a los anticuerpos acoplados claramente a la membrana de las OMV's, además de permitir ver un agrupamiento en algunas de las OMV's en una forma particular de anillo. Las imágenes obtenidas en IFI, permiten ver a los anticuerpos acoplados claramente a la membrana de las OMV's, con un agrupamiento de las OMV's. De manera importante en las microscopías no se observa la presencia de bacterias *L. a.* contaminantes (**Figura 10 - Figura 13**)



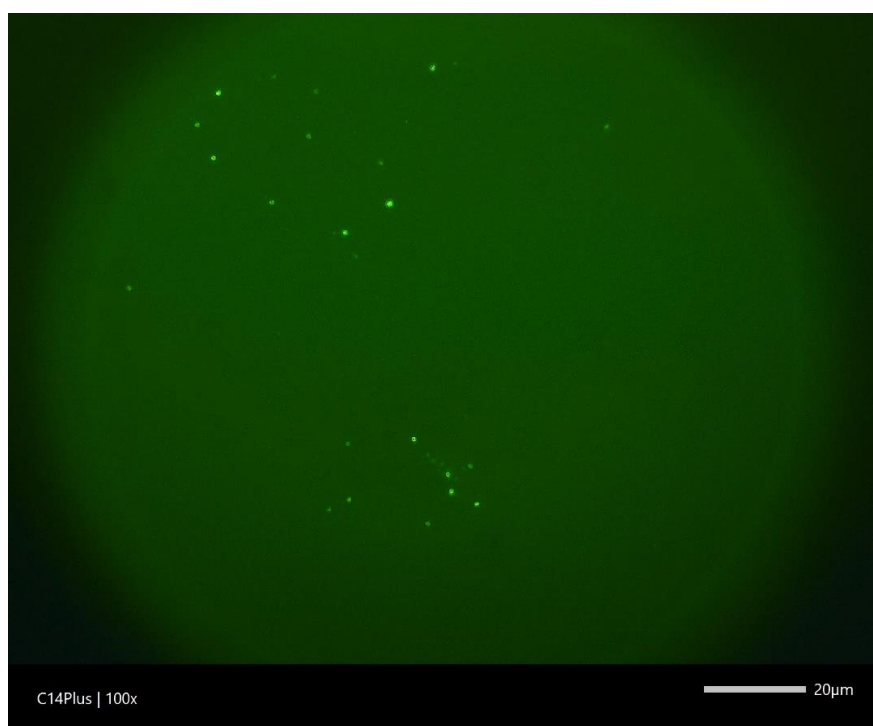
**Figura 8.** Inmunofluorescencia indirecta de OMV's purificadas de *Leclercia adecarboxylata*. Cepa 008.



**Figura 9.** Inmunofluorescencia indirecta de OMV's purificadas de *Leclercia adecarboxylata*. Cepa 012.



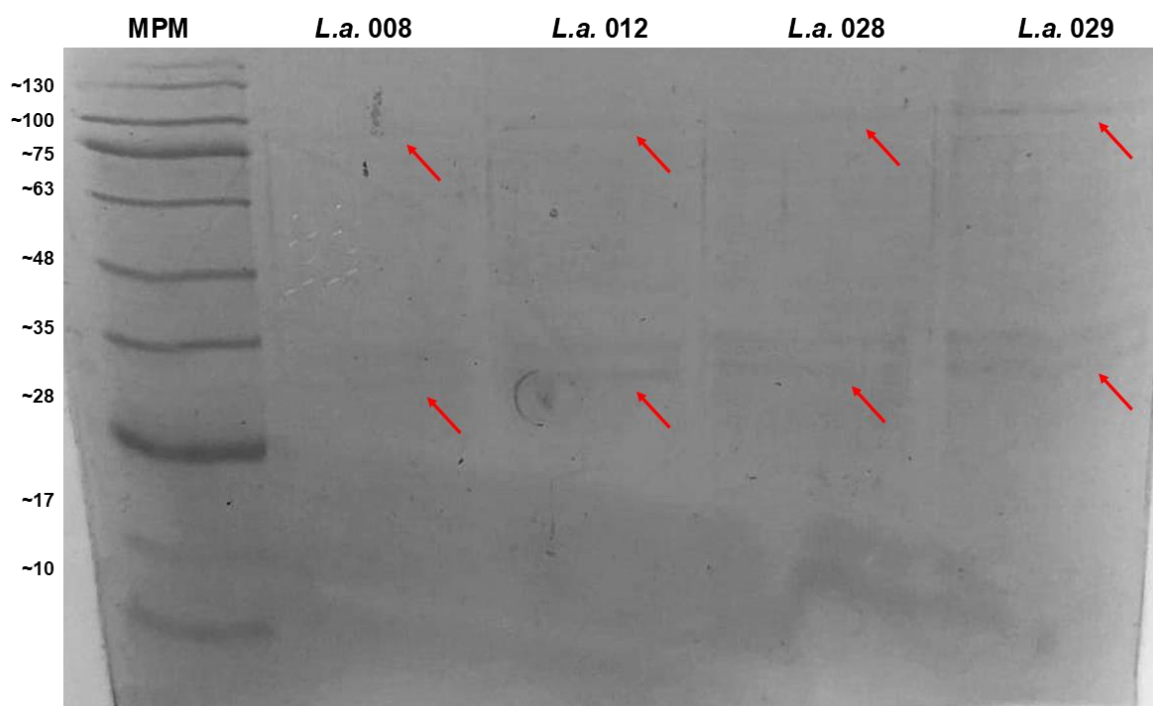
**Figura 10.** Inmunofluorescencia indirecta de OMV's purificadas de *Leclercia adecarboxylata*. Cepa 028.



**Figura 11.** Inmunofluorescencia indirecta de OMV's purificadas de *Leclercia adecarboxylata*. Cepa 029.

### 4.3 Visualización de Proteínas en SDS-PAGE

Las OMV's secretadas por bacterias gramnegativas se caracterizan por estar altamente enriquecidas con proteínas bioactivas (Jan, 2017). Decidimos comprobar la presencia de proteínas que pudieran estar contenidas en la membrana de las OMV's, visualizándolas mediante un gel SD-PAGE. Se logró la identificación de unas bandas para las cuatro cepas con un perfil proteico bastante similar (**Figura 14**).



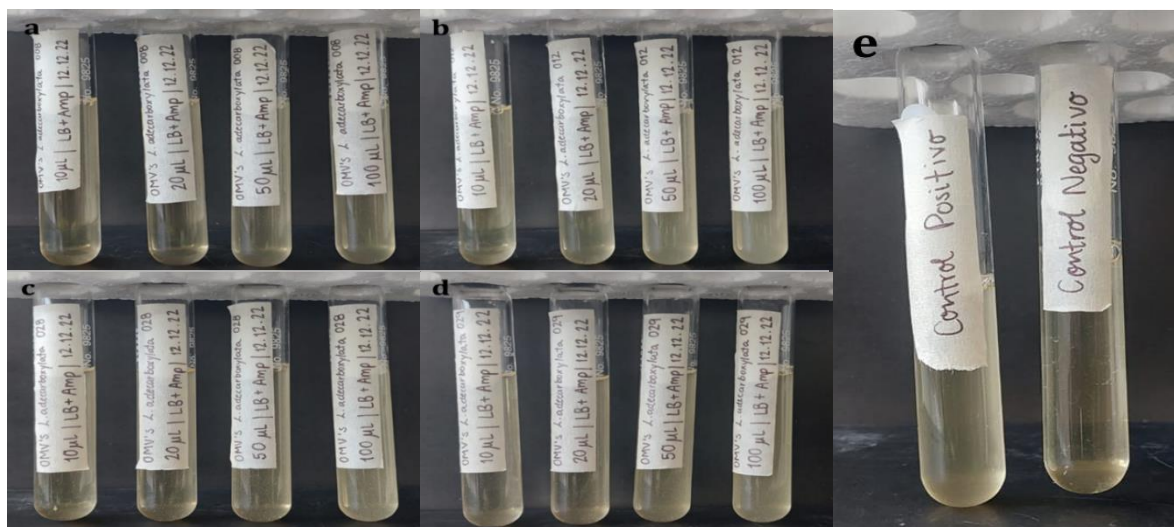
**Figura 14.** SDS-PAGE de proteínas de OMV's obtenidas de *L. adecarboxylata*. En el carril 1, cepa 008; carril 2, cepa 012; carril 3, cepa 028; carril 4, cepa 029.

Las bandas tenues se explican debido a la tendencia que presentan las OMV's de precipitarse al fondo de los tubos donde se encuentran contenidas después de la lisis. Con unas bandas de entre 30 y 80 kDa, podemos apuntar a la presencia de proteínas enriquecidas en las OMV's, las cuales podrían ser inmunogénicas capaces de activar y regular las respuestas del sistema inmune, reconociendo a las OMV's como agente patógeno externo (Vázquez *et al.*, 2022).

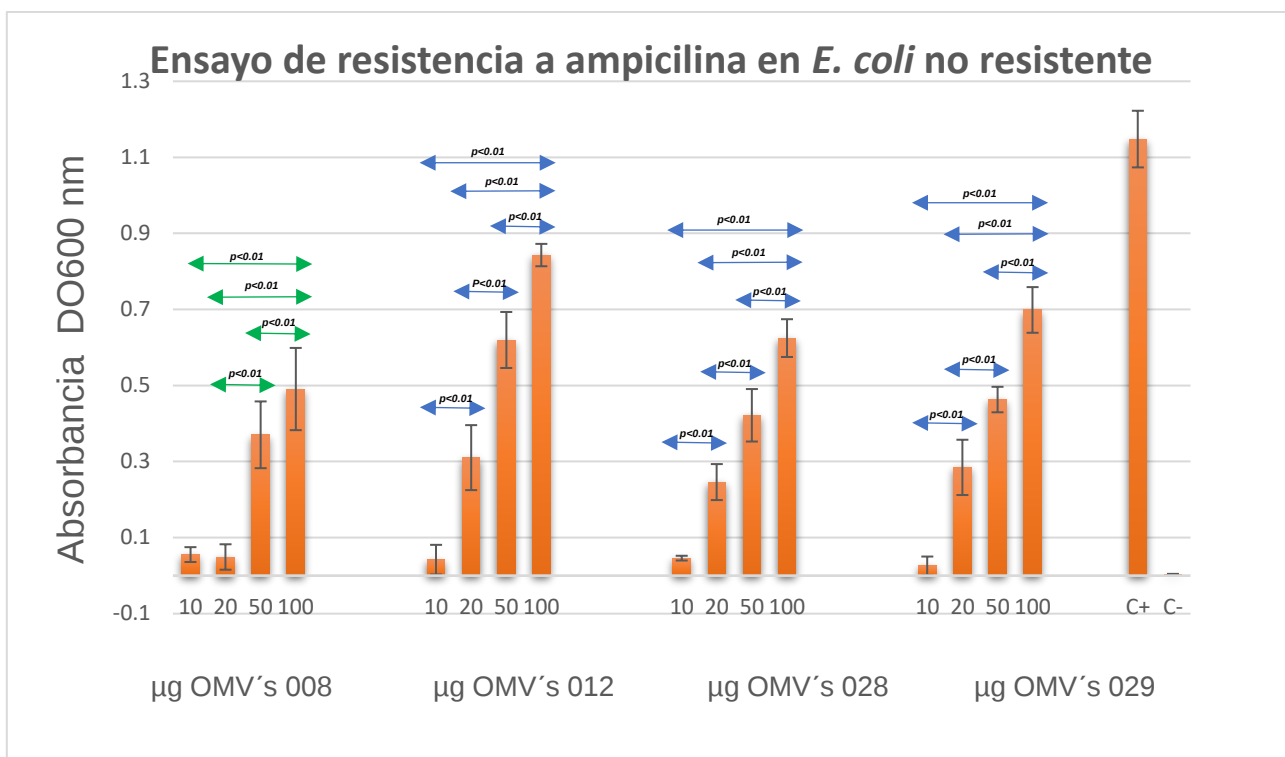
#### 4.5 Ensayos de resistencia a antibióticos

Para demostrar la capacidad de las OMV's de *L. adedecarboxylata* de conferir resistencia a antibióticos, utilizamos ampicilina y una cepa de *E. coli* no resistente a ampicilina. Los resultados de los ensayos de resistencia a antibiótico demostraron que existe mayor crecimiento de la cepa de *E. coli* no resistente a ampicilina cuando la concentración de OMV's es mayor. Como se observa en la **Figura 15**, en todos los tubos con las cuatro diferentes cepas de *L. a.* se presentó crecimiento de la bacteria de *E. coli* no resistente a ampicilina. En el control positivo de *E. coli* en medio sin ampicilina se observa crecimiento, mientras que en el control negativo de *E. coli* adicionado con ampicilina no se observa crecimiento. La turbidez fue el principal indicio visual de que existió dicho crecimiento.

Con los contenidos de los tubos de la **Figura 15**, mismos que se realizaron por triplicado durante cada ensayo y se repitieron tres veces, con un total de tres ensayos, se midió la absorbancia para determinar su grado de crecimiento (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Con los datos obtenidos, se construyó el gráfico mostrado en el **Gráfico 2**, donde se demuestra claramente que existe una relación directa entre el crecimiento de *E. coli* y el aumento en la concentración de las OMV's de las cepas de *L. a.* Los controles positivo y negativo nos ayudan a comprobar la fiabilidad de nuestros resultados.



**Figura 15.** Cultivos de *E. coli* no resistente a ampicilina en medio LB líquido adicionado con 100 µg/ µl de ampicilina y diferentes concentraciones de OMV's de la cepa 008 (a), 012 (b), 028 (c) y 029 (d).



**Gráfico 2.** Crecimiento de la cepa de *E. coli* no resistente a ampicilina adicionada con las diferentes concentraciones de OMV's de las cuatro cepas de *L. a.* estudiadas. Nótese el aumento del crecimiento; a mayor concentración de OMV's, mayor crecimiento de *E. coli*. Además, se señalan las diferencias significativas obtenidas a través de la prueba One-Way ANOVA. Para las OMV's de la cepa 008 se determina que entre la concentración de 10 a 20 µg no hay diferencia significativa, pero entre las concentraciones de 20 a 50 µg, de 20 a 100 µg y de 50 a 100 µg existe una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, para las OMV's de las cepas 012, 028 y 029 se determina que, sí hay una diferencia significativa entre la concentración de 10 a 20 µg, al igual que entre las concentraciones de 20 a 50 µg, de 20 a 100 µg y de 50 a 100 µg ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las microvesículas de membrana externa fueron observadas por primera vez en 1946 y confirmadas como exosomas en el año de 1987. Aunque mucho tiempo se consideró a estas estructuras como parte del residuo intracelular, más tarde se demostraría que estas poseían en su interior ácidos nucleicos, además de lípidos y proteínas; en el caso de las bacterias gramnegativas, las OMV's representan incluso un mecanismo para la supervivencia no solo en bacterias, también en plantas, parásitos y humanos (Clancy *et al.*, 2021), los cuales podrían ser un factor de virulencia clave de la interacción patógeno-hospedero (Matsuzaka *et al.*, 2022). Para el estudio de OMV's, es relevante realizar un adecuado aislamiento y purificación de las mismas para realizar adecuadamente los análisis posteriores. Una manera de lograr la secreción de OMV's en bacterias es a través del estrés por antibióticos, ya que es considerado como uno de los inductores más potentes de los mecanismos de defensa en los patógenos (Ultee *et al.*, 2019). Debido a que en diversos estudios se ha observado una sobreproducción de OMV's después de ser sometidas a tratamientos con antibióticos, se cree que son una forma de defensa bacteriana contra el estrés (Mozaheb *et al.*, 2020). Por lo tanto, en este estudio las cepas 008, 012, 028 y 029 de *Leclercia adecarboxylata* lograron secretar exitosamente OMV's después de ser sometidas a un estrés por ampicilina. Estas estructuras obtenidas corresponden a las descritas previamente, con un tamaño de entre 20 y 200 nm y con una tinción correspondiente a la característica de bacterias gramnegativas que se puede apreciar en las **Figura** y **Figura** (Schwechheimer *et al.*, 2015). La purificación de OMV's implica un aislamiento exitoso de OMV's también y la eliminación de bacterias, para lo cual es necesario realizar múltiples pasos de centrifugación y, posteriormente, de filtración. Como lo menciona Klimentová y colaboradores (Klimentová *et al.* 2015), la cantidad de OMV's obtenidas mediante centrifugación en el medio suele ser baja; no obstante, al combinar la precipitación y la centrifugación se permite la sedimentación de OMV's, tal y como lo que se realizó dentro del protocolo de obtención para nuestras muestras OMV's de *L. adecarboxylata*, permitiéndonos obtener un alto contenido de estas estructuras en nuestras cuatro cepas. Por otra parte, la inmunofluorescencia

indirecta es una técnica que nos permite aprovechar el potencial de unión de los anticuerpos para unirse a nuestras estructuras objetivo de estudio. En este caso, utilizamos anticuerpos policlonales anti-OMV's de *K. pneumoniae* para reconocer cualitativamente a las proteínas contenidas en la membrana de las OMV's de *L. adecarboxylata*. Para no comprometer la estructura de la OMV's, la permeabilización se realizó a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% en solución de PBS estéril. Reportes previos con la técnica de inmunofluorescencia en un trabajo realizado por Park y colaboradores, empleando a *E. coli* DH5α como uno de sus modelos de estudio, después de permeabilizar las células y fijarlas, indican que la morfología de las bacterias no cambia y, por lo tanto, no es específico del método de fijación utilizando paraformaldehído, revelándonos imágenes a través de IFI de las OMV's (Park *et al.*, 2019). De lo anterior podemos inferir que las estructuras mostradas en la **Figura 10**, **Figura 11**, **Figura 12** y **Figura 13** corresponden a la estructura de las OMV's de *L. adecarboxylata*, confirmando también que las tinciones realizadas y observadas a través del microscopio óptico corresponden a las OMV's de *L. adecarboxylata* (**Figura , Figura** ). La técnica de TEM nos permite tomar una muestra para formar una imagen a través. Entre las diferentes técnicas de visualización para TEM, la tinción negativa y crionegativa es capaz de revelarnos partículas finas y dispersas como esporas, protozoos, parásitos, bacterias y OMV's (Harris, 2015). En el año 2019, Delgado y colaboradores desarrollaron un protocolo para visualizar y analizar la estructura de las OMV's de bacterias Gramnegativas con la técnica de TEM, utilizando como modelo de estudio a *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, en donde las OMV's se presentan como estructuras redondas regulares y uniformes, con una clara apreciación de la membrana externa, de manera que coinciden con las obtenidas a partir de TEM de nuestras cepas *L.a* 008, *L.a.* 012, *L. a.*028 y *L.a.* 029 (**Figura 8 - Figura 9**) (Delgado *et al.*, 2019).

En este estudio realizamos una evaluación cualitativa sobre la presencia de las proteínas contenidas en la membrana de las OMV's. No obstante, gracias al gel SDS-PAGE obtenido que se muestra en la **Figura 14**, se muestran unas bandas tenues con un peso de entre 30 y 80 kDa. Para las cuatro cepas de *L.a.* las bandas

presentaban el mismo tamaño y peso. Existen precedentes de proteínas inmunogénicas encontradas en la membrana de OMV's de bacterias Gramnegativas, con un contenido variable dentro de la membrana de estas estructuras. De acuerdo a un trabajo de Schwechheimer y colaboradores, las bacterias que producen las OMV's son capaces de inducir una respuesta de estrés envoltante en beneficio de la adaptación bacteriana, que puede ser estimulada por diversos factores (Schwechheimer *et al.*, 2013). En 2011, Manning y Kuehn también reportaron proteínas inmunogénicas contenidas en la membrana de OMV's de cepas de *Escherichia coli* patógenas al inducir a la bacteria a tratamiento con péptidos antimicrobianos; al ser constantemente expuesta al tratamiento con polimixina B, la supervivencia a través de las OMV's aumentó considerablemente (Manning & Kuehn, 2011).

En este estudio, demostramos mediante los ensayos de resistencia a ampicilina que las OMV's de *L. adecarboxylata* son capaces de transferir la resistencia a antibióticos a otras bacterias patógenas como *E. coli*. En un estudio realizado por Ciofu y colaboradores se describe el aislamiento *P. aeruginosa* sensible a  $\beta$ -lactámicos obtenida de pacientes con fibrosis quística. La presencia de la  $\beta$ -lactamasa codificada cromosómicamente en las OMV's fue demostrada mediante microscopía electrónica y estudios enzimáticos, convirtiéndolo en el primer reporte de secreción extracelular de  $\beta$ -lactamasa en *P. aeruginosa* empaquetada en las OMV's secretadas por la misma (Ciofu *et al.*, 200). En el caso de este estudio, la envoltura de las OMV's sugiere que la presencia de proteínas  $\beta$ -lactámicas son esenciales para la supervivencia de bacteria (Kim *et al.*, 2020). Por lo tanto, si comparamos esta aseveración con los resultados presentados en el **Gráfico 1**, demostramos que las OMV's secretadas por *L. adecarboxylata* son capaces de conferir la resistencia a antimicrobianos a bacterias que compartan un mismo entorno dentro del hospedero. De manera importante, destacamos que las concentraciones de OMV's deben mantenerse altamente concentradas para lograr conferir exitosamente dicha resistencia.

En el trabajo “Vesículas de membrana externa (OMV) de bacterias gramnegativas: una perspectiva actualizada” realizado por Jan, también se sugiere que las OMV's puede ser reconocida por otras bacterias como un mensajero que fortalece la interacción bacteriana con el hospedero. Esta misma interacción puede ser utilizada para transformar a las bacterias desde su núcleo (Jan, 2017).

Comprender cómo sobreviven las bacterias en entornos hostiles se ha convertido en una parte importante de la comprensión de la patogenia y las defensas bacterianas. La formación de membranas externas bacterianas juega un papel importante en la adaptación a factores estresantes ambientales como el frío, el calor y los antibióticos que conducen a la supervivencia bacteriana. De acuerdo con esta aseveración, la estructura, biogénesis, función y regulación de las OMV's resultaría en una nueva área de investigación en relación con la resistencia a antimicrobianos (Uddin *et al.*, 2020). Aunque las funciones biológicas de los componentes que contienen OMV's se consideran importantes para comprender los mecanismos de la resistencia a los antibióticos, aún falta información sobre la biogénesis de la resistencia a los antibióticos por parte de la OMV's, específicamente de las generadas por *L. adecarboxylata*. Por el momento, el mecanismo ha sido descrito en estudios realizados en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, por mencionar algunos (Jan, 2017). Es por ello por lo que resulta importante descifrar la función de los ácidos nucleicos contenidos en la membrana externa e interna de las OMV's, y cómo promueven la resistencia bacteriana a otras bacterias dentro del sistema del hospedero.

## CONCLUSIONES

- La purificación de las OMV's se logró a homogeneidad para las cuatro cepas de *L. adecarboxylata*.
- Las inmunofluorescencias indirectas permitieron reconocer la unión del anticuerpo de *K. pneumoniae* con las proteínas contenidas en la membrana de las OMV's, presuntivamente inmunogénicas.
- Se determinó que existe mayor crecimiento bacteriano en la cepa de *E. coli* no resistente a ampicilina cuando las concentraciones de OMV's aumentan.
- La capacidad de las OMV's de conferir resistencia a antibióticos a otras bacterias no resistentes es un factor que puede determinar la patogénesis de la enfermedad en pacientes afectados por *L. adecarboxylata*.
- Este es el primer estudio donde se demuestra que la secreción de OMV's de *L. adecarboxylata* es capaz de conferir resistencia a antimicrobianos como la ampicilina a otras bacterias.

## PERSPECTIVAS

- Identificar y determinar cuantitativamente las proteínas contenidas en la membrana externa e interna de las OMV's.
- Elaborar un protocolo de inmunización en un modelo animal para determinar posibles isotipos de inmunoglobulina.
- Profundizar en el estudio de secuencias de ADN y/o ARN o cromosomas circulares que puedan estar contenidos dentro de la membrana externa e interna de las OMV's de *L. adecarboxylata*,

## BIBLIOGRAFÍA

Aarab, A., Saddari, A., Noussaiba, B., Ayyad, A., Messaoudi, S., Amrani, R., Benaissa, E., Ben Lahlou, Y., Maleb, A., & Elouennass, M. (2021). Leclercia adecarboxylata invasive infection in a patient with Hirschsprung disease: A case report. *Annals of medicine and surgery* (2012), 71, 102927. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102927>

Anaya, Elizabeth, Morón, Cecilia, Arias, Patricia, Chauca, Johann, & Román, Raúl. (2008). Evaluación de pruebas de elisa e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra rickettsiosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(3), 336-339. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.253.1286>

Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1612-1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.011>

Burdett, I. D., & Murray, R. G. (1974). Electron microscope study of septum formation in *Escherichia coli* strains B and B-r during synchronous growth. *Journal of bacteriology*, 119(3), 1039–1056. <https://doi.org/10.1128/jb.119.3.1039-1056.1974>

Campos Ortiz, S. (2021). Caracterización molecular de microvesículas secretadas a partir de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompart, C. M., Albertí, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 72(12), 7107–7114. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004>

Caruana, J. C., & Walper, S. A. (2020). Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe - Microbe and Microbe - Host Community Interactions. *Frontiers in microbiology*, 11, 432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>

Cecil, J. D., Sirisaengtaksin, N., O'Brien-Simpson, N. M., & Krachler, A. M. (2019). Outer Membrane Vesicle-Host Cell Interactions. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018>

Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2000). Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 9-13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>

Clancy, J. W., Schmidtman, M., & D'Souza-Schorey, C. (2021). The ins and outs of microvesicles. *FASEB bioAdvances*, 3(6), 399–406. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127>

COFEPRIS. Aviso Preventivo COFEPRIS/CONAVE/23/02/2019/IAAS. <https://www.gob.mx/salud/documentos/aviso-preventivo-por-brote-de-iaas-relacionado-a-leclercia-adecarboxylata>

Collins, S. M., & Brown, A. C. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles as Antibiotic Delivery Vehicles. *Frontiers in immunology*, 12, 733064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733064>

Collins, S. M., & Brown, A. C. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles as Antibiotic Delivery Vehicles. *Frontiers in immunology*, 12, 733064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733064>

Correa Ana Lucía, Mazo Luz María, Valderrama Mónica Patricia, Restrepo Alejandra, & Jaimes Fabián. (2012). Descripción de un brote de bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata* probablemente asociado al uso de viales contaminados de heparina. *Infectio*, 16(2), 117-121. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70065-6](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70065-6)

Delgado, L., Baeza, N., Pérez-Cruz, C., López-Iglesias, C., & Mercadé, E. (2019). Cryo-transmission Electron Microscopy of Outer-inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-negative Pathogenic Bacteria. *Bio-protocol*, 9(18), e3367. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3367>

Dineshkumar, K., Aparna, V., Wu, L., Wan, J., Abdelaziz, M. H., Su, Z., Wang, S., & Xu, H. (2020). Bacterial bug-out bags: outer membrane vesicles and their proteins and functions. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea), 58(7), 531–542. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0026-3>

Engevik, M. A., Danhof, H. A., Ruan, W., Engevik, A. C., Chang-Graham, A. L., Engevik, K. A., Shi, Z., Zhao, Y., Brand, C. K., Krystofiak, E. S., Venable, S., Liu, X., Hirschi, K. D., Hyser, J. M., Spinler, J. K., Britton, R. A., & Versalovic, J. (2021). *Fusobacterium nucleatum* Secretes Outer Membrane Vesicles and Promotes Intestinal Inflammation. *mBio*, 12(2), e02706-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02706-20>

Espinoza Carlos, Cabedo María José, González Belén, & Ramírez Claudia. (2022). *Leclercia adecarboxylata*. *Revista chilena de infectología*, 39(3), 319-320. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182022000200319>

González-Vázquez, M. C., Guerra-Martínez, Á. A., Escobedo-Herrera, B., & Carabarin Lima, A. (2022). Microvesículas bacterianas secretadas y su potencial uso en el desarrollo de vacunas. <http://doi.org/10.5281/zenodo.7425479>

Gould, S. J., & Schaffer, J. E. (2021). Transport and secretion| Exosomes and microvesicles. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Third Edition* (pp. 455-458). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00245-0>

Harris J. R. (2015). Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Archives of biochemistry and biophysics*, 581, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011>

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), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>

Jan, A. T. (2017). Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Frontiers in microbiology*, 8, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>

Kim, J. Y., Doody, A. M., Chen, D. J., Cremona, G. H., Shuler, M. L., Putnam, D., & DeLisa, M. P. (2008). Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *Journal of molecular biology*, 380(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.076>

Kim, S. W., Lee, J. S., Park, S. B., Lee, A. R., Jung, J. W., Chun, J. H., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Seo, J. S., Kim, J. H., Song, J. W., Ha, M. W., Thompson, K. D., Lee, C. R., Jung, M., & Jung, T. S. (2020). The Importance of Porins and  $\beta$ -Lactamase in Outer Membrane Vesicles on the Hydrolysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2822. <https://doi.org/10.3390/ijms21082822>

Kim, S. W., Park, S. B., Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., ... & Jung, T. S. (2018). Outer membrane vesicles from  $\beta$ -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of  $\beta$ -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Scientific reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>

Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological research*, 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>

Lee, J., Kim, O. Y., & Ghoo, Y. S. (2016). Proteomic profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives. *Proteomics. Clinical applications*, 10(9-10), 897–909. <https://doi.org/10.1002/prca.201600032>

Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Frontiers in microbiology*, 9, 1502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01502>

López-Jácome, L. E., Fernández-Rodríguez, D., Franco-Cendejas, R., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, M. D. R., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Ortiz-Brizuela, E., Rojas-Larios, F., Velázquez-Acosta, M. D. C., Mena-Ramírez, J. P., Rodríguez-Zulueta, P., Bolado-Martínez, E., Quintanilla-Cazares, L. J., Avilés-Benítez, L. K., Consuelo-Munoz, S., Choy-Chang, E. V., Feliciano-Guzmán, J. M., Couoh-May, C. A., López-Gutiérrez, E., ... Garza-González, E. (2022). Increment Antimicrobial Resistance During the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar

Network. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 28(3), 338–345. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0231>

Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. BMC microbiology, 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>

Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature, 437(7057), 422–425. <https://doi.org/10.1038/nature03925>

Matsuzaka, Y., & Yashiro, R. (2022). Advances in Purification, Modification, and Application of Extracellular Vesicles for Novel Clinical Treatments. Membranes, 12(12), 1244. <https://doi.org/10.3390/membranas12121244>

Mozaheb, N., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2020). Membrane Vesicle Production as a Bacterial Defense Against Stress. Frontiers in microbiology, 11, 600221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology spectrum, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Nguyen, H. T., O'Donovan, L. A., Venter, H., Russell, C. C., McCluskey, A., Page, S. W., Trott, D. J., & Ogunniyi, A. D. (2021). Comparison of Two Transmission Electron Microscopy Methods to Visualize Drug-Induced Alterations of Gram-Negative Bacterial Morphology. Antibiotics (Basel, Switzerland), 10(3), 307. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030307>

Novoa-Herrán S. (2021). Challenges and opportunities in the study of extracellular vesicles: Global institutional context and national state of the art. Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud, 41(3), 555–589. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5749>

Park, S., Reyer, M. A., McLean, E. L., Liu, W., & Fei, J. (2019). An improved method for bacterial immunofluorescence staining to eliminate antibody exclusion from the fixed nucleoid. *Biochemistry*, 58(45), 4457–4465. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00724>

Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *Journal of bacteriology*, 187(7), 2286–2296. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2286-2296.2005>

Rueter, C., & Bielaszewska, M. (2020). Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 91. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>

Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F., & Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3084–3090. <https://doi.org/10.1128/AAC.00929-10>

Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annual review of microbiology*, 75, 609–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>

Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews microbiology*, 13(10), 605–619. [10.1038/nrmicro3525](https://doi.org/10.1038/nrmicro3525)

Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., & Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52(18), 3031–3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>

Shaikhain, T., Al-Husayni, F., Al-Fawaz, S., Alghamdi, E. M., Al-Amri, A., & Alfares, M. (2021). *Leclercia adecarboxylata* Bacteremia without a Focus in a Non-Immunosuppressed Patient. *The American journal of case reports*, 22, e929537. <https://doi.org/10.12659/AJCR.929537>

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

Spiegelhauer, M. R., Andersen, P. F., Frandsen, T. H., Nordestgaard, R. L. M., & Andersen, L. P. (2019). *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Infectious diseases (London, England)*, 51(3), 179–188. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1536830>

Tamura, K., Sakazaki, R., Kosako, Y., & Yoshizaki, E. (1986). *Leclercia adecarboxylata* gen. nov., comb. nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. *Current Microbiology*, 13, 179-184.

Ultee, E., Ramijan, K., Dame, R. T., Briegel, A., & Claessen, D. (2019). Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria. *Advances in microbial physiology*, 74, 97–141. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.02.001>

Uddin, M. J., Dawan, J., Jeon, G., Yu, T., He, X., & Ahn, J. (2020). The Role of Bacterial Membrane Vesicles in the Dissemination of Antibiotic Resistance and as Promising Carriers for Therapeutic Agent Delivery. *Microorganisms*, 8(5), 670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050670>

Van der Pol, L., Stork, M., & Van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology journal*, 10(11), 1689-1706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>

Villageliu, D. N., & Samuelson, D. R. (2022). The Role of Bacterial Membrane Vesicles in Human Health and Disease. *Frontiers in microbiology*, 13, 828704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.828704>

Zayet, S., Lang, S., Garnier, P., Pierron, A., Plantin, J., Toko, L., ... & Gendrin, V. (2021). *Leclercia adecarboxylata* as emerging pathogen in human infections: Clinical features and antimicrobial susceptibility testing. *Pathogens*, 10(11), 1399. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111399>

## ANEXOS

**XLVII CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**, organizado por la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C., del 24 al 27 de mayo de 2023. WTC Veracruz, Ver. México. Modalidad de trabajos libres de la categoría “Trabajo de Investigación”. Tema: MICROVESÍCULAS BACTERIANAS SECRETADAS Y SU IMPORTANCIA EN LA MULTIDROGORRESISTENCIA

**CVIII REUNION DE LA ASOCIACION MEXICANA DE PROFESORES DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA 2023 “Dr. Malagón” y el XIX Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología**, organizado por la Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C., del 20 al 22 de abril de 2023 en la modalidad presentación oral, “Identificación de proteínas inmunogénicas asociadas a OMVs e involucradas en la patogenicidad de *Leclercia adecarboxylata*” en la categoría de Investigación básica y clínica. Se obtuvo el **3er lugar** en la Presentación Oral (Modalidad – Pregrado – Investigación Básica y Clínica).

**II COLOQUIO DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**, organizado por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, el día 27 de enero de 2023 en la modalidad cartel, “Identificación de Proteínas asociadas a Microvesículas e involucradas en la patogénesis de *Leclercia adecarboxylata*”.

**XL CONGRESO INTERAMERICANO DE INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA “Dr. Raúl Romero Cabello”**, organizado por La Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica A.C., del 17 al 19 de noviembre de 2022, Guadalajara, Jal. México. En la modalidad de trabajos libres, “*Leclercia adecarboxylata* es capaz de secretar microvesículas con componentes inmunogénicos”.