



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROVESÍCULAS SECRETADAS A  
PARTIR DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA



PRESENTA:

C. SARAHÍ CAMPOS ORTIZ

DIRECTOR:

Dr. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

CO-DIRECTOR:

Dra. PATRICIA LOZANO ZARAÍN

Diciembre 2021.



## **Agradecimientos**

Al Dr. Alejandro Carabarán Lima mi más amplio agradecimiento por toda su enseñanza, por abrirme las puertas del laboratorio y haberme compartido de su conocimiento de manera generosa, así como por su tiempo y dedicación para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Patricia Lozano Zaráin, gracias por su participación y apoyo como codirectora de este trabajo.

A la Dra. María Cristina González Vázquez, gracias por su disponibilidad y guía durante este tiempo, gracias por brindarme apoyo en todo lo necesario.

A la Mtra. Elda Carreón Moreno gracias por su apoyo y participación para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio por su tiempo compartido durante esta estancia.

A mis amigos por todos los buenos momentos que pasamos durante mi vida universitaria.

A mis padres, quienes me han guiado con amor durante todo este tiempo y me han apoyado incondicionalmente para terminar este proyecto de vida con mucha paciencia.

A mi familia por siempre creer en mí ya que este trabajo no habría sido posible sin ustedes, les agradezco su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A la Dra. Abigail Martínez Torres coordinadora de la Licenciatura por todo su apoyo durante la licenciatura.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo financiero otorgado en becas de investigación dentro de los programas “Haciendo Ciencia en la BUAP”.

Este proyecto recibió financiamiento por parte de VIEP-BUAP con número 100522577-VIEP2019 y 100031833-VIEP2021.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser mi *alma mater*, brindarme los mejores años de mi vida y darme la oportunidad, conocimientos e interés de generar este proyecto.

*A mis padres:*

*Francisco Campos Moreno y María del Rocío Ortiz Polo*

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Agradecimientos .....	2
Índice .....	4
Índice de tablas .....	6
Índice de figuras .....	6
Glosario de abreviaturas .....	7
Resumen .....	9
Capítulo 1. Introducción .....	10
1.1 Generalidades de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
1.2 Patogénesis .....	11
1.3 OMVs y su papel como un factor de virulencia .....	14
1.3.1 Generalidades de las OMVs .....	14
1.3.2 Participación de las OMVs en patogénesis .....	17
1.3.3 Biogénesis .....	20
2. Antecedentes .....	21
3. Justificación .....	22
4. Hipótesis .....	22
5. Objetivos .....	23
5.1 Objetivo General .....	23
5.2 Objetivos Específicos .....	23
Capítulo 2. Materiales y métodos .....	23
2.1 Resembrado de cepas de aislados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> y cepa tipo ..	23
2.2 Expresión de OMVs .....	24
2.3 Purificación de OMVs por centrifugación diferencial y filtración en membranas de nylon .....	24

2.4 Obtención del cargo asociado a OMVs mediante tratamiento con buffer RIPA.....	25
2.5 SDS-PAGE con el extracto de las OMVs y extractos totales bacterianos ..	25
2.5.1 Extractos totales bacterianos .....	25
2.5.2 Preparación de las muestras .....	25
2.6 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Realización de Western Blot .....	25
2.7 Obtención de DNA aislado de OMVs por método de extracción CTAB modificado descrito por Wilson (1987) .....	26
2.8 Ensayo de fluorescencia directa (FD) .....	27
Capítulo 3. Resultados .....	27
3.1 Expresión y purificación de OMVs .....	28
3.1.2 Purificación de OMVs .....	28
3.2 Perfil proteico de OMVs en 1D SDS-PAGE .....	28
3.3 Western blot e identificación de proteínas inmunogénicas .....	29
3.3.2 Inmunoanálisis de proteínas obtenidas de OMVs .....	30
3.4 Identificación de ADN en OMVs de <i>K. pneumoniae</i> .....	31
3.5 Análisis de proteínas de OMVs y su posible presencia en OMVs de <i>K. pneumoniae</i> .....	34
Capítulo 4. Discusión .....	43
Capítulo 5. Conclusiones .....	48
Perspectivas .....	49
Anexos .....	49
Referencias .....	50

## Índice de tablas

Número de tabla	Título	Página
1	Características de los aislados clínicos	23
2	Determinación presuntiva de proteínas localizadas en el cargo de OMVs de <i>K. pneumoniae</i>	34
3	Proteínas frecuentemente encontradas en OMVs de bacterias gram negativas y que están presentes en el genoma de <i>Klebsiella</i> .	38

## Índice de figuras

Número de figura	Título	Página
1	Representación de la estructura y contenido de una OMV de una bacteria gram negativa.	15
2	OMVs como sistema de secreción tipo cero.	19
3	Tinción de gram de OMVs.	28
4	SDS-PAGE de proteínas de OMVs.	29
5	Ensayo de Western blot.	30
6	Electroforesis del DNA obtenido a partir de OMVs de <i>K. pneumoniae</i>	31
7	Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa <i>ATCC700603</i>	32
8	Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa <i>KpBUAP021</i>	33
9	Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa <i>KpBUAP03</i>	33
10	Representación esquemática de la estructura y contenido de las OMVs de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	47

## Glosario de abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI-2	Autoinductor-2
ARN	Ácido Ribonucleico
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/Nitroazul de tetrazolio
CAP	Neumonías adquiridas en la comunidad
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DF	Fluorescencia Directa
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
H	Hora
HAP	Neumonías adquiridas en el hospital
Hrs	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
K. pneumoniae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LT	Enterotoxina termolábil
M	Molar
Min	minutos

ml	mililitro
mM	milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
Nm	Nanómetros
OmpA	Outer membrane protein A
OMPs	Outer membrane proteins
OMV	Vesícula de membrana externa/ microvesícula
OMVs	Vesículas de membrana externa/ microvesículas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SDS	Dodecilsulfato sódico
Subsp	Subespecie
T0SS	Sistema de secreción tipo 0
T6SS	Sistema de secreción tipo VI
TAE	Tris-acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trisaminometano
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
V	Volts
VAP	Neumonía asociada a ventilador

## Resumen

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria gram negativa de distribución mundial que causa un grave problema en el entorno clínico, los aislados clínicos suelen ser resistentes a múltiples fármacos generando la principal causa de mortalidad entre las infecciones nosocomiales. Las microvesículas (OMVs), que comúnmente son secretadas por bacterias gram negativas, pueden regular varias funciones durante la patogénesis bacteriana, además de que la expresión de OMVs podría desempeñar un papel clave en la virulencia. Para *K. pneumoniae* poco es conocido acerca de la producción de OMVs, por lo que en este estudio se realizó una caracterización molecular de OMVs secretadas por aislados clínicos. Las OMVs fueron purificadas por centrifugación diferencial observando una morfología esférica y homogénea en las muestras con diferente cantidad de OMVs expresadas de los aislados clínicos, en comparación con la cepa tipo. En este trabajo también se determinó el cargo proteico de manera parcial asociado a las OMVs, se obtuvo un perfil proteico a través de la técnica de SDS-PAGE en donde se observan bandas diferenciales en cada una de las muestras que difieren incluso con los extractos proteicos totales bacterianos. A través de la técnica de Western blot se realizó un inmunoanálisis identificando dos bandas inmunogénicas presentes en las OMVs de las cepas ATCC700603 y KpBUAP021, estas proteínas con peso molecular de ~135kDa y ~48kDa presuntamente fueron identificadas, a través de un metaanálisis, como RpoC y OmpA. De igual manera, a través de técnicas de purificación de DNA y microscopía de epifluorescencia se determinó la presencia de DNA total asociado a OMVs con alto peso molecular, el cual se visualizó a través de una fluorescencia directa con DAPI, la intensidad de la fluorescencia no difirió entre las tres muestras estudiadas. Al realizar un análisis *in silico* se determinaron 12 proteínas presentes en el cargo de las OMVs con diversas funciones algunas de las cuales están asociadas a virulencia y 50 proteínas frecuentemente encontradas en OMVs de bacterias gram negativas presentes en el genoma de *Klebsiella*.

## Introducción

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es anaerobia facultativa con forma de bastón, no móvil, capsulada, y puede causar un amplio rango de enfermedades en humanos, es causa frecuente de infecciones nosocomiales como neumonía típica en forma de bronconeumonía y bronquitis, también puede causar infecciones en el tracto urinario, tejidos blandos y sitios de heridas quirúrgicas. *K. pneumoniae* obtiene acceso al tracto respiratorio inferior después de que una persona aspira el microorganismo, coloniza la mucosa orofaríngea y puede causar cambios en los pulmones provocados por la inflamación y hemorragia. Se encuentra en la microbiota normal residente de la boca, piel e intestino, de igual manera se puede encontrar en el ambiente como en alimentos, suelo, superficie del agua o ambientes hospitalarios (Bialek-Davenet et al., 2014; W. H. Lee et al., 2015; Pope et al., 2019).

*K. pneumoniae* se aisló por primera vez en 1888, conocida inicialmente como la bacteria de Friedlander (Paczosa & Mecsas, 2016), considerado un patógeno oportunista ya que las infecciones por esta bacteria se observan principalmente en personas con un sistema inmunológico debilitado y, por lo tanto, causa una alta tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%, incluso con terapias antimicrobianas (W. Lee et al., 2015; J. C. Lee et al., 2012). Sin embargo, también puede causar infecciones graves en individuos sanos, estas cepas se consideran hipervirulentas en comparación con las cepas de *K. pneumoniae* clásicas, debido a su capacidad de infectar tanto poblaciones sanas como inmunocomprometidas y debido a la tendencia creciente de estas infecciones a ser invasivas (Paczosa & Mecsas, 2016).

Los aislados clínicos de *K. pneumoniae* son generalmente resistentes a múltiples fármacos, agentes antimicrobianos y causan un grave problema en el entorno clínico, señalada por la Organización Mundial de la Salud como una “amenaza urgente para la salud humana”(J. C. Lee et al., 2012; Storey et al., 2020). Este microorganismo puede transferirse a través de equipos médicos y productos sanguíneos en parte, debido a sus fimbrias que le ayudan en su adhesión a estos dispositivos (Moradigaravand et al., 2017). Una ruta frecuente de adquisición de neumonías por *K. pneumoniae* es a través de la intubación endotraqueal, lo que aumenta el riesgo de contraer neumonía asociada a ventilador (VAP), una forma de

neumonía nosocomial que se desarrolla al menos 48 horas después de la intubación. La inserción de un catéter es otro medio para iniciar una infección, donde el implante permite un punto de entrada al tracto urinario, así como un sustrato en el que *K. pneumoniae* puede formar biopelículas (Paczosa & Meccas, 2016).

### **Patogénesis**

Las cepas clásicas de *K. pneumoniae* tienen una distribución mundial. Las infecciones primarias más comunes causadas por cepas clásicas suelen ser neumonías o infecciones urinarias, sin embargo, también pueden causar otras infecciones muy graves, como bacteriemia. Las neumonías por *K. pneumoniae* se pueden dividir en dos categorías: neumonías adquiridas en la comunidad (CAP) y neumonías adquiridas en el hospital (HAP), siendo *K. pneumoniae* HAP mucho más frecuentes que *K. pneumoniae* CAP. HAP se define como una neumonía similar a otras neumonías nosocomiales, infectando hospederos inmunocomprometidos incluidos pacientes con cáncer, diabéticos, o enfermedades crónicas del hígado, que se presenta alrededor de 48 horas después del ingreso a un hospital en personas que no presentaban síntomas de neumonía antes del ingreso, con cepas que tienen una mayor probabilidad de ser resistentes a múltiples fármacos, generando la principal causa de mortalidad entre las infecciones nosocomiales (Paczosa & Meccas, 2016). *K. pneumoniae* produce una cápsula de polisacárido para protegerse de los mecanismos inmunológicos del hospedero. Esta cápsula ayuda a reducir la adherencia a las células fagocíticas causando una resistencia a la lisis mediada por complemento (Palacios, 2017). Los pacientes con factores de riesgo, tienen en común la supresión del sistema inmune innato, causando un defecto en la respuesta contra la bacteria y contribuyendo al aumento de la morbilidad y mortalidad. Otras poblaciones en riesgo de infección son los recién nacidos y los ancianos. Los recién nacidos, particularmente aquellos que son prematuros o que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos, están en riesgo debido a las defensas inmunes inmaduras, la falta de microbiota establecida y la permeabilidad relativamente alta de la mucosa en el tracto gastrointestinal en estas poblaciones (Paczosa & Meccas, 2016).

La capacidad de *K. pneumoniae* para causar infecciones se debe a una serie de mecanismos moleculares de patogenicidad implicados en la evasión del sistema inmune y la invasión tisular. Entre ellos, se encuentran las adhesinas que ayudan al microorganismo a establecer

una infección, principalmente, fimbrias del tipo 1 y 3. Las fimbrias del tipo 1 están formadas por subunidades repetidas de la proteína FimA con la molécula adhesina FimH, Fim H tiene afinidad de unión por los residuos de manosa (manosa sensibles) y las fimbrias tipo 3 (manosa resistentes) se constituyen por subunidades de MrkA con la adhesina MrkD fundamentales en la formación de biopelículas. Tanto las fimbrias del tipo 1 como las del tipo 3 promueven la adhesión a células eucariotas favoreciendo una colonización exitosa (Gomes et al., 2021; Hsieh et al., 2019; Vuotto et al., 2017).

Otros mecanismos son los factores mediados por polisacáridos capsulares. *K. pneumoniae* puede presentar el polisacárido capsular antifagocítico que rodea a la envoltura celular (Vuotto et al., 2017; J. C. Lee et al., 2012.) este es uno de los factores más importantes ya que protege al microorganismo contra una actividad bactericida por parte del sistema inmune. Adicionalmente tienen sistemas de secreción especializados, se ha demostrado la presencia del sistema de secreción tipo VI (T6SS) (Hsieh et al., 2019), el T6SS es un complejo transmembranal en el cual se translocan efectores al hospedero, este juega un papel clave en la colonización y se encuentra codificado en un grupo de genes llamados *tssA-M* que codifican para proteínas estrechamente relacionadas con los componentes de un bacteriófago contráctil, formando un dispositivo de punción celular (Storey et al., 2020). Sistemas de detección de Quorum, la detección de quorum es un sistema de comunicación de célula a célula que permite a las bacterias regular las funciones biológicas en respuesta a cambios de densidad poblacional, actuando como un mecanismo de adaptación al ambiente, *K. pneumoniae* presenta un sistema de quorum tipo 2 en donde las moléculas de señalización se conocen como AI-2 (autoinductor-2) y que a diferencia del tipo 1, es muy específico para la comunicación entre especies, una vez alcanzado el umbral crítico de AI-2 se desencadena una cascada de transducción de señales dando como resultado una expresión poblacional de genes diana y la consecuente alteración en la fisiología bacteriana relacionada con la virulencia, secreción de proteínas, producción extracelular de polisacáridos, adquisición de hierro, motilidad y formación de biopelículas. *K. pneumoniae* también tiene la capacidad para formar biopelículas que la protegen de la respuesta inmune del hospedero, esta matriz inhibe la proximidad de anticuerpos y péptidos antimicrobianos reduciendo los efectos del complemento y fagocitosis, se ha descrito que la lipoproteína YfgL (BamB) está involucrada

en la formación de biopelículas, mecanismo crucial para mantener su actividad (L. Chen et al., 2020; Vuotto et al., 2017; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Dentro de los mecanismos para alterar el sistema inmunológico, se encuentra naturalmente la presencia de LPS en bacterias, la modificación de la estructura es un mecanismo para mejorar su virulencia y supervivencia, la porción del antígeno O se encuentra en las orillas de las cadenas de polisacáridos, estos representan una familia de moléculas compuestas por subunidades repetidas de carbohidratos unidas al antígeno central, es común que afecte la estabilidad de la pared celular y que interactúen con el complemento. Se han identificado 7 grupos de antígeno O para *K. pneumoniae* siendo el antígeno O1 uno de los serotipos clínicamente más frecuentemente aislados (Cahill et al., 2015; Follador et al., 2016; Paczosa & Meccas, 2016); se han identificado otros factores de virulencia para *K. pneumoniae* como endotoxinas, polisacáridos, sideróforos y colibactina (Follador et al., 2016; J. C. Lee et al., 2012.)

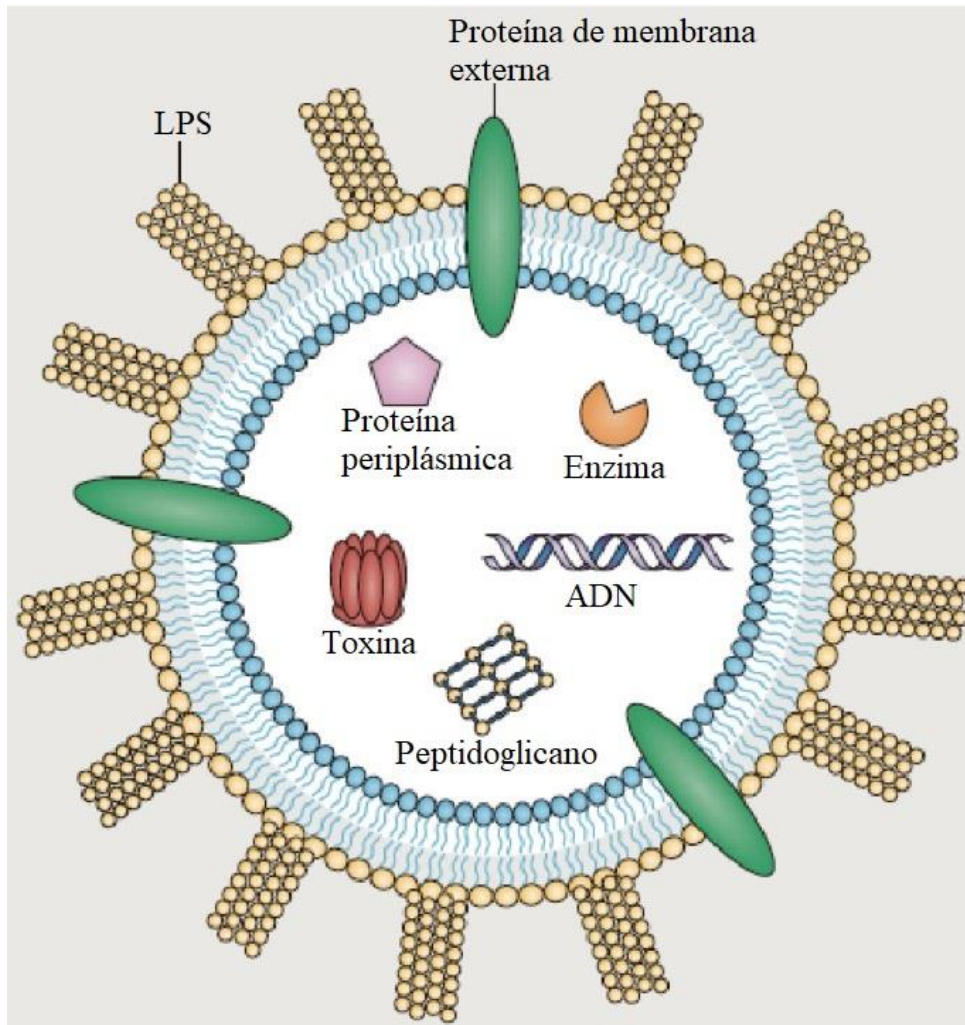
Relacionado a los diferentes mecanismos de virulencia, se ha reportado que un complejo tóxico extracelular es responsable del daño pulmonar y que la citotoxicidad de la célula huésped está asociada con el polisacárido capsular, ya que las cepas expresando diferentes niveles de cápsula no son igualmente virulentas. También se ha mostrado que la citotoxicidad de las células epiteliales no está directamente relacionada con la adherencia bacteriana a las células huésped. Estos resultados sugieren que elementos bacterianos adicionales liberados o secretados por las bacterias, junto con el polisacárido capsular, están involucrados en la patogénesis de *K. pneumoniae*. Se especula que el complejo citotóxico extracelular puede ser la secreción de OMVs (J. C. Lee et al., 2012).

Para que *K. pneumoniae* cause infección, tiene que superar las barreras mecánicas, así como las defensas inmunes innatas y adaptativas. Las primeras defensas que los patógenos encuentran en el tracto respiratorio es el *mucus* que es expulsado a través del revestimiento ciliar. Del mismo modo en el tracto genitourinario, el flujo de orina junto con el pH bajo elimina a los patógenos. Una vez que *K. pneumoniae* pasa estas barreras mecánicas iniciales, debe superar las defensas innatas y celulares adaptativas. La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* parecen ser resistentes a la lisis mediada por el complemento, así como a la opsonofagocitosis. En los pulmones, los primeros efectores celulares innatos encontrados son

los macrófagos alveolares residentes, que tienen capacidades fagocíticas y median la amplificación y/o resolución de las respuestas inmunes a través de la producción de quimiocinas y citocinas. Cuando *K. pneumoniae* establece una infección, los neutrófilos son reclutados a los tejidos infectados, gracias a las quimiocinas y las citocinas producidas por los macrófagos durante la infección, estas incluyen a la citocina IL-8 así como las quimiocinas CXCL1, leucotrieno B4 y las proteínas del complemento. Los modelos de infección pulmonar en ratones han demostrado que las células epiteliales alveolares influyen en la inflamación a través de la síntesis y secreción de los componentes C2, C3, C4 y C5 del sistema del complemento iniciando la quimiotaxis de leucocitos (neutrófilos), la activación de fagocitos y la opsonización de bacterias inicia ayudando a controlar la infección (Broug-Holub et al., 1997; Paczosa & Meccas, 2016). *K. pneumoniae* puede activar las vías clásica, alternativa y complementarias de lectina del complemento. El LPS es el principal medio de protección de la bacteria contra el complemento, las cepas resistentes al complemento activan la cascada del complemento, pero no son susceptibles de muerte debido a la porción de antígeno O de LPS. El antígeno O protege contra C3 mediante la unión de C3b, un componente del complemento que es tanto una opsonina como parte del proceso de formación de poros, LPS se compone de 3 unidades principales, el lípido A que se une a la membrana, un centro de oligosacáridos y el antígeno O que es la subunidad más externa anulando la lisis bacteriana por la formación de poros (Paczosa & Meccas, 2016).

### **OMVs y su papel como un factor de virulencia**

Las microvesículas o vesículas de la membrana externa, OMV por sus siglas en inglés, son agrupaciones esféricas de dos capas de la membrana externa con contenido periplásmico, lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, lípidos ADN, ARN e incluso proteínas citoplasmáticas (Figura 1) (J. C. Lee et al., 2012; W. H. Lee et al., 2015; Schwechheimer & Kuehn, 2015) que comúnmente son producidas por bacterias gram negativas las cuales brotan y se desprenden de la célula durante el crecimiento activo. Las OMVs miden entre 20 y 250 nm de diámetro y se ha observado que todos los tipos de bacterias gram negativas las producen, se han encontrado tanto en bacterias patógenas como no patógenas, en una gran variedad de entornos como biopelículas y dentro de células eucariotas (Schwechheimer & Kuehn, 2015).



**Figura 1.** Representación de la estructura y contenido de una OMV de una bacteria gram negativa. (Imagen modificada obtenida de Kaparakis-Liasko & Ferrero, 2015).

La composición proteica de las OMVs se puede agrupar en 3 categorías, componentes básicos de la membrana externa, entre las cuales se encuentran porinas, parte de proteínas de otros sistemas de transporte, adhesinas que median la unión de las OMVs a las células diana, enzimas como fosfolipasas, proteasas, proteínas de flagelo o pili; las proteínas de carga específicas del lumen o interior de la estructura celular; entre las cuales se encuentran toxinas y enzimas como proteasas y ureasas; y por último, las proteínas desconocidas o contaminantes que pueden incluir varias proteínas citoplasmáticas o de membrana interna. La composición lipídica en el cargo de las OMVs es similar a los componentes lipídicos de

la membrana externa y puede incluir fosfolípidos y lipopolisacáridos (van der Pol et al., 2015).

Se ha descubierto que la secreción de OMVs permite a las bacterias interactuar con su entorno y ayuda en la comunicación celular (Schwechheimer & Kuehn, 2015). También se han identificado toxinas activas y factores de virulencia en el cargo molecular de las OMVs producidas por bacterias gram negativas patógenas, incluidas toxinas termolábiles. Los factores de virulencia y otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como porinas de membrana, flagelinas y peptidoglicanos empaquetados en las OMVs, pueden inducir la patología en la célula huésped (J. C. Lee et al., 2012). Además, se ha sugerido que funcionan como un sistema de entrega a larga distancia de componentes específicos, protegiendo sus moléculas asociadas de la dilución y degradación, su membrana ayuda como una barrera que impide el acceso de proteasas extracelulares, del mismo modo regulan diversas funciones incluyendo la patogénesis, pueden administrar y apoyar a la transferencia de factores de virulencia y toxinas, modular el sistema inmunitario del huésped, realizar modificaciones de la superficie y eliminación de componentes no deseados (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Turner et al., 2016). Otra función es la de actuar como señuelos que se unen y eliminan anticuerpos y otros componentes bactericidas (Turner et al., 2016). También proporcionan soporte estructural en entornos de múltiples especies (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Por otra parte, ayudan también en la adquisición de nutrientes y protección del nicho ecológico, contribuyendo a crear un microambiente adecuado para la supervivencia o crecimiento del patógeno en condiciones de estrés, por lo tanto, aumentan la persistencia en los hospederos o el suelo y regulan las interacciones microbianas (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Turner et al., 2016).

Además, también pueden ayudar a las bacterias en la defensa contra los antibióticos, ya que la producción de OMVs parece diluir el efecto dañino del agente perturbador, proporcionándole protección inmediata mucho antes de que pueda adaptarse, modificando o mutando el blanco de los antibióticos (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Turner et al., 2016). Asimismo, dentro de las OMVs se pueden encontrar genes y proteínas que pueden conferir resistencia, por ejemplo, se ha reportado la presencia de  $\beta$ -lactamasas en OMVs de modo que la enzima puede inactivar el fármaco, una vez que la enzima inactiva el fármaco, reduce

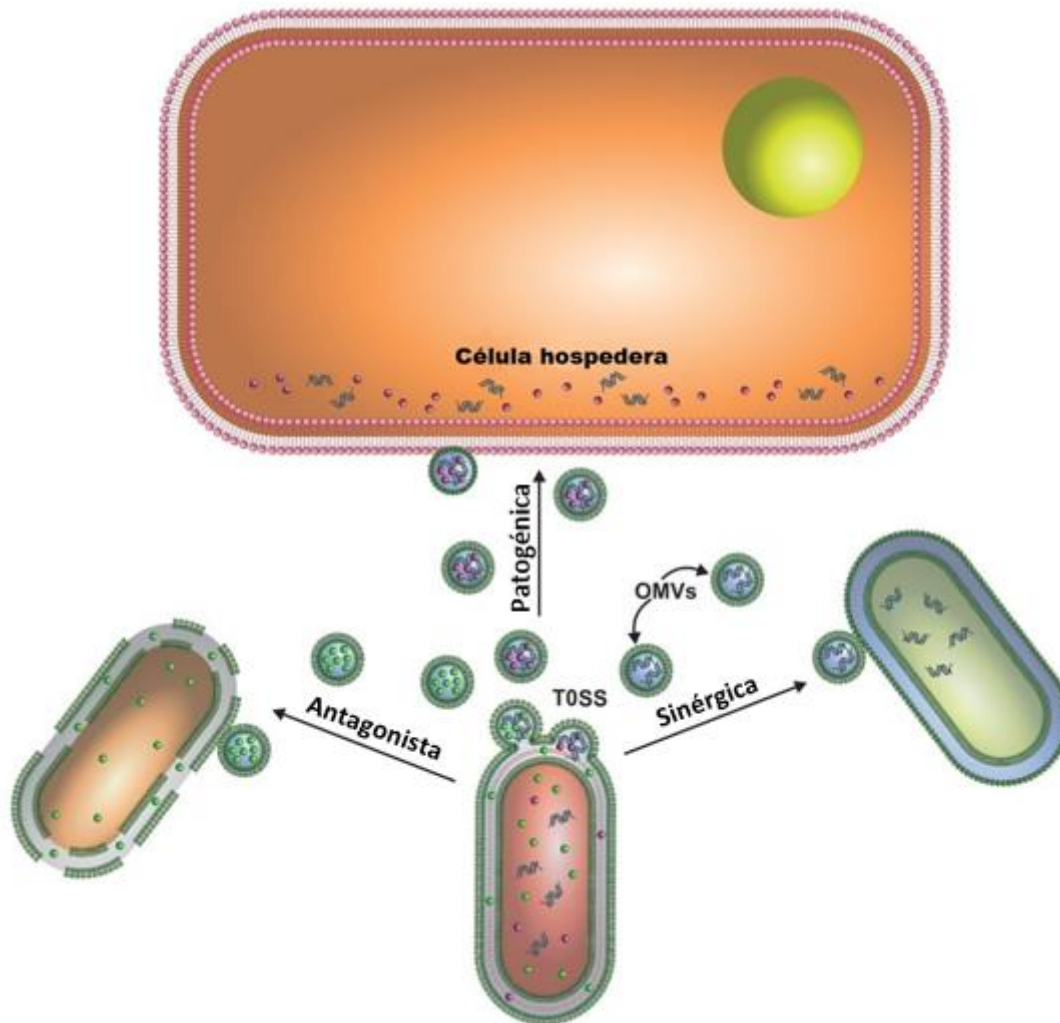
efectivamente la concentración de antibiótico, del mismo modo, se ha reportado que al estar presente gentamicina en el ambiente bacteriano se aumenta el número de OMVs liberadas (Ciofu et al., 2000). Se han reportado también OMVs con ADN lineal y cromosómico que incluyen plásmidos, uno de los cuales porta genes de resistencia a la penicilina así como ARN (Dorward et al., 1989). Otro medio de protección contra antibióticos se puede deber a que las OMVs actúan como vectores de transporte de DNA, transfiriendo genes entre bacterias. La incubación de OMVs de *Escherichia coli* que portaban genes de resistencia a Ampicilina y pGFP al estar en contacto con una cepa sin estas características resultó en la transferencia de estos genes (Turner et al., 2016; Yaron et al., 2000). La protección contra bacteriófagos es posible mediante la captura e inactivación de partículas de virus. También se ha demostrado que inhiben la fusión de fagosoma-lisosoma de macrófagos, modifican la secreción de la célula huésped y estimulan respuestas inflamatorias intensas, lo que puede llevar a la intoxicación y muerte celular (Turner et al., 2016). Así mismo, queda la posibilidad de que las OMVs se liberen a veces por razones fisiológicas como consecuencia de un desequilibrio entre el crecimiento celular y la síntesis de la membrana externa liberando el material en exceso de la membrana (van der Pol et al., 2015).

### **Participación de las OMVs en patogénesis**

La participación de las OMVs en la patogénesis ha sido demostrada en una gran cantidad de bacterias gram negativas. Desde la colonización de sus nichos biológicos, deterioro de la función de la célula del hospedero, hasta modulación de la defensa del hospedero, por lo que contribuyen significativamente en la virulencia bacteriana (Rueter & Bielaszewska, 2020). Uno de los factores de virulencia mas importantes en *Acinetobacter baumannii* es la porina de membrana externa denominada OmpA. Este microorganismo utiliza a las OMVs como mecanismo de administración para dirigir a OmpA a las mitocondrias de las células del hospedero e inducir fragmentación mitocondrial en macrófagos alveolares y citotoxicidad (Tiku et al., 2021). También se ha sugerido que las OMVs funcionan como un factor de virulencia al permitir la formación de biopelículas y prevenir la degradación del eDNA como es el caso de *Helicobacter pylori*, sus OMVs presentan dos RNAs pequeños que pudieran tener un efecto funcional sobre el RNA mensajero de la IL-8 humana, presentando un papel directo con la respuesta inmune del hospedero. Se han identificado mas de 500 proteínas

diferentes en las OMVs de *Helicobacter pylori*, involucradas en diversos mecanismos de virulencia, en la unión de ácido siálico, proteínas de motilidad, proteínas implicadas en el ensamblaje de flagelos, de resistencia a ácidos como ureasa importante para amortiguar el ambiente ácido del patógeno, evasión, como KatA implicada en la protección de bacterias ante ROS, VacA que induce la formación de fagosomas y apoptosis a través de daño mitocondrial encontrando el 25% de VacA proveniente de las OMVs, proteínas de modulación inmunológica y secreción siendo estas un 32.3% de proteínas asociadas a adherencia (Jarzab et al., 2020).

En *Escherichia coli* se ha demostrado que las OMVs ayudan a inducir miocardiopatía asociada a sepsis y coagulación intravascular diseminada en el hospedero, el LPS asociado a OMVs se une a los receptores tipo Toll TLR4 y TLR2 principalmente, para posteriormente activar la vía de señalización del inflammasoma no canónico. Un estudio demostró que la flagelina y LPS son los componentes clave que inducen la secreción de la citocina IL-8; como en muchos otros patógenos se han identificado muchos factores de virulencia que utilizan las OMVs como una vía secretora alternativa, sin embargo, algunas toxinas como ClyA de EHEC, la toxina de distensión citoletal V de EHEC, enterotoxina Shigella 1 y la enterotoxina termolábil (LT) de ETEC, parecen utilizar exclusivamente a las OMVs como vías secretoras. Se ha demostrado que toxinas presentes en OMVs de EHEC son endocitadas y transportadas a endosomas tempranos y tardíos, en este punto las toxinas se separan de las OMVs y transportan a sus dianas celulares deteniendo el ciclo celular G2, causando apoptosis en células endoteliales microvasculares y epiteliales intestinales humanas (Rueter & Bielaszewska, 2020). Las OMVs también se han considerado recientemente como un nuevo sistema de secreción independiente de tipo 0 (T0SS) (Figura 2). Las OMVs brindan ventajas únicas frente a otros sistemas de secreción al poder transportar biomoléculas como enzimas, toxinas, determinantes antígenicos y ácidos nucleicos en altas concentraciones y llevarlas a diferentes destinos a largas distancias (Guerrero-Mandujano et al., 2017; Rueter & Bielaszewska, 2020).



**Figura 2.** OMVs como sistema de secreción tipo cero. Múltiples roles del sistema de secreción tipo cero; función patogénica, sinérgica y antagonista (Imagen modificada obtenida de Guerrero-Mandujano et al., 2017)

Otro estudio realizado en *Helicobacter pylori* mostró que las OMVs pueden inducir la expresión de oncostatina M, una de la citocinas IL-6, y su receptor de tipo II en células de adenocarcinoma, por lo tanto, se sugiere que pueden promover carcinogénesis (Zoaiter et al., 2021). Se ha reportado también que las OMVs producidas por *Porphyromonas gingivalis* contribuyen en la comunicación con otras bacterias orales, ayudan en la formación de biopelículas, le permiten internalizarse en las células del hospedero y promueven la formación de un ambiente inflamatorio a través de moléculas biológicamente activas que incitan la producción de citocinas proinflamatorias por el hospedero, supresión de angiogénesis, deterioro celular, destrucción del tejido conectivo y resorción ósea alveolar

formando las características clínicas de la periodontitis crónica. A través de la entrega de moléculas a larga distancia por las OMVs también pueden alcanzar órganos blanco distantes e inducir enfermedades sistémicas relacionadas (Z. Zhang et al., 2021).

### **Biogénesis**

Los niveles de vesiculación pueden verse alterados por diferentes factores como la temperatura, que podría estar favorecida por los componentes de la membrana, la disponibilidad de nutrientes como limitación de aminoácidos, la oxidación, quorum sensing, la absorción de fagos y la administración de antibióticos. Esta producción también es altamente variable entre especies y está influenciado por el ambiente bacteriano (Schwechheimer & Kuehn, 2015; van der Pol et al., 2015). La formación de las OMVs puede describirse como un proceso de gemación que crea vesículas con el exterior de la membrana externa, no se puede dar un mecanismo universal para su formación, sólo una serie de eventos involucrados, que incluyen la ruptura de las conexiones entre la membrana interna y el peptidoglicano, la acumulación de componentes en el espacio periplásmico y la actividad de señales específicas y moléculas efectoras. Se ha demostrado que mutaciones en enzimas involucradas en la degradación del peptidoglicano pueden inducir la producción de OMVs. La formación de OMVs ha sido relacionada con el crecimiento celular en fase exponencial en donde se ha reportado una mayor producción en algunas bacterias, sin embargo, parecen ser liberadas constitutivamente en todas las fases de crecimiento, así como en condiciones normales de crecimiento sin estrés (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015; van der Pol et al., 2015).

Se han sugerido 3 mecanismos de biogénesis de OMVs, en un modelo los fragmentos de peptidoglicano se acumulan en el periplasma, lo que resulta en la generación de turgencia, posteriormente protuberancias de la membrana externa liberan las OMVs. En el segundo modelo, debido a las diferencias en la tasa de renovación de la pared celular y la membrana externa se ocasionan regiones con interacciones de la pared celular y la membrana externa donde puede ocurrir la vesiculación. En el tercer modelo, se ha sugerido que una señal en *Pseudomonas aeruginosa*, la quinolona, puede interactuar con lipopolisacáridos y secuestrar cationes divalentes  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  en la membrana externa dando una repulsión aniónica y la

despolarización de la membrana externa, conduciendo a una formación de una curvatura en la membrana externa y liberación de OMVs (J. Lee et al., 2016).

### **Antecedentes**

*K. pneumoniae* secreta vesículas de membrana externa, las cuales contienen proteínas originadas de la membrana interna y citoplasma, así como de la membrana externa y espacio periplásmico. Se ha demostrado que las OMVs de *K. pneumoniae* no son citotóxicas para las células hospederas, pero producen una respuesta proinflamatoria *in vitro*, sin embargo, inducen cambios patológicos severos en ratones (J. C. Lee et al., 2012). En otro estudio se detectó un aumento de la IgG reactiva a las OMVs de *K. pneumoniae* posterior a la inmunización de ratones (W. H. Lee et al., 2015). Las bacterias gram negativas producen OMVs cargadas de productos génicos asociados con la virulencia y que pueden desencadenar una potente respuesta inflamatoria, el que se encuentre ADN encapsulado en las OMVs presenta ventajas como la protección de exonucleasas, tener una mejor entrega a la célula receptora al presentar componentes de membrana externa (Renelli et al., 2004). Se realizó un estudio que refleja que la pérdida de una proteína de membrana denominada porina genera un cambio en la composición de las OMVs, donde la respuesta de los macrófagos a estas OMVs fue más potente a la membrana externa purificada (Turner et al., 2016).

Aunque *K. pneumoniae* se aisló hace más de 100 años, solo unos pocos factores de virulencia son bien entendidos, así como las defensas críticas del huésped para las infecciones por *K. pneumoniae*. Esto ha cambiado recientemente en respuesta al creciente interés y preocupación con respecto a la resistencia generalizada a antibióticos de *K. pneumoniae* y la aparición y propagación de cepas hipervirulentas (Paczosa & Mecsas, 2016). La cápsula ha sido el factor de virulencia más estudiado en el género *Klebsiella*, sin embargo, aún no se sabe con exactitud la participación de otros factores de virulencia. En los últimos años se ha propuesto la participación de algunos factores de secreción, los cuales, podrían desempeñar un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria a esta infección (Turner et al., 2016) y que ultimamente se les ha reconocido como un sistema de secreción general como: “armas de larga distancia”, que ayudan a mejorar las aptitudes de las bacterias y facilita interacciones en comunidades polimicrobianas e interacciones microorganismo – hopero (Rueter & Bielaszewska, 2020).

## **Justificación**

*Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista que causa enfermedades graves de alta tasa de mortalidad, los aislados clínicos son generalmente multidrogorresistentes aumentando la preocupación con la aparición de cepas hipervirulentas. Aunque esta bacteria se aisló por primera vez en el siglo XIX, pocos factores de virulencia son bien entendidos, generando una creciente necesidad a estudiar estos mecanismos. El campo de investigación sobre OMVs bacterianas es emergente, como lo muestra el exponencial aumento del número de publicaciones, sin embargo, aunque se ha demostrado su participación como un nuevo sistema de secreción con características y ventajas distintivas en otras bacterias gram negativas, aún se desconoce la composición molecular de las OMVs de *Klebsiella pneumoniae*. Este estudio nos puede permitir entender más sobre las OMVs de *Klebsiella pneumoniae*, dar información sobre moléculas relacionadas a los mecanismos de patogenicidad, virulencia, y funciones, así como desempeñar un papel clave como base para entender su biogénesis. Estos mecanismos aún no han sido caracterizados pero su existencia indica que la producción de OMVs no se debe meramente a la liberación al azar y por tanto debe ser estudiado, por lo cual, en este trabajo se pretende evaluar y tener una mejor comprensión de la composición de OMVs que ayudarían como base para estudios futuros sobre otros mecanismos aplicativos que pueden tener los resultados como utilización para vacunas.

## **Hipótesis**

*Klebsiella pneumoniae* es capaz de producir OMVs con un cargo molecular asociado, como proteínas y material genético, que podrían estar involucrados en los mecanismos de patogenicidad y resistencia.

## **Objetivo General**

Aislar y caracterizar las OMVs secretadas a partir de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

### Objetivos específicos

1. Obtener OMVs a partir de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* a través de técnicas de centrifugación diferencial.
2. Examinar mediante la técnica SDS-PAGE bandas de proteínas a partir de las OMVs obtenidas y compararlas con los extractos proteicos totales de los aislados clínicos.
3. Identificar proteínas antigénicas presentes en OMVs mediante la técnica de Western blot.
4. Analizar la presencia de DNA en el interior de las OMVs purificadas a través de microscopia de epifluorescencia y técnicas de purificación de DNA.
5. Realizar un metaanálisis sobre proteínas presentes en las OMVs asociados a resistencia o virulencia y predecir su posible presencia en *Klebsiella pneumoniae*.

### Materiales y métodos

#### Resembrado de cepas de aislados clínicos de *K. pneumoniae* y cepa tipo

Se utilizaron cepas de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* KpBUAP021 y KpBUAP03. Las características de estos aislados clínicos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de los aislados clínicos

Cepa	<i>KpBUAP021</i>	<i>KpBUAP03</i>
No. Cepa México	21	3
Fecha aislamiento	19/037/1998	08/04/1997
Cepa donada por:	Hospital Niño Poblano	Hospital Niño Poblano
Microorganismo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>rinhoescleromatis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subespecie <i>ozanae</i>
Origen	Hemocultivo periférico	Hemocultivo central
Servicio	UCIN	UCIN
Prueba doble disco	POSITIVA. FEP,CTX,CAZ	Negativa
Susceptibilidad	R:AM,PIP,AMC,CAZCTX,FEP,ATM,GM,S,AN,NN,CIP,TE,SXT ; S: IMP,MEM, C	Sensible a los antibióticos solo resistente a Amikacina
Observaciones	BLEE AMPLIFICADA. SHV-2a, TEM-1b NO CONJUGO	SHV

También se utilizó una cepa tipo *K. pneumoniae* ATCC700603. Las cepas de *K. pneumoniae* se cultivaron de manera rutinaria en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB). Se sembraron por estría cruzada, se etiquetaron e incubaron a 37°C por 24 horas en condiciones aerobias, posteriormente se mantuvieron a -70°C en medio LB con 20% de glicerol.

Para la purificación de OMVs, se prepararon matraces con 250 ml de medio LB líquido estéril. El medio se preparó con 1.25 g de extracto de levadura, 2.5g de cloruro de sodio, 2.55g de peptona de caseína. Se resembraron en el medio líquido las cepas *KpBUAP03*, *KpBUAP021* y *K. pneumoniae* ATCC700603.

### **Expresión de OMVs**

Se sembró una asada en 250 ml de medio LB líquido por 48 horas en incubación a 37°C a 120 rpm. Posteriormente, se realizó tinción de gram para OMVs y bacterias a partir del cultivo de medio LB líquido.

### **Purificación de OMVs por centrifugación diferencial y filtración en membranas de nylon**

Se realizó la extracción de OMVs a partir de una serie de centrifugaciones diferenciales a 6000 rpm por 20 min a 4°C, el sobrenadante se volvió a centrifugar a 6000 rpm x 10 min a 4°C. Finalmente, se recuperó nuevamente y se centrifugó a 13500 rpm x10 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se filtró en dos ocasiones a través de membranas de nylon con poros de 40 y 22 micrómetros. Se realizó la precipitación de las OMVs con la adición de acetona fría en una proporción 3:1 y se mantuvo a 4°C por 24 hrs. Se centrifugó por 20 min a 6000 rpm y se descartó el sobrenadante para conservar los extractos de OMVs. A estas OMVs purificadas se les realizó una prueba de esterilidad incubándolas a 37°C durante 24 y 42 hrs.

### **Obtención del cargo asociado a OMVs mediante tratamiento con buffer RIPA**

El buffer RIPA modificado se preparó con NaCl 1M, SDS 0.1%, Tris 50mM pH 7.4, Tween 20 al 20%. Para la obtención de extractos proteicos totales, se tomaron 25 µl de alícuota de OMVs purificadas. Se agregaron 500 µl de buffer RIPA con 5 µl de inhibidores de proteasas

(Roche). Se agito y dejó a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 16 hrs. Se centrifugó a 12000 rpm por 10min, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de acetona fría. Se dejó 12hrs a  $4^{\circ}\text{C}$  para su precipitación. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min y decantó el sobrenadante. La pastilla de proteínas se resuspendió en 50-100  $\mu\text{l}$  de PBS estéril.

## **SDS-PAGE con el extracto de las OMVs y extractos totales bacterianos**

### **Extractos totales bacterianos**

Para obtener los extractos totales bacterianos se sembraron las cepas de *K. pneumoniae* en placas de agar chocolate y se dejaron crecer durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se tomo una asada en 200 $\mu\text{l}$  de PBS estéril y se homogeneizó la muestra, para posteriormente llevar a ebullición.

### **Preparación de las muestras**

Para la preparación de las muestras se tomó una alícuota de 10 $\mu\text{l}$  de extractos proteicos posterior al tratamiento con buffer RIPA y 10 $\mu\text{l}$  de extractos totales bacterianos. Se agregaron 20 $\mu\text{l}$  de buffer de carga y se hirvieron las muestras a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15min.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. La electroforesis se realizó en un sistema BioRad agregando los 15 $\mu\text{l}$  de muestra preparada y migrando en buffer de tris-glicina. Para el corrimiento se utilizaron extractos totales bacterianos y extractos totales de OMVs. La migración electroforética se llevó a cabo a 70 V para el gel concentrador y 110 V para el gel separador. Al término de la separación los geles se tiñeron en azul de Coomassie durante 24 horas en agitación. Finalmente se agregó solución desteñidora de metanol, ácido acético glacial y agua tridestilada durante toda la noche.

### **Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Realización de Western blot**

Las muestras de los extractos se separaron mediante un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio SDS-PAGE en un gel al 12% y fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1h a 100 V, posteriormente la membrana se bloqueó con una solución al 2% de leche en polvo en PBS. Después las muestras se incubaron con los anticuerpos utilizando como anticuerpo primario, anticuerpos contra OMVs de *K. pneumoniae* hechos en ratón a una dilución 1:2000 el cual se dejó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizaron 3 lavados con 20 ml de solución de PBS y tween 20 al 0.05%

en agitación por 10 min y se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000, se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se hicieron 3 lavados con solución de PBS y tween 20 al 0.05% y se realizó el revelado mediante la adición de 1ml de BCIP/NBT como sustrato.

### **Obtención de DNA aislado de OMVs por método de extracción CTAB modificado descrito por Wilson (1987)**

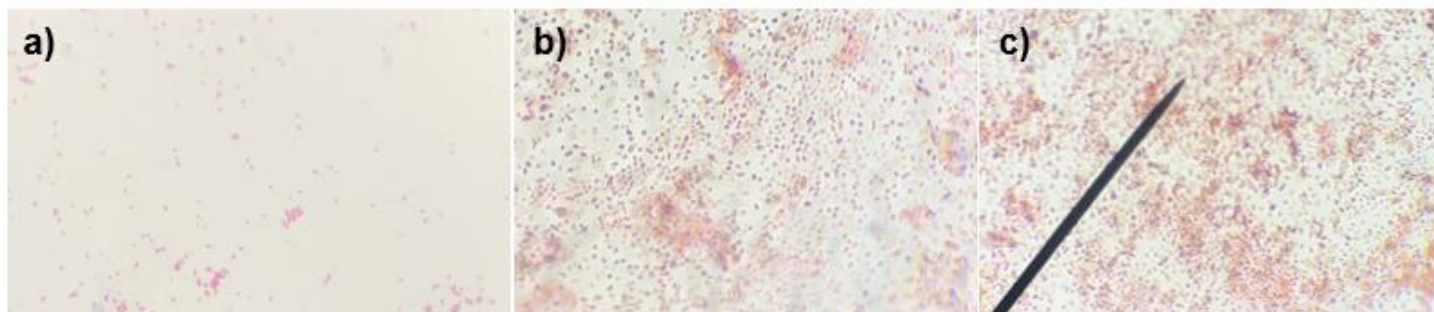
A partir de la purificación de OMVs de las cepas *ATCC700603*, *KpBUAP03* y *KpBUAP021* se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer TE. El buffer contiene EDTA que actúa como agente quelante e inhibe enzimas que puedan degradar el ADN. Posteriormente se añadieron 30 $\mu$ l de SDS al 10% disociando las proteínas unidas a los ácidos nucleicos y eliminando lípidos; también se agregaron 3 $\mu$ l de proteinasa K (20mg/ml) para facilitar la eliminación de restos proteicos. La mezcla se agitó e incubó a 37°C durante 1h. Posteriormente se añadieron 100 $\mu$ l de NaCl 5M, que da la concentración salina necesaria para que el CTAB no se acompleje con el ADN. Se adicionaron 80 $\mu$ l de solución CTAB/NaCl para separar las proteínas del ADN. La mezcla se agitó e incubó a 65°C durante 10 min. Se añadieron 700  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) que ayudan a extraer los lípidos y facilitar la separación de fases. Se agitó y centrifugó a 12000 rpm durante 10min separando así la fase acuosa que contiene al ADN. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadió el mismo volumen obtenido de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), la mezcla se agitó y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min desnaturalizando las proteínas, las cuales precipitan manteniendo al ADN soluble. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 2/3 del volumen de isopropanol frío. La mezcla se agitó suavemente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min para precipitar el ADN. Se eliminó el isopropanol y se realizaron lavados con 500 $\mu$ l de etanol frío al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 $\mu$ l de buffer TE con 1 $\mu$ l de RNAasa. Se guardó a -20°C hasta su uso. La extracción de ADN se comprobó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (1x) (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) utilizando un voltaje constante de 80V, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu$ g/ml) (García Hernández, 2010).

### **Ensayo de fluorescencia directa (FD)**

Se tomaron 10µl de las OMVs purificadas y se depositaron en un portaobjetos, se realizó la fijación adicionando 20µl de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Se aspiró el fijador y se realizaron dos lavados con PBS durante 5 min cada uno. Las muestras se bloquearon con leche al 5 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se aspiró la solución de leche, posteriormente las muestras fueron permeabilizadas utilizando 0.2% Triton X-100 en PBS, se realizaron 2 lavados con PBS y finalmente las muestras se montaron con un cubreobjetos, adicionando Vectashield- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia motic a una longitud de excitación de 358 nm y emisión de 461nm.

## **Resultados**

Las OMVs son producidas por bacterias, en su mayoría bacterias gram negativas, en diversas condiciones, también se ha reportado que son producidas tanto por bacterias patógenas como no patógenas (Schwechheimer & Kuehn, 2015), a pesar de ello no existe suficiente información respecto a este mecanismo. Para evaluar y corroborar la producción de OMVs por *K. pneumoniae* se realizaron cultivos a partir de diferentes aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y una cepa tipo. *K. pneumoniae* produce y secreta OMVs en el entorno extracelular durante el cultivo *in vitro*. Posterior a la purificación a partir del cultivo bacteriano se observaron OMVs con morfología esférica en las tres cepas estudiadas, siendo esta morfología y tamaño esperados, asimismo, las muestras se observan homogéneas. Las OMVs al tener componentes de la membrana obtuvieron una tinción de gram negativa observándose de color rojo-rosado. Cada una de las cepas tuvo una diferente densidad de OMVs expresadas. A pesar de que los niveles de expresión de OMVs entre la cepa *KpBUAP021* y *KpBUAP03* de aislados clínicos eran similares, la cantidad de OMVs presentes en la cepa tipo *ATCC 700603* fue menor en comparación con las otras dos cepas estudiadas bajo las mismas condiciones (Figura 3). Esta observación sugiere que, como se ha mencionado, la expresión de OMVs es un mecanismo regulado (McBroom et al., 2006), aunque aún se desconocen los mecanismos responsables.



**Figura 3.** Tinción de gram de OMVs. Cepas *ATCC700603*, *KpBUAP021* y *KpBUAP03*. Expresión de OMVs y purificación. Se observan OMVs con morfología esférica y tamaño generalmente uniforme sin presencia de bacterias contaminantes. a) Cepa *ATCC700603*; b) cepa *KpBUAP021* c) cepa *KpBUAP03*. La cepa *ATCC700603* tuvo una menor cantidad de OMVs expresadas en comparación con las cepas *KpBUAP021* y *KpBUAP03* obtenidas de aislados clínicos.

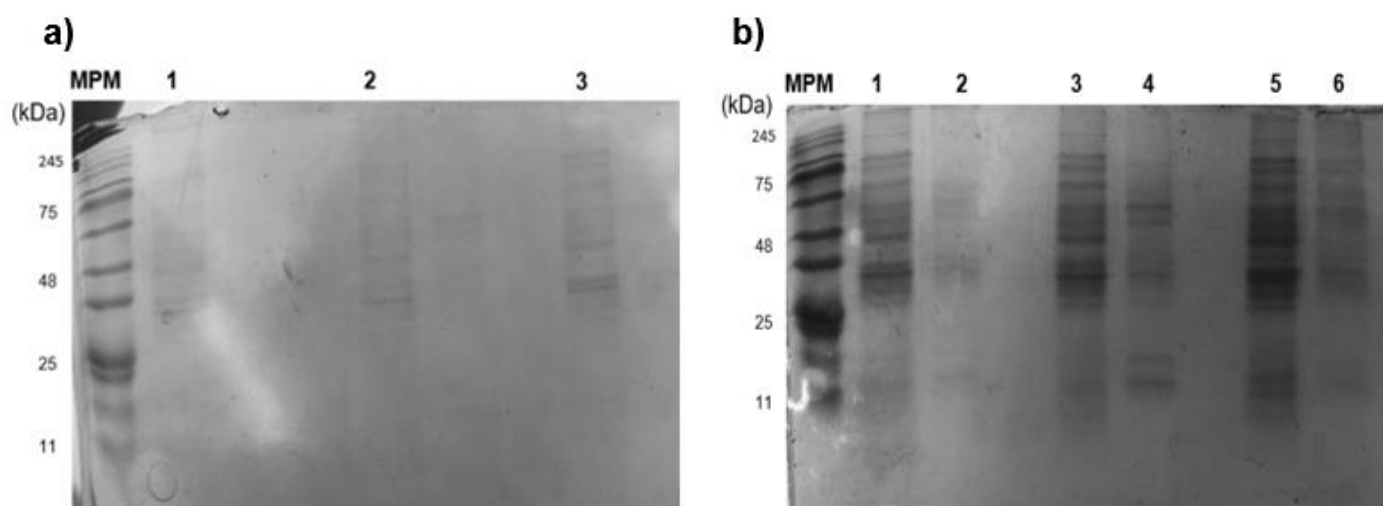
### **Purificación de OMVs.**

Las OMVs se secretan naturalmente de la superficie celular bacteriana y, por lo tanto, se localizan en el sobrenadante del cultivo bacteriano (Kohl et al., 2018). En primer lugar, las OMVs se recolectan mediante etapas secuenciales de filtración y centrifugación para posteriormente someterse a centrifugación en gradiente de densidad y así, obtener las OMVs purificadas. Para poder llevar a cabo el proceso de caracterización se realizaron purificaciones de OMVs a partir de cultivos de *KpBUAP021*, *KpBUAP03* y *K. pneumoniae ATCC700603*. Se obtuvieron sobrenadantes libres de células mediante la centrifugación de estos cultivos, que posteriormente fueron filtrados precipitados y lisados. Las OMVs purificadas carecían de potenciales contaminantes, lo que permitió verificar la calidad de las preparaciones de OMVs obtenidas.

### **Perfil proteico de OMVs en 1D SDS-PAGE**

Las OMVs albergan varias moléculas, entre estas moléculas se encuentra, en gran parte, un cargo proteico compuesto por proteínas que contribuyen a diversas funciones, por lo tanto, últimamente se han tratado de identificar las proteínas asociadas a OMVs. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes es una herramienta analítica simple, con buena resolución y sensible, convirtiéndose en una técnica de gran utilidad y popularidad para la caracterización del proteoma de OMVs. Se decidió evaluar la presencia de un cargo proteico en las OMVs de *K. pneumoniae*, así como la abundancia y los patrones de perfil de proteínas. Para ello se compararon los perfiles proteicos a través de un 1D SDS- PAGE. Esto se realizó

posterior a la purificación de OMVs comparando el cargo de las 3 cepas estudiadas y el cargo de los extractos totales bacterianos. Se identificaron bandas principales con una clara diferencia en el perfil proteico entre las tres cepas estudiadas (Figura 4), esto indica que el cargo proteico entre las OMVs de cada una de las cepas es diferente entre sí, sin embargo, también comparten proteínas presentando así bandas del mismo peso molecular. Este análisis comprueba la existencia de una selección del cargo, la cual ha sido reportada previamente en múltiples especies bacterianas (Haurat et al., 2011; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

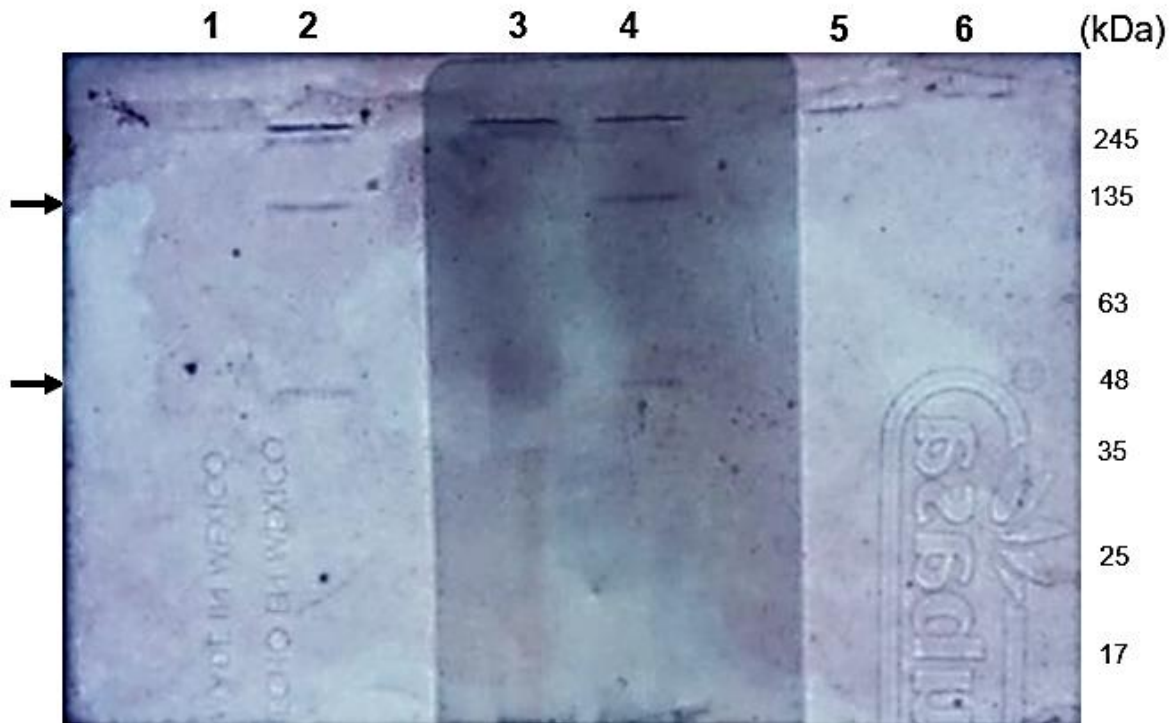


**Figura 4.** a) SDS-PAGE de proteínas de OMVs obtenidas de *K. pneumoniae*: carril 1, cepa ATCC700603; carril 2 cepa *KpBUAP021*; carril 3 cepa *KpBUAP03*. b) comparación mediante SDS-PAGE de proteínas derivadas de OMVs de *K. pneumoniae* y extractos totales. Carril 1, extractos totales de cepa ATCC700603; carril 2, OMVs de cepa ATCC700603; carril 3, extractos totales de cepa *KpBUAP021*; carril 4, OMVs de cepa *KpBUAP021*; carril 5, extractos totales de cepa *KpBUAP03*; carril 6, OMVs de cepa *KpBUAP03*.

### Western blot e identificación de proteínas inmunogénicas

Se ha demostrado la presencia de características antigénicas en algunos componentes de las OMVs, estas presentan una variedad de antígenos de superficie y tienen propiedades como inmunogenicidad (van der Pol et al., 2015). De igual manera, se han realizado estudios inmunoproteómicos en *K. pneumoniae* (Kurupati et al., 2006; Magalhães et al., 2017), sin embargo, no se encuentra información sobre estudios inmunoproteómicos de OMVs de *K. pneumoniae*. El pool de anticuerpo primario de la técnica de western blot se obtuvo de ratones inmunizados previamente con OMVs de *Klebsiella pneumoniae* cepas ATCC700603 y *KpBUAP021*. Posterior a la realización de la técnica se identificaron dos bandas inmunogénicas con peso molecular de ~135 kDa y ~48kDa en las OMVs de las cepas

ATCC700603 y *KpBUAP021* (Figura 5). No se encontró ninguna banda inmunogénica para la cepa *KpBUAP03* ni para extractos totales bacterianos. Este estudio confirma la producción de proteínas antigénicas en OMVs de *Klebsiella pneumoniae* y proporciona dos proteínas inmunorreactivas de análisis presente en las OMVs de ambas cepas inmunizadas. Es crucial definir propiedades antigénicas presentes en OMVs ya que pueden ser una alternativa para el desarrollo de vacunas.



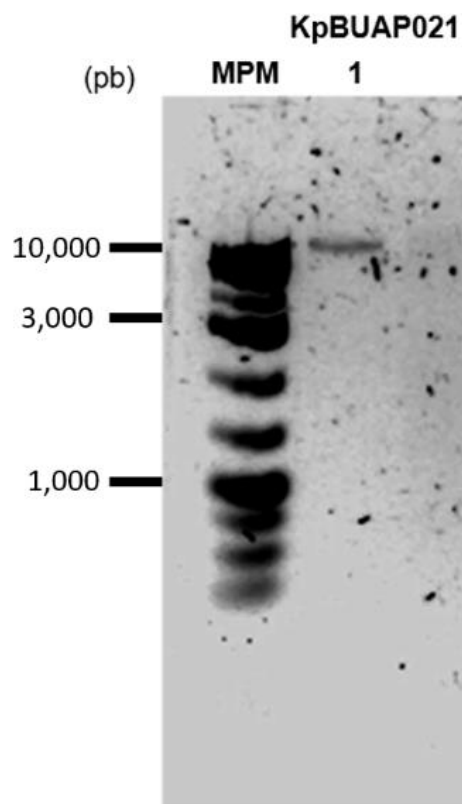
**Figura 5.** Ensayo de Western blot. Anticuerpo primario pool 1:2000 de 4 ratones inmunizados con OMVs de cepa *KpBUAP021* y *ATCC700603*; Anticuerpo secundario anti-ratón 1:5000. Carril 1, extractos totales de cepa *ATCC700603*; carril 2, OMVs de cepa *ATCC700603*; carril 3, extractos totales de cepa *KpBUAP021*; carril 4, OMVs de cepa *KpBUAP021*; carril 5, extractos totales de cepa *KpBUAP03*; carril 6, OMVs de cepa *KpBUAP03*

### **Inmunoanálisis de proteínas obtenidas de OMVs.**

Con la finalidad de identificar bandas inmunogénicas en las proteínas obtenidas de las OMVs purificadas, se realizó un ensayo de western blot, utilizando anticuerpos anti-OMVs. Los resultados demostraron la inmunoreactividad de dos bandas con pesos aproximados de 48 y 135 kDa en los carriles 2 y 4 (Figura 5) pertenecientes a OMVs de cepas *ATCC700603* y *KpBUAP021*, indicando la presencia de proteínas capaces de activar una respuesta inmunológica.

### Identificación de ADN en OMVs de *Klebsiella pneumoniae*.

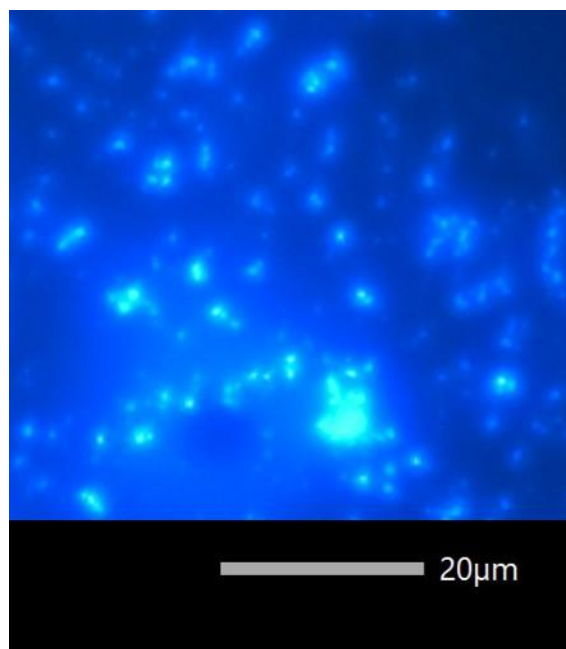
Las OMVs pueden actuar como un mecanismo de transferencia horizontal de genes transfiriendo genes de resistencia a antibióticos, virulencia, plásmidos y como portadores moleculares ya que el materia genético es protegido de condiciones ambientales adversas y acción enzimática (Chatterjee et al., 2017; Dell'Annunziata et al., 2021), por lo tanto se determinó la presencia de ADN en las OMVs purificadas de los aislados clínicos estudiados. La extracción de ADN se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa, en la Figura 6 se muestra la electroforesis del DNA de la cepa *KpBUAP021* en donde se observa una banda correspondiente al ADN total de OMVs de esa cepa con un alto peso molecular. Con este análisis se comprobó que en las OMVs de *Klebsiella pneumoniae* hay presencia de ADN y este se encuentra íntegro, lo que indica una posible transferencia horizontal de genes mediada por OMVs que representa un mecanismo novedoso para la transferencia de genes entre cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aunque este proceso aun requiere de más estudios.



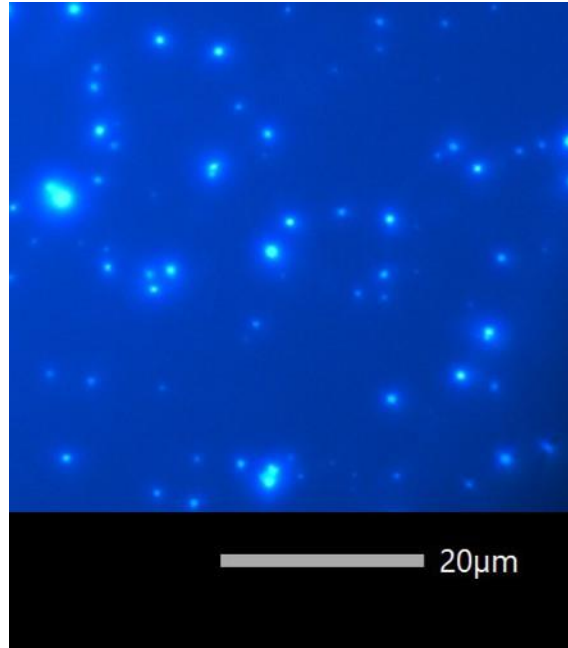
**Figura 6.** Electroforesis del DNA obtenido a partir de OMVs de *Klebsiella pneumoniae*. En el carril 1 se muestra una banda que indica la presencia de material genético de las OMVs de la cepa *KpBUAP021*. La imagen se invirtió para su mejor observación.

### Identificación de ADN en OMVs purificadas de *K. pneumoniae*.

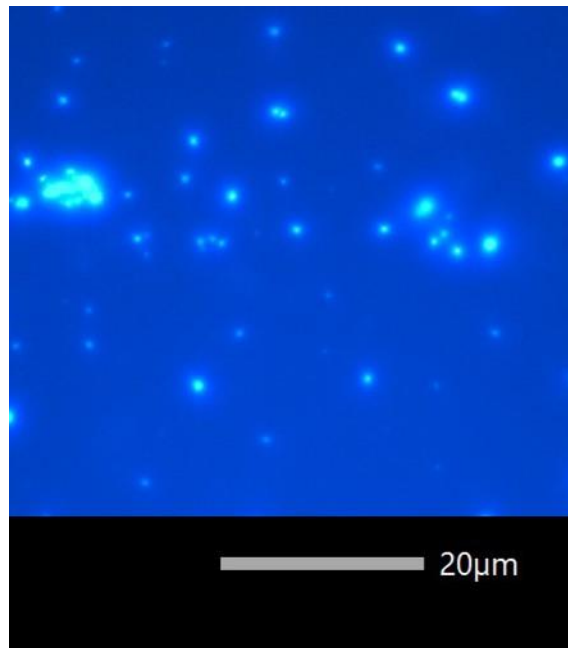
A pesar de la importancia sobre la carga genética que podría existir en OMVs se sabe poco sobre la presencia de este en OMVs de *Klebsiella*, dando lugar a un extenso tema de investigación. Existen diferentes metodologías para visualizar el DNA, sin embargo, la técnica de fluorescencia con DAPI es preferible ya que es fotoestable, generalizada y se reduce el ruido de algunas moléculas auto-fluorescentes. Se realizó la visualización del DNA en OMVs purificadas de *K. pneumoniae* analizadas mediante la técnica de fluorescencia directa utilizando Vectashield-DAPI, las OMVs fueron permeabilizadas para que la incorporación del DAPI fuera posible. DAPI emite fluorescencia azul al unirse a las regiones AT del ADN por lo que, al tener un resultado positivo, como se puede observar en la figura 7, 8 y 9 se puede confirmar la presencia de ADN vesicular dentro de las tres muestras de OMVs purificadas, la intensidad de la fluorescencia no difirió entre las tres cepas estudiadas. Se requiere una caracterización adicional del contenido de ADN vesicular de *Klebsiella pneumoniae*, así como estudios adicionales para determinar sus funciones biológicas.



**Figura 7.** Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa ATCC700603. Se puede visualizar el ADN vesicular de *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC700603 teñido con DAPI. Las preparaciones se observaron a 100X.



**Figura 8.** Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa *KpBUAP021*. Se puede visualizar el ADN vesicular de *Klebsiella pneumoniae* cepa *KpBUAP021* teñido con DAPI. Las preparaciones se observaron a 100X.



**Figura 9.** Resultado de fluorescencia directa positivo perteneciente a la cepa *KpBUAP03*. Se puede visualizar el ADN vesicular de *Klebsiella pneumoniae* cepa *KpBUAP03* teñido con DAPI. Las preparaciones se observaron a 100X.

### **Análisis de proteínas de OMVs y su posible presencia en OMVs de *K. pneumoniae*.**

La identificación de las proteínas presentes en OMVs pueden proporcionar datos para comprender los mecanismos de biogénesis y funciones de las OMVs. Se determinaron presuntivamente las proteínas obtenidas del cargo de OMVs de *Klebsiella pneumoniae* en base a su masa (Tabla 2). Los parámetros de selección se realizaron en base a las 50 proteínas que más frecuentemente se identifican en OMVs de bacterias gram negativas (J. Lee et al., 2016). De las dos bandas inmunogénicas identificadas en el ensayo de western blot se pudieron asociar a las proteínas OmpA con una masa aproximada de 42 kDa y RpoC con una masa aproximada de 155kDa. Ambas proteínas han sido reportadas dentro de las más inmunogénicas en otros microorganismos gram negativos y *Klebsiella pneumoniae* presenta ambas proteínas en su cargo total (UniProt Consortium, 2020; You et al., 2020) como puede observarse también en el perfil proteico obtenido de los extractos totales bacterianos (Figura 4b). También se identificaron presuntivamente algunas bandas obtenidas del perfil proteico de OMVs, aunque estas observaciones requieren una confirmación experimental.

**Tabla 2.** Determinación presuntiva de proteínas localizadas en el cargo de OMVs de *K. pneumoniae*

<b>Proteína identificada</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Gen</b>	<b>Masa (kDa)</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>Proteína de ~135kDa identificada en el western blot cepas ATCC700603 y KpBUAP021</b>	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit	RpoC	~155	Proteína dentro de las 50 más inmunogénicas de <i>Moxarella catarrhalis</i> . Identificada en el cargo de al menos 21 OMVs.	(Thurner et al., 2020)
<b>Proteína de ~100kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa</b>	Outer membrane receptor protein mostly Fe transport	LbpA	105.681	Proteína con actividad transportadora transmembranal de hierro. Identificada en el cargo de al menos 16 OMVs	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q06379">https://www.uniprot.org/uniprot/Q06379</a>

<b>KpBUAP03</b>					
<b>Proteína de ~95kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa KpBUAP021</b>	Elongation factor G (EF-G)	FusA - FusB	~101	Complejo proteico que cataliza el paso de translocación ribosómica dependiente de GTP durante el alargamiento de la traducción. Identificada en el cargo de al menos 22 OMVs.	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/P0A6M8">https://www.uniprot.org/uniprot/P0A6M8</a>
<b>Proteína de ~80kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa KpBUAP03</b>	Iron-regulated outer membrane protein FrpB	FrpB	79.15	Proteína con actividad transportadora transmembrana de absorción de sideróforo y homeostasis del ion hierro. Identificada en el cargo de al menos 16 OMVs.	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9JXL3">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9JXL3</a>
<b>Proteína de ~60kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepas ATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP03</b>	Chaperon in GroEL	GroEL	~57	Proteína chaperona que actúa postraduccionalmente en el plegamiento de proteínas. Identificada en el cargo de al menos 24 OMVs	(Rajendran et al., 2012)
<b>Proteína de ~54kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs</b>	ATP synthase, beta subunit	AtpD	~54	Proteína que forma complejos ATP sintasa la subunidad beta es una proteína	(Kato et al., 2014)

cepas ATCC7006 03 y KpBUAP0 21				antigénica de superficie identificada en el cargo de al menos 23 OMVs	
Proteína de ~48kDa identificada en el western blot cepas ATCC7006 03 y KpBUAP0 21	Outer membrane protein A	Omp A	~42	Proteína más antigénica en <i>Riemerella anatipestifer</i> identificada en el cargo de al menos 28 OMVs. KpOmpA involucrada en adhesión, quorum y patogenicidad.	(Iordanov et al., 2012; Subramaniam et al., 2000)
Proteína de ~42kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepas ATCC7006 03 y KpBUAP0 3	Outer membrane protein assembly factor BamB	Bam B	41.88	Proteína relacionada con la formación de biofilm en <i>Klebsiella</i> . Identificada en el cargo de al menos 18 OMVs	(Wang et al., 2020)
Proteína de ~38kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa ATCC7006 03	Outer membrane protein OprF	OprF	~38	Porina inmunogénica importante en detección de quorum y formación de biopelícula	(Kragelund et al., 1996; Mayeux et al., 2021)
Proteína de ~33kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepas ATCC7006 03,	Long-chain fatty acid transport protein	FadL	~33	Proteína necesaria para el transporte de ácidos grasos de cadena larga en <i>Escherichia coli</i> . Identificada en	(Ginsburgh et al., 1984)

<b>KpBUAP0 21 y KpBUAP0 3</b>				el cargo de al menos 23 OMVs	
<b>Proteína de ~20kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa KpBUAP0 21</b>	Peptidoglucan-associate d lipoprotei n	Pal	~19	Proteína anclada a la membrana externa de bacterias gram negativas, interactúa con las proteínas Tol, tiene un rol esencial en la supervivencia y patogénesis.	(Godlewska et al., 2009; Shim et al., 2009)
<b>Proteína de ~17 kDa encontrada en el perfil proteico de OMVs cepa KpBUAP0 21</b>	Proteína de membrana externa de 17kDa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Omp K17	17	Proteína relacionada con virulencia encontrada en <i>Klebsiella pneumoniae</i> miembro de las OMPs	(Climent et al., 1997)

Las condiciones normales de cultivo en el laboratorio no representan las condiciones fisiológicas normales, el cargo proteico de las OMVs puede cambiar de acuerdo a circunstancias ambientales o clínicas como estrés, desnutrición, presencia de antibióticos que pueden influir en la biogénesis y componentes de las OMVs (J. Lee et al., 2016). Se realizó un sondeo de las proteínas más frecuentemente encontradas en OMVs de bacterias gram negativas que estuvieran presentes en el genoma de *Klebsiella*. Los parámetros de selección se realizaron en base a (J. Lee et al., 2016). La tabla 3 identifica las proteínas que se encontraron con mayor frecuencia en OMVs de bacterias gram negativas y que se encuentran en los genomas de diversas *Klebsiellas*, principalmente en *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (cepa ATCC 700721 / MGH 78578), en orden ascendente de masa. Las proteínas más frecuentemente identificadas en las OMVs son: proteínas de membrana externa, proteínas transportadoras, chaperonas, proteínas asociadas a patogenicidad y virulencia como adhesión, biopelículas, detección de quorum y proteínas asociadas a estrés.

**Tabla 3.** Proteínas frecuentemente encontradas en OMVs de bacterias gram negativas y que están presentes en el genoma de *Klebsiella*.

<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Masa (kDa)</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<b>50S ribosomal protein L14 rplN</b>	12	Se une a rRNA 23S	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEW2">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEW2</a>
<b>50S ribosomal protein L19 RplS</b>	13	Localizada en la subunidad ribosomal 30S-50S. Juega un rol en la estructura y función al sitio de unión de aminoacil-tRNA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TCL4">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TCL4</a>
<b>SlyB protein</b>	15	Lipoproteína que contribuye a la integridad de la envoltura celular	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/R4YF68">https://www.uniprot.org/uniprot/R4YF68</a> (Q. Chen et al., 2017)
<b>Glycoprotein-polysaccharide metabolism ybaY</b>	17.05	Proteína involucrada en la envoltura celular y morfología prevista como proteína de membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9BEM8">https://www.uniprot.org/uniprot/W9BEM8</a> (Charoenwong et al., 2011)
<b>30S ribosomal protein S7 RpsG</b>	17.63	Proteína de unión a 16S rRNA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEX9">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEX9</a>
<b>30S ribosomal protein S5 rpsE</b>	17.65	Estabiliza la conformación con la subunidad 30S	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEV5">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEV5</a>
<b>Bacterioferritin bfr</b>	18.29	Involucrada en transporte de iones de hierro	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1Y0PUP8">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1Y0PUP8</a>
<b>50S ribosomal protein L6 rplF</b>	18.8	Se une directamente a 23S rRNA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEV7">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEV7</a>
<b>Divisome-associated lipoprotein YraP</b>	20.1	Contribuye a la integridad de la envoltura celular y virulencia	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0W8AX15">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0W8AX15</a> (Morris et al., 2018)
<b>50S ribosomal protein L5 RplE</b>	20.3	Proteína implicada en mediar la unión del ARN5S al ribosoma. Entra en contacto con el tRNA del sitio de P; el ARNr 5S y	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEW0">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEW0</a>

		algunas de sus proteínas asociadas podrían ayudar a estabilizar el posicionamiento de los ARNt ligados al ribosoma.	
<b>LPS-assembly lipoprotein IptE</b>	21	Proteína que participa en el montaje de lipopolisacáridos en la superficie de la membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3M0DKB9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3M0DKB9</a>
Outer membrane protein OmpW	22	Proteína involucrada en protección de las bacterias contra condiciones ambientales adversas y desempeña un papel en las enfermedades infecciosas.	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2W0Z2H3">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2W0Z2H3</a> (P. Zhang et al., 2020)
OprG	24.3	Pertenece a la familia de proteínas OmpW	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/C8T6E7">https://www.uniprot.org/uniprot/C8T6E7</a>
<b>50S ribosomal protein L1 rplA</b>	24.7	Se une directamente a 23S rRNA	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TG_N6">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TG_N6</a>
<b>M48 family metallopeptidase LoIP</b>	26	Proteína con actividad de metaloendopeptidasa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9B3_N5">https://www.uniprot.org/uniprot/W9B3_N5</a>
HisJ protein	28	Transporte de compuestos nitrogenados	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9BI_M2">https://www.uniprot.org/uniprot/W9BI_M2</a>
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA	29	Proteína implicada en el plegamiento de proteínas con actividad de la isomerasa del transporte del peptidyl-prolyl	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A086ILP4">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A086ILP4</a>
<b>Amino acid ABC transporter substrate-binding protein FliY</b>	31	Transporte de aminoácidos	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9BE_D8">https://www.uniprot.org/uniprot/W9BE_D8</a>

<b>Protease HtpX</b>	32	Proteína implicada en respuesta a estrés con actividad de metaloendopeptidas a	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TB00">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TB00</a>
<b>Hook-filament junction protein flgL</b>	33	Proteína implicada en motilidad celular dependiente de flagelo	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A331KCK8">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A331KCK8</a>
<b>ND efflux membrane fusion protein ttgA</b>	35	Actividad transportadora de transmembrana	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A4P0YAQ1">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A4P0YAQ1</a>
<b>Branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein LivJ</b>	38	Transporte de aminoácidos	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2D1HDZ9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2D1HDZ9</a>
<b>Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit MexA</b>	39.33	Actividad transportadora de transmembrana	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0C7KAG8">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0C7KAG8</a>
High-affinity branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein LivK	39.44	Transporte de aminoácidos	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3NOLX50">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A3NOLX50</a>
<b>DNA-directed RNA polymerase subunit alpha rpoA</b>	~40	ARN polimerasa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEU8">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEU8</a>
<b>Succinato CoA ligasa Suc C</b>	41.5	Proteína implicada en el ciclo del ácido cítrico	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6T6F6">https://www.uniprot.org/uniprot/A6T6F6</a>
<b>Elongation factor Tu</b>	41.8	Proteína que promueve la unión de aminoacil-tRNA dependiente de GTP al sitio A de los ribosomas	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A377VTJ4">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A377VTJ4</a>
Dihydrolipoyllysine-residue	44	Componente E2 del complejo 2-	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2X3EXX9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2X3EXX9</a>

succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex <b>SucB</b>		oxoglutarato deshidrogenasa que cataliza el segundo paso en la conversión del 2-oxoglutarato en succinil-CoA y CO <sub>2</sub>	
<b>Tol-Pal system protein TolB</b>	45	Proteína del sistema Tol-Pal implicada en la invaginación de la membrana externa durante la división celular	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/B5XZC1">https://www.uniprot.org/uniprot/B5XZC1</a>
<b>Chaperone surA</b>	47	Proteína implicada en el correcto plegamiento y montaje de proteínas de membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/R4Y9A0">https://www.uniprot.org/uniprot/R4Y9A0</a>
<b>Multidrug efflux RND transporter outer membrane subunit EefC OprM</b>	48	Proteína con actividad transportadora de membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A330S0A4">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A330S0A4</a>
<b>Periplasmic serine endoprotease degP</b>	49	Proteína implicada en respuesta al estrés	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/R4Y5J4">https://www.uniprot.org/uniprot/R4Y5J4</a>
<b>Dihydrolipoyl dehydrogenase IpdA</b>	50.5	Proteína implicada en la homeostasis redox celular	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6T4Q9">https://www.uniprot.org/uniprot/A6T4Q9</a>
<b>Glutamine synthetase GlnA</b>	50.9	Cataliza la biosíntesis dependiente de ATP de la glutamina a partir de glutamato y amoníaco	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TG73">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TG73</a>
<b>TolC</b>	51.50	Proteína que forma parte de un complejo de eflujo farmacológico con una amplia especificidad de sustrato	(Ludwig & Goebel, 2006) <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2W0VIE5">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2W0VIE5</a>
<b>soluble pyridine nucleotide</b>	51.53	Conversión de NADPH a NADH	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TGE6">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TGE6</a>

<b>transhydrogenase sthA</b>			
<b>Flagellin FliC</b>	53	Subunidad que se polimeriza para formar los filamentos de los flagelos	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A331KC69">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A331KC69</a>
<b>Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase pdhC</b>	54	Proteína con actividad de transferasa, transferencia de grupos acilo	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2V1L9V6">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2V1L9V6</a>
<b>YfiB protein</b>	55	Proteína de unión a ADN implicada en el desenrollado del ADN de cadena doble	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9BJ64#names_and_taxonomy">https://www.uniprot.org/uniprot/W9BJ64#names_and_taxonomy</a>
<b>DNA-binding transcriptional regulator NtrC GlnG</b>	56.	Proteína relacionada al sistema regulador NtrB/NtrC	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A6M3Z1B4">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A6M3Z1B4</a>
<b>30S ribosomal protein S1 RpsA</b>	61	Subunidad de unión a ARNm	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0J4XUS8">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0J4XUS8</a>
<b>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D ppiD</b>	67	Involucrada en la maduración de las principales proteínas de la membrana externa beta-barril	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A486QBG9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A486QBG9</a> (Matern et al., 2010)
<b>Chaperone protein htpG</b>	71	Proteína asociada al plegamiento de proteínas	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6T5N6">https://www.uniprot.org/uniprot/A6T5N6</a>
<b>Penicillin-binding protein activator IpoA</b>	75	Regulador de la síntesis de peptidoglicano esencial para la función de la proteína de unión a penicilina 1A	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEG6">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TEG6</a>
<b>YncD protein</b>	77.1	Proteína de la membrana externa involucrado en virulencia	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/W9B8P1">https://www.uniprot.org/uniprot/W9B8P1</a> (Xiong et al., 2012)

<b>Ferrioxamine receptor fhuA</b>	77.3	Homeostasis del ion de hierro	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A170VZU9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A170VZU9</a>
<b>Outer membrane protein assembly factor BamA</b>	90	Proteína que forma parte de un complejo de ensamble de proteínas de membrana externa beta-barril	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6T4X9">https://www.uniprot.org/uniprot/A6T4X9</a>
<b>Aconitate hydratase B acnB</b>	93	Proteína involucrada en el ciclo del ácido tricarbónico	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A081IPB5">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A081IPB5</a>
<b>Fumarate reductase flavoprotein subunit FccA</b>	99	Actividad de la deshidrogenasa del succinato	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A486UJM9">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A486UJM9</a>
<b>DNA-directed RNA polymerase subunit beta rpoB</b>	~140	ARN polimerasa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A6TGP0">https://www.uniprot.org/uniprot/A6TGP0</a>

## Discusión

La bacteria gram negativa *Klebsiella pneumoniae* cepa tipo ATCC700603, así como los aislados clínicos *KpBUAP021* y *KpBUAP03* mostraron una secreción de OMVs con morfología esférica en el entorno extracelular durante el cultivo *in vitro*. Se ha informado en la literatura que las OMVs fueron observadas por primera vez en los años 60's, el tamaño y morfología de las OMVs observadas fue el esperado siendo estas en promedio de 20-200 nm de diámetro (Kim et al., 2015). En el año 2019 Martora et al (Martora et al., 2019) describe que a través de microscopía electrónica de transmisión las OMVs de *Klebsiella pneumoniae* tienen esta morfología y tamaño, generalmente uniforme y coincidente a las observadas en las cepas estudiadas (Figura 3). Debido a las características de las OMVs, estas presentan componentes de la membrana (J. C. Lee et al., 2012; W. H. Lee et al., 2015; Schwechheimer & Kuehn, 2015) generando así, el color característico de la tinción de gram negativa. Se observó también una diferencia evidente entre las cepas de aislados clínicos *KpBUAP021*, *KpBUAP03* y la cepa tipo ATCC700603 en la densidad de OMVs expresadas, esto podría verse asociado a que los niveles de vesiculación dependen de diferentes condiciones, existen

mecanismos que se han asociado a la producción de OMVs en bacterias gram negativas, estos mecanismos resultan de los cambios en niveles de expresión de diversos genes activando vías de estrés que alteran los niveles de producción de OMVs. Por ejemplo, Lpp es una lipoproteína de membrana externa que en parte se encuentra unida covalentemente al peptidoglicano, se ha asociado esta unión a la disminución de la producción de OMVs, asimismo en áreas donde esta unión es reducida, áreas enriquecidas de LPS, fosfolípidos, moléculas asociadas a LPS, áreas donde hay una acumulación de proteínas o componentes de la envoltura mal plegados aumenta la producción de estas. La presencia de endopeptidasas de peptidoglicano participan en la regulación de la capacidad para formar la unión de Lpp al peptidoglicano (Schwechheimer & Kuehn, 2015) , se ha demostrado que una deficiencia en la endopeptidasa Spr de peptidoglicano en *Escherichia coli* UPEC atenuó la capacidad para infectar riñones además de comprometer la capacidad de UPEC para evadir el ataque mediado por complemento (Huang et al., 2020), lo cual podría estar asociado a la patogenicidad de bacterias aumentando los niveles de vesiculación de las mismas. Los aislados clínicos *KpBUAP021* y *KpBUAP03* presentaron una mayor vesiculación bajo las mismas condiciones que la cepa tipo *ATCC700603* lo cual podría estar asociado a la virulencia de estas cepas de aislados clínicos.

Al examinar el perfil proteico de las OMVs se identificaron cinco bandas principales para la cepa *ATCC700603*, seis bandas principales para la cepa *KpBUAP021* y seis bandas principales para la cepa *KpBUAP03* con diferencias notorias entre las tres cepas estudiadas (Figura 4). Se ha estudiado el perfil proteico de OMVs de otras bacterias gram negativas, Jha et al (Jha et al., 2017) comparó los perfiles proteicos de OMVs de *Acinetobacter baumannii* en una cepa ATCC y tres aislados clínicos, obteniendo resultados consistentes con los mostrados en este trabajo, corroborando una posible selección de cargo entre los aislados clínicos y una cepa tipo.

La presencia de proteínas inmunogénicas en OMVs ha sido reportada previamente, siendo variable la cantidad de proteínas inmunogénicas reconocidas, por ejemplo, para *Pasteurella multocida* se reconocieron un gran número de proteínas inmunogénicas a partir de anticuerpos de gallinas infectadas con la bacteria (Fernández-Rojas et al., 2014), contrario a la presencia de pocas proteínas inmunogénica en *Avibacterium paragallinarum* (Ramón

Rocha et al., 2006). Para *Klebsiella pneumoniae* las proteínas inmunogénicas en suero que se reconocen con mayor frecuencia son OmpA, OmpK36, FepA, OmpK17, OmpW y proteína receptora de colicina I (Kurupati et al., 2006). En este estudio se confirma la presencia de proteínas inmunogénicas en OMVs de *K. pneumoniae*, se identificaron dos bandas inmunorreactivas con peso molecular de ~135kDa y ~48kDa (Figura 5). Estas proteínas se identificaron presuntivamente como OmpA (42kDa) y RpoC (155kDa) y, como se mencionó anteriormente, han sido reportadas en bacterias gram negativas dentro de las proteínas más inmunogénicas, de igual manera se encuentran presentes en el genoma de *K. pneumoniae*. Las bandas con resultado positivo para esta técnica se encuentran presentes en los carriles pertenecientes a OMVs de la cepa ATCC700603 y *KpBUAP021* (Figura 5 carril 2 y 4) no presentes en la cepa *KpBUAP03* (Figura 5 carril 6), esto puede deberse a que los anticuerpos primarios se obtuvieron de ratones inmunizados con las OMVs de las cepas ATCC700603 y *KpBUAP021*, de igual manera no se encontraron presentes en extractos totales bacterianos de ninguna de las cepas estudiadas.

Para la bacteria gram negativa *Avibacterium paragallinarum* se identificó una proteína inmunogénica de 110 kDa débilmente detectada en extractos totales bacterianos (Ramón Rocha et al., 2006) lo que podría indicar la selección de proteínas inmunogénicas presentes en el cargo de OMVs. Ramon Rocha y col, en el 2006 mencionan que los componentes inmunogénicos de las OMVs podrían ser útiles como componentes de una vacuna, aunque anteriormente no se habían determinado los elementos inmunogénicos de las OMVs de *Klebsiella pneumoniae* (W. H. Lee et al., 2015) hacen referencia a que estas podrían proporcionar una nueva estrategia de vacuna.

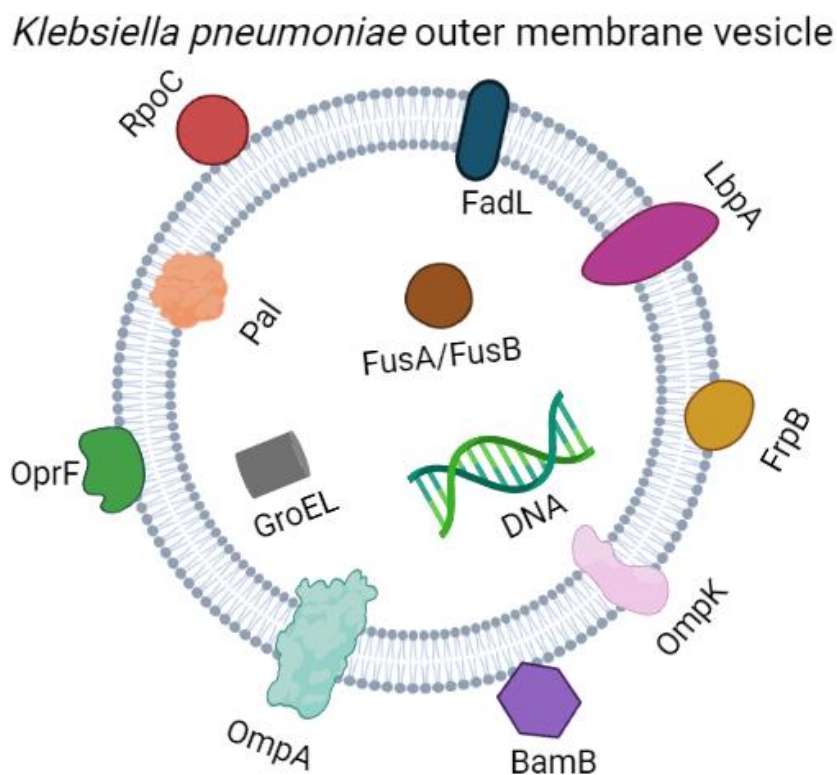
Como se observa en la Tabla 2, al realizar la determinación presuntiva de proteínas localizadas en el cargo de OMVs de *K. pneumoniae* se definió a la proteína de ~135kDa como RpoC, esta proteína ha sido reportada dentro de las 50 más inmunogénicas de *Moraxella catarrhalis* y ha sido identificada en el cargo de al menos 21 OMVs (Thurner et al., 2020). RpoC codifica para la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa y ha sido asociada a resistencia a la rifampicina (Yun et al., 2018). De igual manera se describe a la proteína de ~48kDa como OmpA, proteína más antigénica en *Rimerella anatipestifer* identificada al menos 28 veces en el cargo de OMVs, en *Klebsiella pneumoniae* se ha asociado a adhesión,

quorum y patogenicidad (Iordanov et al., 2012; Subramaniam et al., 2000). Se identificaron 12 probables proteínas presentes en el cargo de OMVs de *Klebsiella pneumoniae* cepas ATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP03 en base a su peso molecular (Tabla 1) las cuales podrían estar asociadas a diversas funciones y utilizar este medio de secreción como un sistema de entrega de factores de virulencia enzimáticamente activos. A pesar de que estas observaciones requieren una confirmación experimental, resulta razonable suponer que algunas bacterias comparten su cargo proteico asociado a OMVs, por lo que se podría pensar que estas proteínas estén implicadas en los mismos mecanismos o funciones biológicas dentro de las OMVs.

Como se mencionó anteriormente, el cargo proteico de las OMVs no se representa completamente en condiciones normales de cultivo en laboratorio, ya que se han identificado más de 3500 proteínas asociadas a OMVs (Kim et al., 2015) por lo que se realizó un estudio de las proteínas más frecuentemente encontradas en OMVs que estuvieran presentes en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 3). La creación de bibliotecas con información de proteínas es valiosa para el estudio bajo diferentes exposiciones, información que ha sido poco estudiada para *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, se ha descrito la presencia de abundantes proteínas en el cargo de OMVs de diferentes bacterias como proteínas de la membrana externa (OmpA, OmpC, OmpF), proteínas periplásmicas (fosfatasa alcalina, AcrA) y factores de virulencia (adhesinas, invasinas y otras enzimas) (Kim et al., 2015)

Este trabajo estableció que la observación de un contenido genético era importante para la caracterización de OMVs. Se ha descrito que las OMVs contienen ADN lineal y asociado a superficie (Kim et al., 2015), aún no se conoce el mecanismo por el cual el ADN es empaquetado en OMVs, ni se ha definido aún el papel que juegan las OMVs en el intercambio genético entre diferentes especies y géneros en el medio ambiente u hospedero, Ramon Rocha y Col, en el 2006 describió que en *Avibacterium paragallinarum* se detectó una banda aproximadamente de 12 kb en sus OMVs (Ramón Rocha et al., 2006), además se ha encontrado la presencia de material genético en otras OMVs de las bacterias gram negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, para algunas OMVs de bacterias gram negativas patógenas como *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* UPEC las cantidades de ADN

estaban por debajo del límite de detección (Bitto et al., 2017). En este trabajo se determinó que las OMVs de *K. pneumoniae*, así como los aislados clínicos, presentan una banda de alto peso molecular consistentes con el ADN total de su cargo, observada mediante electroforesis, dando como resultado un posible mecanismo de transferencia horizontal de genes. Este estudio se complementó confirmando la presencia de ADN vesicular de las cepas ATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP03 a través de una fluorescencia directa, en donde la intensidad de fluorescencia no difirió entre las 3 cepas estudiadas. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos inferir la presencia de proteínas involucradas en la patogenicidad de *K. pneumoniae* (Figura 10), sin embargo, se deben de realizar estudios experimentales para comprobar su presencia e involucramiento en la virulencia.



**Figura 10.** Representación esquemática de la estructura y contenido de las OMVs de *Klebsiella pneumoniae*. Las OMVs contienen en su cargo proteínas de superficie, proteínas de lumen y ADN.

## Conclusiones

El presente trabajo de tesis nos permite identificar las siguientes conclusiones:

- Los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, así como la cepa tipo tienen una producción y secreción homogénea de OMVs durante el cultivo *in vitro*, bajo ciertos parámetros específicos.
- Las OMVs son de morfología esférica, con componentes de la membrana por lo que generan una tinción de gram negativa, presentando en su cargo diferentes proteínas incluyendo proteínas inmunogénicas y ácidos nucleicos.
- La densidad de producción de OMVs es diferente en cada una de las cepas aisladas, posiblemente debido a cambios en los niveles de expresión de diferentes genes, lo que corrobora también la posibilidad de asociar la producción de OMVs a cepas de *Klebsiella pneumoniae* en aislados clínicos que parecen ser resistentes a la lisis mediada por complemento y opsonofagocitosis.
- La metodología utilizada en este estudio para la purificación de OMVs fue eficiente para las cepas estudiadas.
- Se realizó la identificación de proteínas asociadas a OMVs, el perfil proteico muestra bandas diferenciales entre cada cepa estudiada y extractos totales bacterianos, datos que ayudarían a determinar una posible selección de cargo.
- Las OMVs contienen en su cargo dos proteínas antigénicas de ~135kDa y ~48kDa.
- Se asociaron presuntivamente 12 proteínas al cargo proteico de las OMVs, algunas de las cuales son proteínas identificadas como factores de virulencia, resistencia o patogénesis por lo que se especula que las OMVs pueden estar asociadas al complejo citotóxico extracelular.

- Las OMVs contienen material genético de alto peso molecular referente al ADN genómico.

## **Perspectivas**

- Analizar más aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* para identificar la secreción de OMVs
- Realizar una caracterización proteómica del cargo asociado a OMVs.
- Identificar genes presentes en las OMVs asociados a patogenicidad, así como genes asociados a la producción de OMVs.
- Realizar la identificación de las proteínas antigénicas mediante una secuenciación por MALDI-TOF
- Realizar estudios sobre la composición lipídica de las OMVs para enriquecer la caracterización

## **Anexos**

### **Presentaciones en congresos**

- Participación en el 3er Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXIV Semana del Día del Químico organizado por el Departamento de Ciencias QuímicoBiológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora con el proyecto en modalidad cartel “Caracterización molecular de microvesículas secretadas a partir de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*” (Noviembre 2020)
- 1er lugar de Trabajos Libres en la Categoría de Investigación Básica en el XXXIX Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica organizado por la Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, AC. con el trabajo en modalidad cartel y oral “Caracterización Molecular e Inmunológica de Microvesículas secretadas de *Klebsiella pneumoniae*” (Junio 2021)

## Referencias

- Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A.-S., Garin, B., Le Hello, S., Arlet, G., Nicolas-Chanoine, M.-H., Decré, D., & Brisse, S. (2014). Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clonal Groups. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1812–1820. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>
- Bitto, N. J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., D’Cruze, T., Reynolds, E. C., Dashper, S. G., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Stinear, T. P., Stacey, K. J., & Ferrero, R. L. (2017). Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*, 7(1), 7072. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>
- Broug-Holub, E., Toews, G. B., Van Iwaarden, J. F., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Paine, R., & Standiford, T. J. (1997). Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: Elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infection and Immunity*, 65(4), 1139–1146. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1139-1146.1997>
- Cahill, B. K., Seeley, K. W., Gutel, D., & Ellis, T. N. (2015). *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles. *Microbiological Research*, 180, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.012>
- Charoenwong, D., Andrews, S., & Mackey, B. (2011). Role of *rpoS* in the Development of Cell Envelope Resilience and Pressure Resistance in Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5220–5229. <https://doi.org/10.1128/AEM.00648-11>
- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., & Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the bla<sub>NDM-1</sub> gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2201–2207. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx131>
- Chen, L., Wilksch, J. J., Liu, H., Zhang, X., Torres, V. V. L., Bi, W., Mandela, E., Cao, J., Li, J., Lithgow, T., & Zhou, T. (2020). Investigation of Lux S-mediated quorum

- sensing in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 69(3), 402–413.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.001148>
- Chen, Q., Rozovsky, S., & Chen, W. (2017). Engineering multi-functional bacterial outer membrane vesicles as modular nanodevices for biosensing and bioimaging. *Chemical Communications*, 53(54), 7569–7572. <https://doi.org/10.1039/C7CC04246A>
- 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>
- Climent, N., Ferrer, S., Rubires, X., Merino, S., Tomás, J. M., & Regué, M. (1997). Molecular characterization of a 17-kDa outer-membrane protein from *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology*, 148(2), 133–143.  
[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)87644-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)87644-9)
- Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C. R., & Franci, G. (2021). Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>
- Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2499–2505. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989>
- Fernández-Rojas, M. A., Vaca, S., Reyes-López, M., de la Garza, M., Aguilar-Romero, F., Zenteno, E., Soriano-Vargas, E., & Negrete-Abascal, E. (2014). Outer membrane vesicles of *Pasteurella multocida* contain virulence factors. *MicrobiologyOpen*, 3(5), 711–717. <https://doi.org/10.1002/mbo3.201>
- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial Genomics*, 2(8), e000073.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>

- García Hernández, J. (2010). *Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogurt*.
- Ginsburgh, C. L., Black, P. N., & Nunn, W. D. (1984). Transport of long chain fatty acids in *Escherichia coli*. Identification of a membrane protein associated with the *fadL* gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(13), 8437–8443.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6376508>
- Godlewska, R., WiÅńiewska, K., Pietras, Z., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2009). Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiology Letters*, 298(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01659.x>
- Gomes, A. É. I., Pacheco, T., Santos, C. da S. dos, Pereira, J. A., Ribeiro, M. L., Darrieux, M., & Ferraz, L. F. C. (2021). Functional Insights From KpfR, a New Transcriptional Regulator of Fimbrial Expression That Is Crucial for *Klebsiella pneumoniae* Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601921>
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*, 18(7), 425–432. <https://doi.org/10.1111/tra.12488>
- Haurat, M. F., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M., Dorobantu, L., Gray, M. R., Curtis, M. A., & Feldman, M. F. (2011). Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1269–1276.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185744>
- Hsieh, P. F., Lu, Y. R., Lin, T. L., Lai, L. Y., & Wang, J. T. (2019). *Klebsiella pneumoniae* Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and in Vivo Colonization. *Journal of Infectious Diseases*, 219(4), 637–647. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy534>
- Huang, W.-C., Hashimoto, M., Shih, Y.-L., Wu, C.-C., Lee, M.-F., Chen, Y.-L., Wu, J.-J., Wang, M.-C., Lin, W.-H., Hong, M.-Y., & Teng, C.-H. (2020). Peptidoglycan Endopeptidase Spr of Uropathogenic *Escherichia coli* Contributes to Kidney

Infections and Competitive Fitness During Bladder Colonization. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586214>

- Iordanov, I., Renault, M., Réat, V., Bosshart, P. D., Engel, A., Saurel, O., & Milon, A. (2012). Dynamics of *Klebsiella pneumoniae* OmpA transmembrane domain: The four extracellular loops display restricted motion behavior in micelles and in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1818*(9), 2344–2353. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.004>
- Jarzab, M., Posselt, G., Meisner-Kober, N., & Wessler, S. (2020). Helicobacter pylori-derived outer membrane vesicles (Omvs): Role in bacterial pathogenesis? *Microorganisms*, *8*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091328>
- Jha, C., Ghosh, S., Gautam, V., Malhotra, P., & Ray, P. (2017). In vitro study of virulence potential of *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.048>
- Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, *15*(6), 375–387. <https://doi.org/10.1038/nri3837>
- Kato, G., Sakai, T., Suzuki, K., Sano, N., Takano, T., Matsuyama, T., & Nakayasu, C. (2014). Protective efficacies and immune responses induced by recombinant HCD, atpD and gdhA against bacterial cold-water disease in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish & Shellfish Immunology*, *39*(2), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.040>
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., & Gho, Y. S. (2015). Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *40*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.006>
- Kohl, P., Zingl, F. G., Eichmann, T. O., & Schild, S. (2018). *Isolation of Outer Membrane Vesicles Including Their Quantitative and Qualitative Analyses* (pp. 117–134). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9_11)
- Kragelund, L., Leopold, K., & Nybroe, O. (1996). Outer Membrane Protein Heterogeneity

- within *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* and Use of an OprF Antibody as a Probe for rRNA Homology Group I Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 480–485. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.480-485.1996>
- Kurupati, P., Teh, B. K., Kumarasinghe, G., & Poh, C. L. (2006). Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. *PROTEOMICS*, 6(3), 836–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500214>
- Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. Il, Kang, S. S., & Hyun, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiology Letters*, 331(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>
- Lee, J., Kim, O. Y., & Gho, 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/https://doi.org/10.1002/prca.201600032>
- Lee, W. H., Choi, H. Il, Hong, S. W., Kim, K. S., Gho, Y. S., & Jeon, S. G. (2015). Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(9). <https://doi.org/10.1038/emm.2015.59>
- Ludwig, A., & Goebel, W. (2006). Structure and mode of action of RTX toxins. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (pp. 547–569). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012088445-2/50034-2>
- Magalhães, S., Aroso, M., Roxo, I., Ferreira, S., Cerveira, F., Ramalheira, E., Ferreira, R., & Vitorino, R. (2017). Proteomic profile of susceptible and multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* using label-free and immunoproteomic strategies. *Research in Microbiology*, 168(3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.002>
- Martora, F., Pinto, F., Folliero, V., Cammarota, M., Dell, F., Squillaci, G., Galdiero, M., Morana, A., Schiraldi, C., Giovane, A., Galdiero, M., & Franci, G. (2019). Microbial

- Pathogenesis Isolation , characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 136(July), 103719. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103719>
- Matern, Y., Barion, B., & Behrens-Kneip, S. (2010). PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 10(1), 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-251>
- Mayeux, G., Gayet, L., Liguori, L., Odier, M., Martin, D. K., Cortès, S., Schaack, B., & Lenormand, J.-L. (2021). Cell-free expression of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* for vaccine purposes. *Life Science Alliance*, 4(6), e202000958. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000958>
- McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S., & Kuehn, M. J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5385–5392. <https://doi.org/10.1128/JB.00498-06>
- Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01976-16>
- Morris, F. C., Wells, T. J., Bryant, J. A., Schager, A. E., Sevastyanovich, Y. R., Squire, D. J. P., Marshall, J., Isom, G. L., Rooke, J., Maderbocus, R., Knowles, T. J., Overduin, M., Rossiter, A. E., Cunningham, A. F., & Henderson, I. R. (2018). YraP Contributes to Cell Envelope Integrity and Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 86(11). <https://doi.org/10.1128/IAI.00829-17>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/membr.00078-15>
- Palacios, M. (2017). *Identification of Conserved Klebsiella Pneumoniae Virulence Factors* [University of North Carolina at Chapel Hill]. <https://doi.org/https://doi.org/10.17615/1a7y-ya98>
- Pope, J. L., Yang, Y., Newsome, R. C., Sun, W., Sun, X., Ukhanova, M., Neu, J., Issa, J.-

- P., Mai, V., & Jobin, C. (2019). Microbial Colonization Coordinates the Pathogenesis of a *Klebsiella pneumoniae* Infant Isolate. *Scientific Reports*, 9(1), 3380. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39887-8>
- Rajendran, A., Endo, M., & Sugiyama, H. (2012). *Structural and Functional Analysis of Proteins by High-Speed Atomic Force Microscopy* (pp. 5–55). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398312-1.00002-0>
- Ramón Rocha, M. O., García-González, O., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., Pérez-Márquez, V. M., Vaca, S., & Negrete-Abascal, E. (2006). Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *FEMS Microbiology Letters*, 257(1), 63–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00154.x>
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 150(7), 2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
- 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(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Shim, H. K., Kim, J. Y., Kim, M. J., Sim, H. S., Park, D. W., Sohn, J. W., & Kim, M. J. (2009). Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Experimental and Molecular Medicine*, 41(10), 687. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.10.075>
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Santos, J. P. G., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., Palacios, L., Marshall, H., Hopley, L., Molina, M., Cid, V. J., Salminen, T. A., & Bengoechea, J. A. (2020). *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated

- microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. In *PLoS Pathogens* (Vol. 16, Issue 3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007969>
- Subramaniam, S., Huang, B., Loh, H., Kwang, J., Tan, H.-M., Chua, K.-L., & Frey, J. (2000). Characterization of a Predominant Immunogenic Outer Membrane Protein of *Riemerella anatipestifer*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), 168–174. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.2.168-174.2000>
- Turner, L., Hartmann, S., Fadle, N., Regitz, E., Kemele, M., Kim, Y.-J., Bohle, R. M., Nimmegern, A., von Müller, L., Kempf, V. A. J., Weniger, M. A., Neumann, F., Schneider, N., Vornanen, M., Sundström, C., de Leval, L., Engert, A., Eichenauer, D. A., Küppers, R., ... Pfreundschuh, M. (2020). Lymphocyte predominant cells detect *Moraxella catarrhalis*-derived antigens in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Nature Communications*, 11(1), 2465. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16375-6>
- Tiku, V., Kofoed, E. M., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Reichelt, M., Dikic, I., & Tan, M. W. (2021). Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79966-9>
- Turner, K. L., Cahill, B. K., Dilello, S. K., Gutel, D., Brunson, D. N., Albertí, S., & Ellis, T. N. (2016). Porin loss impacts the host inflammatory response to outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1360–1369. <https://doi.org/10.1128/AAC.01627-15>
- UniProt Consortium. (2020). *UniProtKB-A6TGP1*. RPOC\_KLEP7. <https://www.uniprot.org/uniprot/A6TGP1>
- 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>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4),

1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>

Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of klebsiella pneumoniae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(17), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>

Xiong, K., Chen, Z., Xiang, G., Wang, J., Rao, X., Hu, F., & Cong, Y. (2012). Deletion of yncD gene in Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhi leads to attenuation in mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, *328*(1), 70–77.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02481.x>

Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from Escherichia coli O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), 4414–4420.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>

You, H. S., Lee, S. H., Kang, S. S., & Hyun, S. H. (2020). OmpA of Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 induces pyroptosis in HEp-2 cells, leading to cell-cycle arrest and apoptosis. *Microbes and Infection*, *22*(9), 432–440.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.06.002>

Yun, Y. J., Lee, J. S., Yoo, J. C., Cho, E., Park, D., Kook, Y.-H., & Lee, K. H. (2018). Patterns of rpoC Mutations in Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolated from Patients in South Korea. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, *81*(3), 222.

<https://doi.org/10.4046/trd.2017.0042>

Zhang, P., Ye, Z., Ye, C., Zou, H., Gao, Z., & Pan, J. (2020). OmpW is positively regulated by iron via Fur, and negatively regulated by SoxS contribution to oxidative stress resistance in Escherichia coli. *Microbial Pathogenesis*, *138*, 103808.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103808>

Zhang, Z., Liu, D., Liu, S., Zhang, S., & Pan, Y. (2021). The Role of Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(January), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>

- Zhou, M., Lan, Y., Wang, S., Liu, Q., Jian, Z., Li, Y., Chen, X., Yan, Q., & Liu, W. (2020). Epidemiology and molecular characteristics of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(11), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcla.23459>
- Zoaiter, M., Nasser, R., Hage-sleiman, R., Abdel-sater, F., Badran, B., & Zeaiter, Z. (2021). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce expression and secretion of oncostatin M in AGS gastric cancer cells.