



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

SECRECIÓN DE MICROVESÍCULAS EN UNA CEPA DE ORIGEN CLÍNICO DE
Pseudomonas aeruginosa PORTADORA DE *bla_{IMP}* Y *bla_{GES}* Y DETECCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS IMP Y OprD

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:
DIEGO DÍAZ DE LA CRUZ

DIRECTORA DE TESIS:
D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

CO-DIRECTORA DE TESIS:
D.C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

PUEBLA, PUEBLA, MAYO 2025

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por brindarme las herramientas, el espacio y los recursos necesarios para mi formación profesional.

A la **Facultad de Biotecnología** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** y al **D.C. Alejandro Carabarin Lima**, por el uso del microscopio de epifluorescencia Motic BA410E.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por permitirme desarrollar este proyecto y formarme como profesional. Gracias por haberme dejado ser parte de su historia como centro de desarrollo, enseñanza, investigación e innovación.

Al **Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos**, a la **D.C Margarita María de la Paz Arenas Hernández** y a la **D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña**, por el uso del lector de microplacas ELISA.

Al **Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla**, quien por medio de la **Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores** y el **M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero** posibilitaron el uso de las cepas abordadas en esta tesis (**No. de proyecto: 188.2018**).

Este estudio se realizó con recursos de **Proyectos VIEP 2024**, de su **Programa de Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos** con el proyecto titulado “Estudio del resistoma y moviloma y el papel de las microvesículas de membrana externa en la resistencia de antibióticos de *Acinetobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa*” (**ID proyecto: 00168**)

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por confiar y creer en mí, por alentarme y presionarme para trabajar adecuadamente. Gracias por no rendirse conmigo, por la paciencia y por haberme dado la oportunidad de desarrollar este proyecto. Gracias por escuchar y responder a mis dudas, desde la más sencilla hasta la más compleja. Pero sobre todo, gracias por transmitirme uno de los aprendizajes más importantes a lo largo de mi desarrollo profesional; por enseñarme que la herramienta más importante de un investigador, es su cerebro. Gran parte del crecimiento que tuve como profesionista fue por usted; muchas gracias.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su apoyo incondicional, por estar al pendiente de mi persona en el laboratorio. Gracias por sus sugerencias, comentarios y preguntas, ya que, me ayudaron a enriquecer mi panorama y conocimientos.

A la **D.C. María Cristina González Vázquez**, por compartirme su conocimiento y experiencia sobre *Pseudomonas aeruginosa*, microvesículas y las diversas técnicas enseñadas. Gracias por escuchar mis propuestas y brindarme alternativas para enriquecer mi pensamiento. Gracias por su apoyo y tiempo empleados para conmigo durante mi estancia como tesista. Pero especialmente, gracias por la paciencia y la confianza depositada en mí.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por brindarme conocimientos clave para mi desarrollo profesional a través de las clases impartidas. Gracias por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por transmitirme su entusiasmo a las discusiones proactivas y respetuosas dentro y fuera de clase. Gracias por recordarme mi amor a la ciencia y por responder a cada una de mis dudas.

A la **M.C. Elsy Mariela Martínez Gorgonio**, por compartirme su conocimiento y experiencia sobre microvesículas. Gracias por estar al pendiente de mí en el laboratorio y enseñarme la metodología de varios ensayos y técnicas. Gracias por la paciencia y la confianza depositada en mí. Pero principalmente, gracias por motivarme a dar lo mejor de mí.

A la **D.C. Tania Araujo Ramos**, por inculcarme el pensamiento crítico, por fomentar en mí la curiosidad por el saber. Gracias por demostrarme y recordarme el por qué entré a esta licenciatura.

Al **IBT. José Manuel Díaz de la Cruz** y a la **IBT. Elizabeth Menéndez de la Cruz**, por transmitirme sus experiencias y conocimientos de campo, ciencia e investigación. Gracias por ser mis guías, consejeros y críticos a lo largo de la licenciatura.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis amigos, compañeros y hermanos académicos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad: **Erika, Aline, Pablo, María, Diana, Verónica, Elsy, Jorge**, por haberme acompañado, apoyado y aportado conocimiento de toda índole, tanto dentro y fuera del laboratorio. Les agradezco enormemente su compañía, amistad, y destaco la calidad de persona que son, lo valoro en sobremanera.

A mis amigos del selectivo de Gimnasia Aeróbica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: **Gabriela, Gabriel D., Karime, Emiliano, Pablo, Ruth, Alda, Itza, Yezli, Cristina**, por aceptarme y hacerme sentir como en casa aun estando a cientos de kilómetros de la mía; por haberme impulsado a crecer como persona, como profesional y deportista. Gracias por las experiencias, las risas y el cariño.

A mi amigo, **Gabriel S.**, que pese a ser poco el tiempo convivido entre nosotros, me alentaste, apoyaste y enseñaste a valorarme como persona y ser humano. Sé que te hubieras alegrado mucho por mí.

A los amigos que hice en Puebla: **Derek, Gabriela, Janneth, Itzel, Isaac, Ángel, Emmanuel, Óscar, Isis, Gabriel D., Karime, Emiliano, Gamaliel, Erika, Aline, Andrea, Pablo, David A., David G.**, por ser mi segunda casa. Sin ustedes no sería quien soy ahora. Los llevo, y llevaré conmigo a dondequiera que vaya. Gracias por estar para mí. Ustedes saben lo mucho que los aprecio.

A mis amigos de la infancia: **Isa, Hiram, Alan, Alcober**; a mis amigos de la adolescencia: **Paulina, Brian, Leonardo, Noé, Erasmo, Edwin, Alfonso, Jorge**, por motivarme, apoyarme y alentarme a superar cualquier obstáculo por enfrentar; gracias por el entusiasmo y la notable alegría en cuanto a mis logros; gracias por estar para mí; gracias por ser mi familia.

A mi familia paterna y materna, por ser el apoyo incondicional, por la confianza que depositan en mí. A mis abuelos paternos: **Gilberto y Angelina**, por ser ese cariño, amor y alegría que nunca se acaba. A mi abuelo paterno: **Álvaro**, por haberme transmitido su pasión por la escritura. A mi abuela materna: **Sirenia**, por haberme enseñado empatía a través de mi madre.

A mi hermano **José**; a mi padre **José Manuel**; a mi madre **Evelyn**. Sin ustedes nada hubiera sido posible. Gracias por creer y confiar en mí. Gracias por ser la mano que me levantó durante mis caídas. Gracias por ser ese corazón que late en sinfonía al mío. Gracias por dejarme soñar y forjar mi camino. Este logro no es solamente mío, es de ustedes; es para ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 INFECCIONES ASOCIADAS A LA SALUD (IAAS)	13
1.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	13
1.2.1 <i>Factores de virulencia</i>	14
1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	16
<i>Superfamilia de porinas OprD</i>	16
<i>Resistencia a carbapenémicos</i>	20
<i>Carbapenemasa y Serin-betalactamasas con actividad carbapenemasa</i>	20
<i>Betalactamasa de espectro extendido GES</i>	20
<i>Carbapenemasa IMP</i>	21
1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	21
<i>Microvesículas</i>	22
2. ANTECEDENTES	24
2.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	24
2.2 ANTECEDENTES PARTICULARES	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	29
6. OBJETIVOS	30
6.1 OBJETIVO GENERAL	30
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 ESQUEMA DE TRABAJO	31
7.2 CEPA DE ESTUDIO	32
7.3 CEPA CONTROL	32
7.4 CONDICIONES ÉTICAS.....	33
7.5 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	33
7.5.1 <i>Aislamiento de OMVs</i>	33
7.5.2 <i>Verificación de la esterilidad de las muestras de OMVs purificadas</i>	33
7.5.3 <i>Microscopía de inmunofluorescencia de la porina OprD</i>	34
7.5.4 <i>Microscopía de inmunofluorescencia de la porina OprD acoplada a DAPI</i>	34
7.5.5 <i>Cuantificación de proteínas</i>	34
7.5.6 <i>Perfil de proteínas por SDS-PAGE</i>	35
7.5.7 <i>Inmunodetección de la porina OprD por Western Blot</i>	36
7.5.8 <i>Ensayo de inhibición de carbapenémicos</i>	36
7.5.9 <i>Evaluación inmunogénica y estructural in silico de IMP-62</i>	37

8. RESULTADOS	39
8.1 VISUALIZACIÓN DE OMVs POR TINCIÓN DE GRAM.....	39
8.2 DETECCIÓN DE LA PORINA OPRD EN MUESTRAS DE BACTERIA Y MUESTRAS DE OMVs	41
8.3 PERFIL DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE BACTERIA Y OMVs	45
8.4 DETECCIÓN DE LA PORINA OPRD POR WESTERN BLOT	47
8.5 ACTIVIDAD CARBAPENEMASA DE LA METALO-BETALACTAMASA IMP-62	49
8.6 DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD, ALERGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD DE IMP-62 BIOINFORMÁTICAMENTE	55
8.7 PREDICCIÓN DE EPÍTOPES PARA LINFOCITOS T Y LINFOCITOS B EN IMP-62 <i>IN SILICO</i>	55
8.8 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTE IMP-62 <i>IN SILICO</i>	56
8.9 VISUALIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LOS EPÍTOPES PARA LINFOCITOS T Y LINFOCITOS B EN LA PROTEÍNA IMP-62 <i>IN SILICO</i>	64
9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES	73
11. PERSPECTIVAS	74
12. BIBLIOGRAFÍA	75
13. ANEXOS	81
ACTIVIDADES DESARROLLADAS COMO TESISISTA	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Tipos de vesículas extracelulares (EVs) producidas en bacterias gramnegativas.	22
2	Biogénesis de vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en ingles).	23
3	Tinción de Gram de muestras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y 10 µg de microvesículas de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL imipenem o meropenem.	40
4	Inmunofluorescencias contra la porina OprD en muestras de bacteria y 10 µg de microvesículas de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL imipenem o meropenem.	42
5	Inmunofluorescencias contra la porina OprD en muestras de bacteria con 10 µg de microvesículas de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem, visualizadas con el filtro de fluorescencia y DAPI.	44
6	Identificación del perfil de proteínas en muestras de bacteria y OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con carbapenémicos por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie.	46
7	Identificación de OprD en extractos totales de bacteria y OMVs de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con imipenem	48
8	Ensayo de inhibición de carbapenémicos con bacteria.	50
9	Ensayo de inhibición de carbapenémicos con OMVs.	51
10	Gráficos de los ensayos de inhibición de carbapenémicos realizados con muestras de bacterias y 20 µg de OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de imipenem.	53
11	Gráficos de los ensayos de inhibición de carbapenémicos realizados con muestras de bacterias y 20 µg de OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem.	54
12	Perfil poblacional de linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas a una dosis de IMP-62.	58
13	Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a una dosis de IMP-62.	59
14	Perfil poblacional de linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas a 2 dosis de IMP-62.	60
15	Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a 2 dosis de IMP-62.	61
16	Perfil poblacional de linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas a 3 dosis de IMP-62.	62
17	Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a 3 dosis de IMP-62.	63
18	Epítopes para linfocitos T y linfocitos B de IMP-62 extrapolados en la estructura tridimensional de IMP-15	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Comparación de los sistemas de clasificación de β -lactamasas.	18
2	Características de las cepas PE21.	32
3	Cepa control.	32
4	Curva de albúmina para la cuantificación de proteínas.	35
5	Preparación de gel de Acrilamida (SDS-PAGE).	35
6	Programas para la evaluación inmunogénica in silico.	37
7	Predicción de toxicidad de IMP-62.	55
8	Predicción de alergenicidad e inmunogenicidad de IMP-62.	55
9	Predicción de epítopes para linfocitos T y B de IMP-62.	56
10	Parámetros de hidrolisis de β -lactamasas.	71

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo presente en diversos nichos ecológicos, con la capacidad de desarrollarse en distintos ambientes y condiciones. Es considerada un patógeno oportunista de importancia clínica a nivel mundial, principalmente en las infecciones asociadas a la salud por su tendencia a desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, dentro de ellos los carbapenémicos. Este estudio se realizó con la finalidad de determinar la presencia y el comportamiento de las vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés) liberadas por la cepa PE84 y la cepa clínica PE21 (portadora de *bla*_{GES-32}, *bla*_{IMP-62} y del gen *oprD* con un codón de paro prematuro) ante la presencia de imipenem y meropenem. Se realizó una caracterización fenotípica mediante tinción de Gram; la detección de la porina OprD mediante inmunofluorescencia; la determinación del perfil proteico mediante SDS-PAGE; la detección de la porina OprD mediante Western Blot y la determinación de la capacidad inhibitoria de carbapenémicos. Por otra parte, se determinó el potencial inmunógeno de IMP-62, mediante análisis bioinformáticos con ToxinPred2, AllerTop v2.0, VaxiJen v3.0, NetTepi 1.0, Bepipred 2.0, Bepipred 3.0, C-ImmSim, Swiss Model, Alpha Fold, UniProt, y ChimeraX 1.8.

Los ensayos revelaron que las OMVs liberadas ante la presencia de imipenem y meropenem varían en tamaño y forma de agruparse respecto a condiciones donde ambos antibióticos están ausentes. La presencia de OprD se observó con mayor magnitud en las inmunofluorescencias ante la inducción con imipenem y meropenem, sin embargo, no se encontró la presencia de OprD por Western Blot en OMVs liberadas ante la condición de estrés con imipenem. El análisis por SDS-PAGE en las OMVs mostró una variación dependiente del carbapenémico utilizado, destacando la presencia de bandas de peso molecular >150 kDa en la inducción con imipenem. En el ensayo de inhibición de carbapenémicos se observó que las OMVs liberadas ante la inducción con carbapenémicos tienden a hidrolizarlos ligeramente más en comparación a las OMVs liberadas sin presencia de antibiótico. Finalmente, los análisis bioinformáticos sugirieron que IMP-62 no es toxica ni alergena, que cuenta con capacidad inmunogénica y de inducir una respuesta inmune con tendencia a la formación de células de memoria. Además, se encontró que IMP-62 posee sitios de reconocimiento expuestos para linfocitos T y linfocitos B.

Este estudio resalta que la variabilidad en morfología, contenido proteico y actividad carbapenemasa en las OMVs es dependiente del carbapenémico utilizado. Además, se demostró *in-silico* que IMP-62 es una proteína con capacidad antigénica por lo que se podría usar para obtener anticuerpos anti-IMP-62 para estudios posteriores de las OMVs.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenémicos, porina, inmunofluorescencia, proteína, inmunógeno, epítipo, respuesta inmune.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones Asociadas a la Salud (IAAS)

Las infecciones Asociadas a la Salud (IAAS), anteriormente conocidas como infecciones nosocomiales, son aquellas relacionadas a la admisión en un centro hospitalario en donde el paciente desarrolla un proceso infeccioso posterior a 48 h de haber sido hospitalizado o 30 días después de haber recibido algún tipo de atención médica, tales como: clínicas de medicina familiar, atención ambulatoria, atención domiciliaria y atención médica a largo plazo (Haque *et al.*, 2018). Existen factores de riesgo que propician la adquisición de IAAS, dentro de los cuales se encuentra la contaminación cruzada entre pacientes y personal de salud, pacientes inmunocomprometidos, manejo inadecuado de dispositivos médicos (catéteres, implantes, prótesis, entre otros) y desechos hospitalarios, así como heridas en recuperación post cirugía (Haque *et al.*, 2018)

Las IAAS son ocasionadas en su mayoría por bacterias y hongos, teniendo como algunos ejemplos de estos microorganismos a *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Candida*, levaduras NOS, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxycota*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Haque *et al.*, 2018).

En México durante 2023 se notificaron 58,604 casos de IAAS a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) con un predominio de incidencia en hombres con un porcentaje del 55% y con mayor registro de casos en los grupos de edad correspondientes a mayores de 60 años y menores de 1 año. Dentro de las 58,604 IAAS el segundo microorganismo aislado con mayor frecuencia corresponde a *Pseudomonas aeruginosa*, con un total de 4,949 casos registrados (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), 2024).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo gramnegativo presente en diversos nichos ecológicos, con la capacidad de desarrollarse en superficies abióticas como en suelo y hábitats acuosos, así como de colonizar plantas, animales y humanos. Es considerada un patógeno oportunista perteneciente al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*,

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*) debido a que es capaz de escapar de la actividad de los antibióticos (Botelho *et al.*, 2019), afectando principalmente a individuos inmunocomprometidos y/o con alguna comorbilidad; enfermedad pulmonar obstructiva, quemaduras, sepsis, neumonías asociadas a ventilación mecánica, cáncer, traumas y fibrosis quística (Qin *et al.*, 2022), siendo esta última la de mayor relevancia clínica.

El tratamiento habitual contra infecciones por *P. aeruginosa* se basa en 8 categorías de antimicrobianos: aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, netilmicina, tobramicina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), penicilinas combinadas con inhibidores de b-lactamasas (ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam), monobactams (aztreonam), ácidos fosfónicos (fosfomicina), carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem) y polimixinas (colistina, polimixina B) (Botelho *et al.*, 2019). Desafortunadamente, *P. aeruginosa* presenta resistencia natural ante una gran variedad de antibióticos (cefalosporinas, ampicilina, bencilpenicilina, entre otros) y el número de cepas multidrogo y pandrogo-resistentes se encuentra en constante incremento (Moradali *et al.*, 2017). Aunado a esto, la Organización Mundial de la Salud ha catalogado a *P. aeruginosa* como un organismo de prioridad crítica, específicamente a las cepas resistentes a carbapenémicos (Tacconelli *et al.*, 2018).

1.2.1 Factores de virulencia

Su gran versatilidad como patógeno oportunista es conferida por su extensa variedad de factores de virulencia, que abarca desde componentes de la membrana celular externa (lipopolisacáridos, proteínas) hasta la secreción de exotoxinas, mismas que se encuentran involucradas tanto en la patogénesis del hospedero como en la supervivencia por competencia contra otras bacterias (Qin *et al.*, 2022).

Los factores de virulencia asociada a la membrana celular externa se centra principalmente en la presencia de adhesinas, proteínas para el intercambio de nutrientes y en los lipopolisacáridos (LPS); este último actúa como factor de virulencia principalmente por su composición en lípido A y antígeno O, los cuales forman parte

crucial en la fisiología bacteriana y en el desarrollo de la patogénesis, especialmente en la promoción de la respuesta inmune proinflamatoria por la liberación y producción de TNF- α , IL-1b, IL-8 y la activación de NF-kB (Qin et al., 2022).

Por otro lado, *P. aeruginosa* cuenta con seis sistemas de secreción que se clasifican en dos clases según su ruta de transporte de proteínas: sistemas de secreción de un paso (T1SS, T3SS, y T6SS) y sistemas de secreción de dos pasos (T2SS, T4SS, y T5SS); el primer grupo secreta proteínas directamente del citosol, mientras que el segundo requiere de una breve estancia en el periplasma antes de ser secretada al medio extracelular.

Sistemas de secreción de un paso

El sistema de secreción T1SS se basa en el transporte de proteasas y lipasas, y se encuentra relacionado a la regulación de hierro, mientras que los sistemas de secreción T3SS y T6SS están asociados a la liberación de exotoxinas para inducir la muerte celular de células blanco: las toxinas liberadas por T3SS (ExoS, ExoT, ExoY y ExoU) actúan contra células eucariotas, y las toxinas de T6SS (Tle, Tse, AmpDh3 y VgrG2b) contra otras bacterias. En cuestión de estructura, T3SS se asemeja a una jeringa molecular y T6SS a la cola invertida de un fago (Qin et al., 2022).

Sistemas de secreción de dos pasos

El sistema de secreción T2SS es uno de los menos caracterizados, sin embargo, se cree que su participación se centra en la secreción de proteínas previamente plegadas desde el periplasma, algunas de ellas siendo la guanilato ciclasa ExoA, y las proteasas lasA/B, entre otros factores. A diferencia de los otros sistemas de secreción presentes en *P. aeruginosa*, T5SS se encuentra únicamente en la membrana externa y se le conoce como un autotransportador, el cual exporta proteínas como LepB, LepA y EstA, la cual está relacionada a la producción de biopelículas. Por otra parte, T4SS puede transferir proteínas y complejos nucleoproteicos que se relacionan con la transferencia horizontal de genes, adaptación, evolución, y virulencia (Qin et al., 2022).

1.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Existen dos tipos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*: la resistencia intrínseca que es aquella codificada de forma intrínseca en su genoma, y la resistencia adquirida por medio de transferencia genética horizontal. Dentro de estos mecanismos de resistencia se encuentran la reducción de la permeabilidad de la membrana externa, la utilización de enzimas que modifican o inactivan antibióticos, las bombas de eflujo, la modificación de la diana molecular (expresión, estructura), y la formación de biopelículas (Qin et al., 2022).

Resistencia intrínseca

La principal característica que le confiere resistencia intrínseca a *P. aeruginosa* es la baja permeabilidad de su membrana externa, la producción de las betalactamasas AmpC y Oxa-50 (Botelho et al., 2019; Lister et al., 2009), y la presencia de bombas de eflujo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY y MexEF-OprN) (Botelho et al., 2019; Qin et al., 2022).

La cefalosporinasa AmpC se produce en bajas cantidades de forma constitutiva en *P. aeruginosa*, sin embargo, cuando se encuentra sobreexpresada confiere resistencia a todos los betalactámicos a excepción de los carbapenémicos (Lister et al., 2009). Por otro lado, la expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM es también de forma constitutiva y es responsable de la baja susceptibilidad a los betalactámicos y fluoroquinolonas (Botelho et al., 2019). Por último, la oxacilinasas OXA-50 es característica de todas las cepas de *P. aeruginosa*, confiriéndole un perfil de hidrólisis de espectro estrecho a antibióticos como ampicilina, bencilpenicilina, cefaloridina, cefalotina, nitrocefina, y piperacilina (Girlich et al., 2004).

Resistencia adquirida por mutaciones

Superfamilia de porinas OprD

P. aeruginosa cuenta con proteínas en la membrana externa que se encargan del transporte inespecífico y específico de moléculas, encontrándose en este último la superfamilia de porinas OprD (Qin et al., 2022), mismo que se encuentra subclasificado en dos grupos; OccD (internalización de aminoácidos básicos) y OccK (internalización

de moléculas cíclicas con cargas negativas). Dentro de las porinas OprD se encuentra la porina OccD1, la cual interviene en la entrada de carbapenémicos (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

Estructuralmente las porinas OprD están conformadas por 18 láminas- β y 8 giros (L1-L8), dentro de los cuales L2 y L3 funcionan como sitio de entrada y unión de aminoácidos básicos, así como de imipenem (Chevalier *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2012). Por otro lado, los giros L1, L5, L6, L7 y L8 no están involucrados en la internalización de imipenem, sin embargo, L5, L7 y L8 intervienen en la reducción de la concentración intracelular de diversos antibióticos (Li *et al.*, 2012).

La presencia de mutaciones en las porinas OprD ocasionan un cambio en la permeabilidad de la membrana que afecta selectivamente la internalización de los carbapenémicos; dichas mutantes van desde: sustituciones aminoacídicas, delección de nucleótidos, la presencia de un codón de paro prematuro, así como la pérdida de la porina por la intervención de una secuencia de inserción que ocasiona la terminación prematura de la traducción (Schiavano *et al.*, 2017a). Pese a que tanto el meropenem como el imipenem son transportados por OprD, las mutaciones únicamente confieren resistencia a este último, mientras que la susceptibilidad al primero permanece igual (Chevalier *et al.*, 2017).

Por otro lado, la expresión de OprD se puede ver afectada indirectamente por la regulación positiva de genes *mexEF-oprN*, *czcR*, *czcCBA* y *lysR* asociados a las bombas de eflujo, así como de las proteínas reguladoras MexS y MexT, las cuales regulan negativamente a OprD (Chevalier *et al.*, 2017; Horcajada *et al.*, 2019). En lo que respecta a CzcR, su mecanismo de regulación negativa se fundamenta en la unión a la región de control del gen *oprD* (Chevalier *et al.*, 2017).

Resistencia adquirida por transferencia horizontal

P. aeruginosa puede obtener resistencia a antibióticos como aminoglucósidos y betalactámicos por medio de transferencia horizontal de genes a través de este mismo género o diferentes géneros o especies bacterianas (Qin *et al.*, 2022).

Enzimas betalactamasas

Debido a la alta prevalencia y variaciones de enzimas betalactamasas que confieren resistencia a distintas clases de antibióticos, Ambler y Bush-Jacoby realizaron esquemas para clasificar las betalactamasas (Tabla 1); la de Ambler se basa en la secuencia aminoacídica de las enzimas, mientras que Bush-Jacoby en el perfil de hidrólisis del sustrato (Bush & Jacoby, 2010).

Tabla 1. Comparación de los sistemas de clasificación de β -lactamasas

Bush-Jacoby	Ambler	Sustratos definidos	Inhibidos por EDTA	Inhibidos por ácido clavulánico o tazobactam	Representativos	
1	Clase C	Cefalosporinas	(-)	No	P99	
		Cefamicinasas		Si	FOX-4	
2	Clase A		(-)	Si		
2a				Penicilinas	Si	PC1
2b					Si	TEM-1, SHV-1
2be				Cefalosporinas	Si	TEM-10, SHV-2
2br					No	TEM-30
2ber					No	TEM-50
2ce					Si	RTG-4
2d	Clase D	Penicilinas	(-)	Variable	OXA-1	
2de		Cefalosporinas			OXA-11	
2df		Carbapenémicos			OXA-23	
2e					Si	CepA
2f		Carbapenémicos			Variable	KPC-2
3	Clase B	Carbapenémicos	(+)	No		
3a	B1				NDM-1, VIM-2, IMP-1	
3b	B2				CphA	
3a	B3				L1	

Tomado de Bonomo, 2017.

Clase A (Betalactamasas de espectro extendido: BLEE)

Históricamente esta clasificación incluía únicamente penicilinasas con un perfil de hidrólisis de espectro estrecho, sin embargo, la introducción de oximino-cefalosporinas

e inhibidores de betalactamasas provocó la selección de variantes de penicilinasas, dando origen a las denominadas betalactamasas de espectro extendido, mejor conocidas como BLEE (algunas variantes de SHV, TEM, CTX-M, KPC, GES, IMI/Nmc-A y SME). Estas BLEE no solamente poseen la capacidad de hidrolizar penicilinas, sino también aminopenicilinas, cefalosporinas, y algunas de ellas carbapenémicos (IMI/Nmc-A, SME, y algunas variantes de KPC y GES) (Bahr *et al.*, 2021).

CLASE B (Metallo-betalactamasas)

Las metalo-betalactamasas (MBL) son enzimas dependientes de zinc y se caracterizan por su inusual espectro de hidrolisis, siendo capaz de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, y algunos inhibidores de serín-betalactamasas como el ácido clavulánico. Además, solo el 3% de MBL son exclusivamente carbapenemasas. Por otro lado, existen diferencias significativas entre las MBL, por lo que se derivó una subclasificación: B1 (ej. familias NDM, VIM e IMP), B2 (CphA, Sfh-I), y B3 (L1) (Bahr *et al.*, 2021).

CLASE C (Cefalosporinasas)

Las betalactamasas de clase C son en su mayoría cefalosporinasas con la capacidad de degradar bencilpenicilinas y penicilinas, y en menor medida cefamicinas, oximino-cefalosporinas, carbapenémicos y aztreonam. Las enzimas pertenecientes a esta clase con origen en el cromosoma generalmente son conocidas como AmpC, sin embargo, la nomenclatura específica hace referencia al microorganismo de origen (ej. del inglés ADC: *Acinetobacter*-derived cephalosporinase; PDC: *Pseudomonas*-derived cephalosporinase). Por otro lado, existen cefalosporinasas de origen plasmídico, dentro de ellas se encuentran las familias FOX, CMY, MIR y DHA (Bahr *et al.*, 2021).

CLASE D (Oxacilinasas)

Las enzimas pertenecientes a la clase D son habitualmente conocidas como oxacilinasas (OXAs) debido a que inicialmente fueron identificadas por su capacidad para hidrolizar oxacilinas, sin embargo, no todas las betalactamasas dentro de esta clasificación poseen tal cualidad, por el contrario, las OXAs tienen espectros de hidrolisis variables, algunas con espectros estrechos mientras que otras son

clasificadas como BLEE, e inclusive existen variantes con la capacidad de hidrolizar carbapenémicos (Bahr *et al.*, 2021).

Resistencia a carbapenémicos

Los carbapenémicos como el imipenem y el meropenem, pertenecen a la familia de los betalactámicos, sin embargo, se diferencian dentro de estos por tener un átomo de carbono en su anillo en lugar de uno de azufre, así como dos iones metálicos en su sitio activo, el cual usualmente es zinc (Zn^{2+}) (Escandón-Vargas *et al.*, 2017). Estos actúan como bactericidas por la inhibición de las transpeptidasas que realizan el ensamble del peptidoglicano a nivel de la porción externa de la membrana plasmática.

La resistencia a imipenem y meropenem en *P. aeruginosa* está mediada por diversos mecanismos, tales como; la reducción de la concentración del antibiótico por medio de la sobreexpresión de bombas de eflujo (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK, MexVW) (Hassuna *et al.*, 2020; Tenover *et al.*, 2022), de las cuales MexAB-OprM (Tenover *et al.*, 2022), MexCD-OprJ, y MexXY-OprM solo afectan a meropenem pero no a imipenem (Hassuna *et al.*, 2020); la sobreproducción de carbapenemasas de Clase A (SME, IMI, NMC-A, GES, SFC) como de Clase B (IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, KHM) (Hassuna *et al.*, 2020; Kocsis *et al.*, 2021; Tenover *et al.*, 2022); así como por mutaciones en la porina OprD (Qin *et al.*, 2022)

Carbapenemasa y Serin-betalactamasas con actividad carbapenemasa

Existen enzimas con actividad carbapenemasa pertenecientes a la Clase A, B y D según la clasificación de Ambler. Las serin-betalactamasas de clase D con actividad carbapenemasa (OXA-40, OXA-181, OXA-191) no son tan comunes en *P. aeruginosa* como las de Clase A (variantes de GES), sin embargo, la betalactamasa OXA-50 se encuentra presente en cromosoma y fúngica como referente de la especie (Gómez-Martínez *et al.*, 2023). Del mismo modo, es más común encontrar carbapenemasas de Clase B en *P. aeruginosa* respecto a las de Clase D, sin embargo, no excluye la posibilidad de su presencia en cepas resistentes a carbapenémicos.

Betalactamasa de espectro extendido GES

La betalactamasa Guayana de espectro extendido (GES por sus siglas en inglés), es una carbapenemasa perteneciente al grupo de clase A según la clasificación de

Ambler. Inicialmente su actividad hidrolítica tenía afinidad únicamente hacia cefalosporinas y un amplio espectro de betalactámicos, excluyendo a los carbapenémicos, sin embargo, algunas variantes como *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}, *bla*_{GES-20} entre otras (Halat & Moubareck, 2022) adquirieron la capacidad de hidrolizar carbapenémicos debido a mutaciones aminoacídicas puntuales en su sitio activo (Escandón-Vargas *et al.*, 2017).

Carbapenemasa IMP

Dentro de las betalactamasas, la imipenemasa (IMP por sus siglas en inglés) es una carbapenemasa que pertenece al grupo de clase B según la clasificación de Ambler, teniendo en su estructura un distintivo de dos moléculas de zinc que forman parte del grupo catalítico de la enzima; teniendo la capacidad de hidrolizar un amplio espectro de fármacos betalactámicos, tales como; penicilinas, cefalosporinas, y carbapenémicos (Escandón-Vargas *et al.*, 2017). Esta actividad enzimática puede ser inhibida por EDTA (Pongchaikul & Mongkolsuk, 2022).

Hasta 2022 se registraron 88 variantes de IMP a nivel mundial, presentándose principalmente en bacterias gramnegativas (Pongchaikul & Mongkolsuk, 2022) como *P. aeruginosa*. Además, IMP puede ser transferida entre microorganismos por medio de integrones de clase 1 o clase 3, así como por plásmidos (Gómez-Martínez *et al.*, 2022). Por otro lado, en un estudio realizado por López en 2021, se encontró que MBLs como IMP pueden ser transportadas dentro de vesículas de membrana externa de *Escherichia coli* (López *et al.*, 2021).

1.4 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EVs) son estructuras lipídicas que se correlacionan a la bacteria de origen, sea esta gramnegativa o grampositiva. Las EVs pueden tener una gran variedad de funciones que dependen de la bacteria que las ha producido y liberado, dentro de estos se encuentran: comunicación célula-célula, entrega de biomoléculas a otros microorganismos o células, así como la supervivencia y entrega de factores de virulencia en bacterias patógenas (Marinacci *et al.*, 2023).

Existe una clasificación para las EVs dependiente del mecanismo de biogénesis en bacterias gramnegativas (Figura 1): el primero se basa en la secreción activa de

bacterias vivas, resultando en la formación de vesículas de membrana externa (OMVs); el segundo se fundamenta en la secreción estimulada por la actividad hidrolítica de enzimas, dando como resultado subpoblaciones de vesículas, encontrándose dentro de estas las vesículas de membrana externa-interna (OIMVs) y las vesículas derivadas de la lisis explosiva de la membrana (EMVs)(Marinacci *et al.*, 2023).

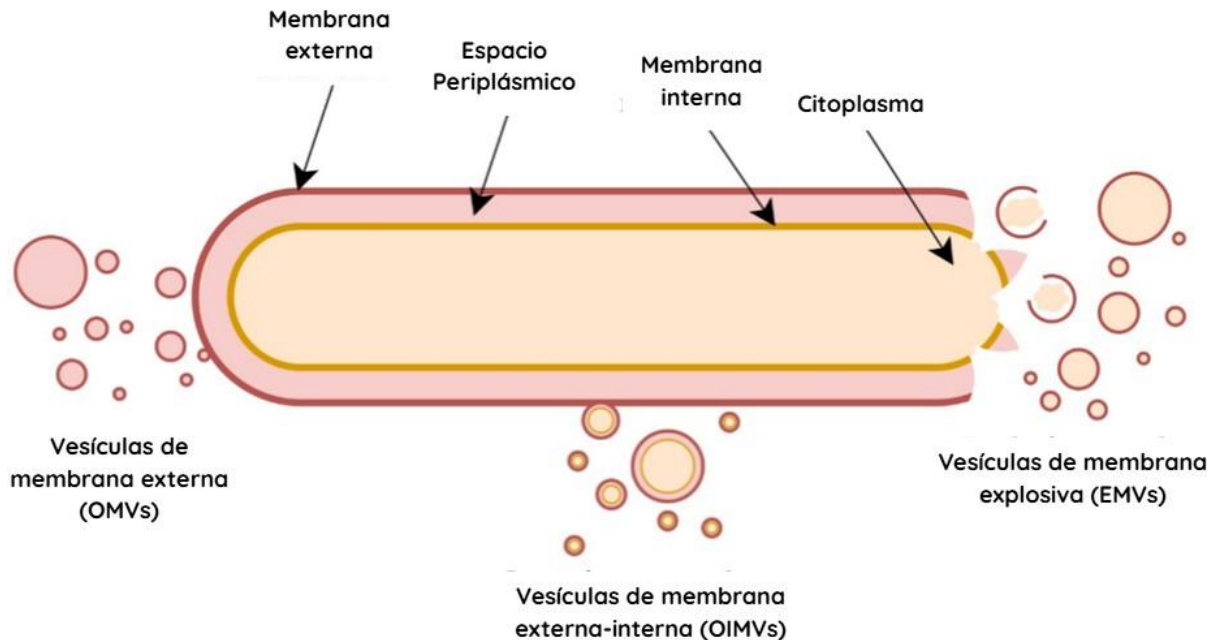


Figura 1. Tipos de vesículas extracelulares (EVs, por sus siglas en inglés) producidas en bacterias gramnegativas. Tomado y traducido de Marinacci *et al.*, 2023.

Microvesículas

Las vesículas de la membrana externa o microvesículas (OMV por sus siglas en inglés) de las bacterias gramnegativas son estructuras derivadas de la membrana externa formados por lipopolisacáridos, proteínas de la membrana celular externa (OMP) y componentes periplásmicos, tales como; metabolitos, proteínas de virulencia, proteasas, fosfolipasas (fosfolipasa C), fosfatasa (fosfatasa alcalina), β -lactamasas, peptidoglicano hidrolasa, señalizadores moleculares, ADN (superficial o interno), ARN, entre otros (Schiavano *et al.*, 2017). Se ha reportado que estas contribuyen directamente en interacciones bacteria-bacteria y bacteria-célula eucariota, así como

en la formación de biopelículas, *quorum sensing*, supervivencia, depredación competitiva, inmunomodulación y resistencia a antibióticos por transferencia horizontal (Cooke *et al.*, 2020).

A nivel estructural, las OMV están constituidas de fragmentos de la membrana externa de bacterias gramnegativas, sin embargo, existen casos particulares en los que éstas poseen más de una capa; presentando morfología variante, desde OMV con presencia de partes de la membrana interna (I-OMV: *inner-outer membrane vesicle*), multilaminares (M-OMV: *multilamellar-outer membrane vesicles*), hasta con pequeñas vesículas internas (G-OMV: *group intravesicular-outer membrane vesicles*) (Tashiro, 2022).

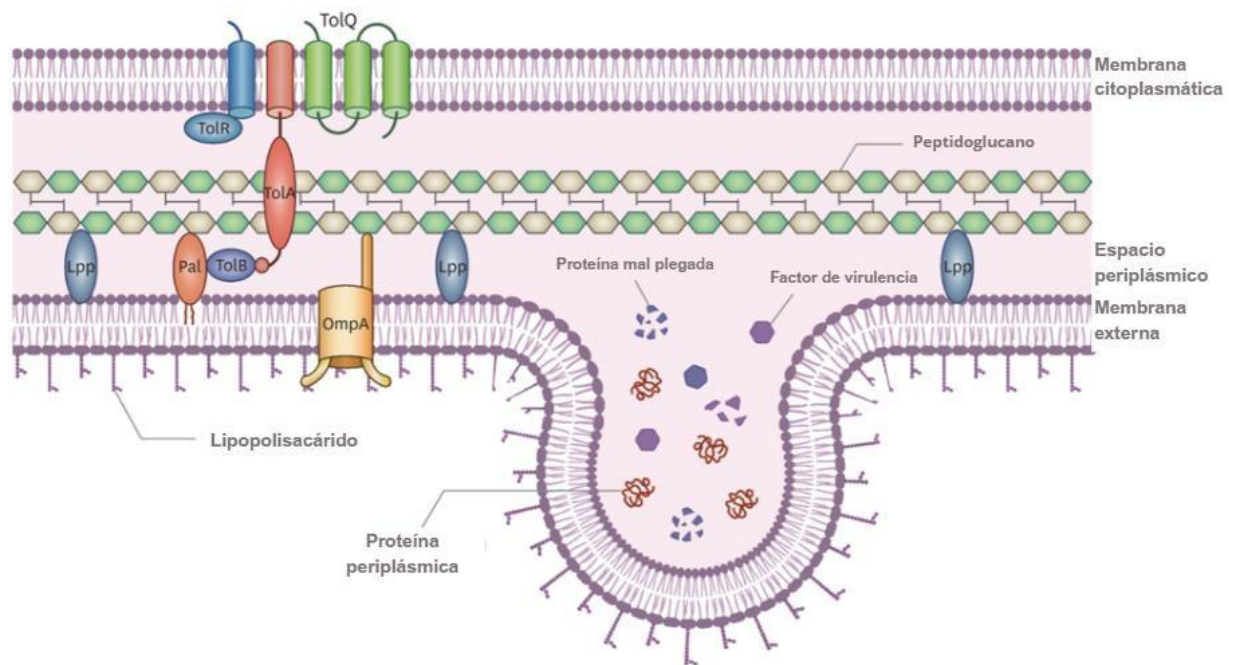


Figura 2. Biogénesis de vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés). Las OMVs son generadas de la membrana externa por varios mecanismos, dentro de ellos la reducción de los enlaces cruzados y la remodelación del LPS. Algunas proteínas periplásmicas como factores de virulencia y desechos celulares como proteínas mal plegadas son empaquetadas dentro del cargo de las OMVs liberadas. Tomado y traducido de Kim *et al.*, 2023.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes generales

La aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR por sus siglas en inglés) de *P. aeruginosa* alrededor del mundo se ha convertido en una problemática de salud pública a nivel global por su alta correlación a espacios de tipo clínico como centros de salud u hospitales.

Anteriormente el tratamiento idóneo para infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* MDR eran los carbapenémicos, teniendo una sensibilidad al meropenem de 80-91% y al imipenem de 76-88%(Morales-Aguirre & Andrade-Velásquez, 2006), sin embargo, en la actualidad se han registrado cepas altamente resistentes a esta clase de antibióticos, al igual que a una gran variedad de betalactámicos (Qin et al., 2022), siendo Latinoamérica la región con cepas generalmente más resistentes en comparación a Estados Unidos y Asia (Morales-aguirre & Andrade-velásquez, 2006).

La aparición de cepas MDR se ha convertido en un problema de interés clínico y de salud pública a nivel global, emergiendo a la par del incremento en la tasa de consumo de antibióticos junto a la poca regulación de estos, hecho que representa un factor crítico en el desarrollo de esta problemática. Un caso aislado que sirve como ejemplo es el de México, el cual se posiciona como el mayor consumidor de antibióticos registrado en Latinoamérica (Arias-Flores et al., 2016), además de contar con cepas de *P. aeruginosa* que presentan las carbapenemasas KPC, GES, IMP y VIM (Escandón-Vargas et al., 2017).

La producción de OMVs en *P. aeruginosa* es de origen multifactorial y de contenido variado, sin embargo, se encuentra estrechamente relacionado a mecanismos de virulencia y su capacidad de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, ante una situación de estrés por antibióticos betalactámicos, los daños consecuentes a la membrana externa activan vías de señalización pertenecientes al sistema de *quorum sensing* PQS, provocando la curvatura de la membrana y culminando en la formación de OMVs (Jurado-Martín et al., 2021). En un estudio realizado en biopelículas de *P. aeruginosa* se propuso acorde a los resultados que el empaquetado de OprD en OMVs es un mecanismo para reducir la biodisponibilidad de la porina en la membrana externa, y

por ende, disminuir indirectamente la sensibilidad a carbapenémicos evitando la entrada del antibiótico al medio intracelular en la bacteria (Park *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Metruccio en 2016, se descubrió que el contacto con lisozima y secreciones de las mucosas liberadas por el epitelio ocular promueve la secreción de OMVs como método de preparación para la adhesión bacteriana demostrando que durante el proceso infeccioso de *P. aeruginosa* las OMVs se encuentran involucradas en la fase de adherencia (Metruccio *et al.*, 2016).

Por otro lado, la secreción de OMVs se han reportado que están implicadas en mecanismos de competencia o supervivencia ante el contacto con distintos nichos bacterianos, por ejemplo; Suh en 2024 demostró que OMVs extraídas de una cepa de *P. aeruginosa* inhibía el crecimiento de una cepa de *Acinetobacter baumani* (Suh *et al.*, 2024), mientras que Augustyniak en 2022 demostró que la liberación de OMVs otorga resistencia pasiva ante la infección por fagos (Augustyniak *et al.*, 2022).

2.2 Antecedentes particulares

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad se han estudiado aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de distintas muestras biológicas (esputo, orina, sangre, entre otras secreciones), encontrando cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos. Por ejemplo, la cepa PE84 que fue aislada de una muestra de expectoración de un paciente en el área de pediatría del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla presentó sensibilidad a imipenem y meropenem, así como a algunas penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, monobactámicos y lipopéptidos.

Por otro lado, López-García en el 2018 analizó la cepa PE21 aislada de una muestra de esputo de un paciente en el área de Medicina Interna del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, encontrando que es portadora de la carbapenemasa GES-32 y de un integrón de clase I que acarrea la carbapenemasa IMP-62 y la betalactamasa OXA-2 (López-García *et al.*, 2018).

Recientemente, Gómez-Martínez en 2023 caracterizó los plásmidos y el resistoma de aislados clínicos de *P. aeruginosa*, incluyendo la cepa PE21, misma que fue

secuenciada con Illumina Nextseq y minION, generando con ello un ensamblaje híbrido, detectando lo siguiente (Gómez-Martínez, 2023):

- Un megaplásmido pPE21GES de 406,435 pb con un contenido de G+C de 56.9% y 416 marcos de lectura abiertos, estando constituido por 4 módulos: adaptación, replicación, estabilidad y transferencia; teniendo en el primero un integrón de clase 1 que es portador de los genes *bla*_{GES-32}, *aacA33* y *aadA1*. Además, se identificaron los genes de resistencia a aminoglucósidos *aph(3'')-I*, *aph(6)-Id* y *aph(3')-VII*, una región de resistencia a levofloxacino, un operón de mercurio (*merRTPCADE*), un operón de resistencia a telurito (*terDABCDD*) y los genes *mexC*, *mexD* y *oprJ* de la bomba de eflujo MexCD-OprJ.
- El plásmido pPE21IMP integrado al cromosoma, constituido por 4 módulos (adaptación, replicación, estabilidad y transferencia) y por un integrón de clase 1 con los genes *aacA7*, *bla*_{IMP-62}, *qacH*, *aacA4*, *aadA1*, *bla*_{OXA-2} y *aadA1*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales ocurren con gran frecuencia en el ámbito hospitalario en México (Arias-Flores *et al.*, 2016; Morales-aguirre & Andrade-Velásquez, 2006; Vilar-Compte *et al.*, 2003); debido a la contaminación del equipo médico, por el uso de agua y antisépticos contaminados (Vilar-Compte *et al.*, 2003), así como por el contacto directo con zonas contaminadas. Esta adquisición suele ser más común en las unidades de cuidados intensivos (UCI), pero, también ocurre en áreas postoperatorias (Vilar-Compte *et al.*, 2003), de especialidad y ambulatorias (Arias-Flores *et al.*, 2016).

Acorde al Anuario de Morbilidad en México en 2022, la incidencia global de infecciones nosocomiales se reporta en un 14.26, en la que la Ciudad de México se sitúa como primer lugar (62.91), mientras que la ciudad de Puebla se ubica en la posición decimoquinta (13.84); esto acorde a una tasa por cada 100,000 habitantes. Dentro de los agentes causales, *P. aeruginosa* tiene una prevalencia de un 19.9%, siendo más frecuente en las unidades médicas de alta especialidad (UMAE) con un porcentaje de 11.8%, en contraste con las unidades médicas del IMSS y las unidades médicas de segundo nivel (10.9%, 10.6%) (Arias-Flores *et al.*, 2016).

En la capital del estado de Puebla, se han registrado casos de resistencia a carbapenémicos en el Hospital Regional del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Puebla (I.S.S.S.T.E), específicamente en la cepa PE21 aislada del mismo, de una muestra de esputo de un paciente conllevando un proceso infeccioso a nivel respiratorio, presentando la carbapenemasa IMP-62 y otras betalactamasas como GES-32 y OXA-2 (Gómez-Martínez, 2023; López-García *et al.*, 2018).

En la actualidad el avance tecnológico para la determinación de fenotipos de resistencia ha permitido la identificación de cepas portadoras de BLEE y carbapenemasas, sin embargo, en México este conocimiento no ha sido extrapolado a la liberación y actividad en OMVs de *P. aeruginosa*. Por ello, es de gran importancia estudiar la relación de las OMVs y el rol que emplean en los procesos de resistencia a antibióticos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a carbapenémicos en el ámbito clínico representa una gran problemática de salud pública, ya que, este tipo de betalactámicos son considerados de última elección como tratamiento a infecciones bacterianas por cepas MDR. Desafortunadamente, la emergencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos ha generado dificultades en el manejo y en la resolución de pacientes cursando un proceso infeccioso, además, el uso descontrolado e inadecuado de este antibiótico ha promovido la selección y propagación de dichas cepas.

Por otro lado, *P. aeruginosa* cuenta con la capacidad de liberar OMVs ante una condición de estrés celular por antibiótico, las cuáles presentan un cargo proteico distinto a aquellas liberadas en condiciones sin estrés celular (Hadadi-Fishani *et al.*, 2021). Asimismo, las OMVs liberadas por *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran involucradas en la transferencia horizontal de genes; en 2023 Johnston encontró que las OMVs liberadas por *P. aeruginosa* en estado planctónico y aquellas derivadas de biopelículas facilitan la transferencia genética de ADN plasmídico (Johnston *et al.*, 2023).

Aunado a lo anteriormente mencionado, las OMVs liberadas por *P. aeruginosa* pueden estar estrechamente involucradas en los fenotipos de resistencia a carbapenémicos, especialmente ante una situación de estrés celular por exposición a los mismos, tal como sucede en un ambiente hospitalario. Es por ello por lo que, el estudio de las OMVs liberadas por la cepa PE84 con sensibilidad a imipenem y meropenem en comparación a la cepa PE21 portadora de *bla*_{GES-32}, *bla*_{IMP-62}, permitirá la comprensión de su contribución a este fenotipo de resistencia

5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

La inducción de condiciones de estrés celular generado por imipenem y meropenem en la cepa clínica PE21 de *P. aeruginosa* ocasiona la liberación de microvesículas con la presencia de la porina OprD y con actividad carbapenemasa por parte de la Metallo-beta-lactamasa IMP.

OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

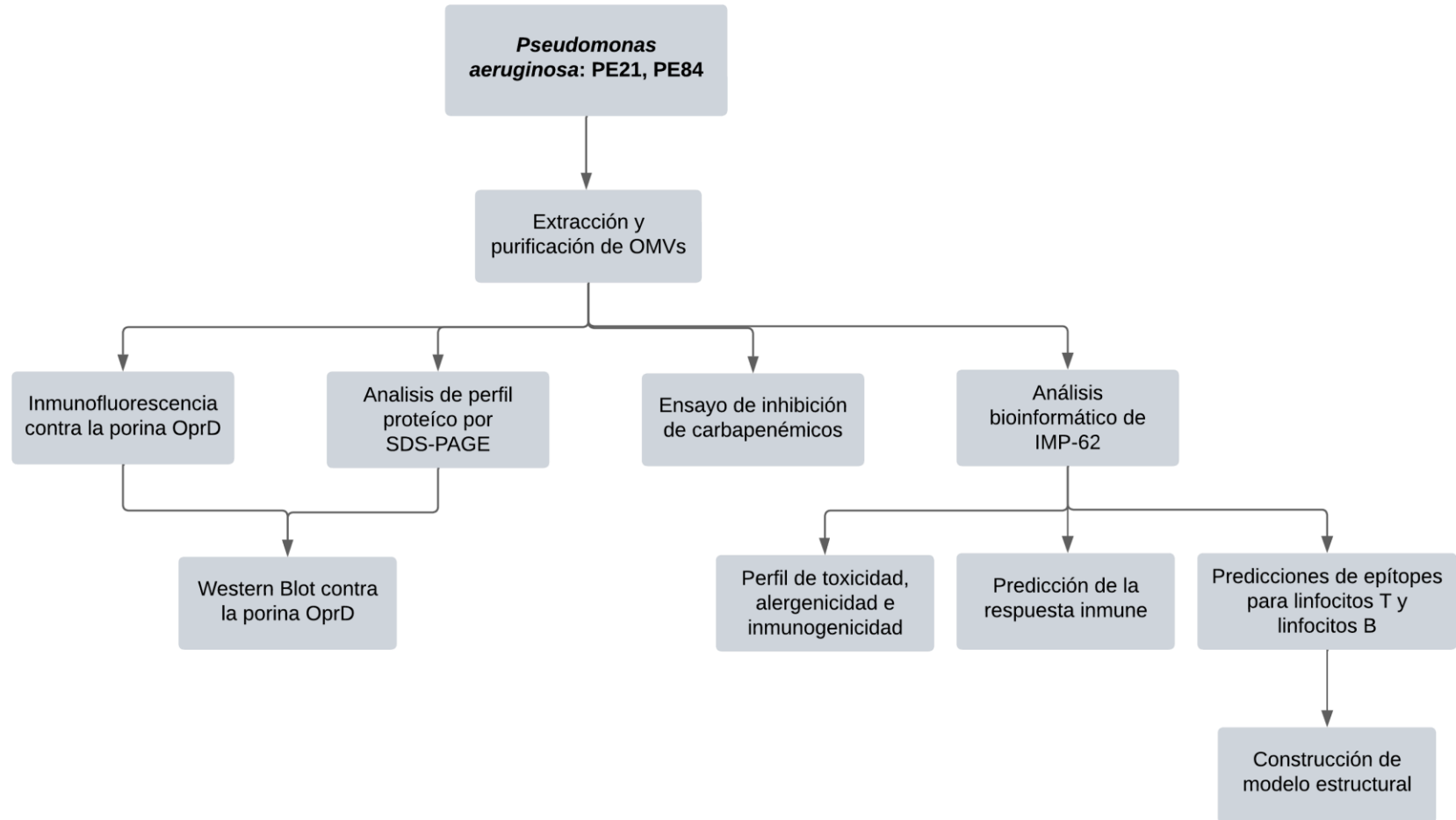
Extraer microvesículas liberadas por *P. aeruginosa* y determinar la presencia de la porina OprD y la actividad de la Metallo-betalactamasa IMP.

6.2 Objetivos particulares

1. Obtener microvesículas de las cepas clínicas PE84 (sensible a carbapenémicos) y PE21 (portadora de *bla*_{IMP-62} y *bla*_{GES-32}) de *P. aeruginosa* con y sin inducción con imipenem y meropenem.
2. Visualizar la presencia de la porina OprD en microvesículas y muestras de cepas de *P. aeruginosa*.
3. Determinar el perfil de proteínas en microvesículas liberadas por *P. aeruginosa*.
4. Detectar la expresión de la porina OprD en extractos proteicos de microvesículas y en las cepas PE84 y PE21 de *P. aeruginosa*.
5. Determinar la actividad de la Metallo-betalactamasa IMP en microvesículas de *P. aeruginosa*.
6. Evaluar *in silico* la capacidad inmunogénica de la Metallo-betalactamasa IMP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Esquema de trabajo



7.2 Cepa de estudio

Se trabajó con una cepa problema MDR-RC de *P. aeruginosa*, aislada del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla en 2013 e identificada por medio del sistema semiautomatizado VITEK-2. La cepa fue recuperada de un criovial (1 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y glicerol al 10%) que se encontraba almacenado a -70°C y se sembró un inóculo en agar TSA por estría cruzada, incubando durante 18 horas a 37°C.

La cepa fue previamente estudiada por López-García *et al.*, 2018 y Gómez-Martínez, 2023; sus características se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las cepas PE21

Cepa	Servicio	Origen de aislamiento	Genotipo de resistencia	No. plásmidos	Tamaño	MOB
PE21	MI	Expectoración	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aadA1b</i> , <i>aph(3')-Via</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>aadA6</i> , <i>aac(6')-33</i> , <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>catA1</i> , <i>bla_{GES-32}</i> , <i>bla_{OXA-2}</i> , <i>bla_{IMP-62}</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>ampC</i> , <i>fosA</i>	1	368 kb	MOB _{P11} , MOB _{H2}

7.3 Cepa control

En los experimentos realizados se utilizó una cepa control cuyas características se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Cepa control

Cepa	Microorganismo	Características	Donada por
PE84	<i>P. aeruginosa</i>	Control negativo: sensible a imipenem y meropenem.	LMHyC-CICM, BUAP

7.4 Condiciones éticas

Las cepas por trabajar fueron obtenidas en el marco de los protocolos aprobados por el comité de ética e investigación del hospital regional ISSSTE (188.2018)

No se requirió consentimiento informado, ya que las muestras fueron tomadas de forma rutinaria y solamente se trabajará con las cepas aisladas. Aunado a esto, los datos de los pacientes se mantienen en anonimato.

7.5 Técnicas y procedimientos

7.5.1 Aislamiento de OMVs

Se realizaron preinóculos en tubos de 5 mL con caldo BHI, utilizando cultivos recién sembrados en placa de medio TSA de las cepas PE21 y PE84. Se adicionó 8 µg/µL de imipenem o meropenem al tubo con la cepa problema, quedando de la siguiente manera: PE84, PE21 y PE21 inducida con el carbapenémico (8 µg/µL). Las muestras se dejaron incubar en agitación a 37°C por 24 hrs. Posteriormente se transfirieron los preinóculos a matraces con 50 mL con caldo BHI, añadiendo 8 µg/µL del carbapenémico a la muestra previamente inducida e incubando en agitación a 37°C por 16 hrs.

Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 7,000 rpm x 25 min, recuperando los sobrenadantes y filtrándolos sucesivamente por membranas de 0.65 µM, 0.45 µM y 0.22 µM. Después, se adicionó a los filtrados acetona fría en una relación 1:1 y se dejaron reposar en refrigeración a 4°C por una noche. Al día siguiente, los extractos con acetona se centrifugaron a 7,000 rpm x 15 min y se lavaron las pastillas obtenidas con PBS 1X, repitiendo este proceso tres veces. Por último, las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 500 µL de PBS, almacenándolas en refrigeración a 4°C (Espinosa Hernández, 2024).

7.5.2 Verificación de la esterilidad de las muestras de OMVs purificadas

A las muestras de OMVs purificadas se les hizo tinción de Gram, y fueron observadas bajo el microscopio a 100x. Asimismo, se realizaron sembrados en agar TSA de las muestras de OMVs obtenidas y se dejaron incubar a 37°C por 24 hrs para denotar la ausencia de crecimiento bacteriano.

7.5.3 Microscopía de inmunofluorescencia de la porina OprD

Se realizaron cinco lavados con PBS 1X a muestras de bacteria previamente sembradas en agar TSA e incubadas a 37°C por 24 hrs. Las muestras de bacteria y muestras con 10 µg de OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducidas con carbapenémico fueron fijadas en portaobjetos con paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1X y se limpiaron con NH₄Cl por 15 min a temperatura ambiente, repitiendo nuevamente los tres lavados con PBS 1X. Después, se realizó un bloqueo con albúmina al 2% por 1 hr a temperatura ambiente y se colocaron los anticuerpos policlonales anti-rOprD (obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, (González-Vázquez *et al.*, 2021) diluidos en PBS (1:100). Los portaobjetos se incubaron a 4°C por una noche en cámara húmeda.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionó el segundo anticuerpo marcado con FITC diluido en PBS (1:1000), incubando a 37°C por 1 hora protegido de la luz. Después, las muestras fueron lavadas 5 veces con PBS y se realizó un montaje con 8 µL de Vectashield®, cubriendo las muestras con cubreobjetos y sellándolas con barniz de uñas. Finalmente, las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Motic BA410E. Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN blue edition 3.4 (Carl Zeiss microscopy GmbH).

7.5.4 Microscopía de inmunofluorescencia de la porina OprD acoplada a DAPI

Utilizando muestras de bacteria previamente lavadas con PBS adicionadas con 10 µg de OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem, se siguió el mismo procedimiento del apartado **7.5.3**, realizando el montaje con Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1200-10) Vectro Laboratories y observando las muestras en un microscopio de epifluorescencia (Motic). Las imágenes fueron procesadas en el software ZEN blue edition 3.4 (Carl Zeiss microscopy GmbH)

7.5.5 Cuantificación de proteínas

En una placa para ensayo de ELISA de 96 pozos se realizó una curva con Albumina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés) por triplicado (tabla 4). Para la cuantificación de proteínas en las muestras de OMVs se utilizó la concentración de 1

µg y se realizó por duplicado. Después, se adicionaron 40 µL de reactivo Bradford a cada pocillo y se dejó incubar por 5 min. Posteriormente, se leyeron los resultados en un lector de placa de ELISA. Se realizó la cuantificación mediante una curva de albumina y aplicando la ecuación de mínimos cuadrados.

Tabla 4. Curva de albúmina para la cuantificación de proteínas

Pocillo	BSA (0.1 mg/mL)	Agua	Bradford	Concentración BSA
1	0 µL	160 µL	40 µL	0 µL/0 µg
2	5 µL	155 µL	40 µL	5 µL/0.5 µg
3	10 µL	150 µL	40 µL	10 µL/1 µg
4	20 µL	140 µL	40 µL	20 µL/2 µg
5	30 µL	130 µL	40 µL	30 µL/3 µg
6	40 µL	120 µL	40 µL	40 µL/4 µg
7	50 µL	110 µL	40 µL	50 µL/5 µg
8	60 µL	100 µL	40 µL	60 µL/6 µg

7.5.6 Perfil de proteínas por SDS-PAGE

Muestras de bacteria previamente lavadas con PBS y muestras con 1,200 µg de proteínas de la OMVs, de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con carbapenémico fueron adicionadas con buffer de carga y sometidas a ebullición por 10 min. Las muestras resultantes se cargaron en un gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio al 10% (tabla 5) y se corrió la electroforesis a 70 V durante 2 horas con Buffer Tris-Glicina (Anexo I). Luego, los geles resultantes fueron teñidos con azul de Coomassie en agitación por 2 hrs y se destiñeron con solución desteñidora según fue necesario. Finalmente, el SDS-PAGE resultante fue observado.

Tabla 5. Preparación de gel de Acrilamida al 10% (SDS-PAGE)

Componentes	Gel separador 10%	Gel concentrador
Agua	2.78 mL	1.04 mL
Acrilamida 30%	3.34 mL	0.32 mL
Bis-acrilamida 2%	1.36 mL	0.13 mL
Tris HCl 1.5 M pH = 8.8	2.5 mL	
SDS = 0.4%		
Tris HCl 0.5 M pH = 6.8		500 µL

SDS = 0.4%		
Persulfato de amonio 10%	80 µL	40 µL
TEMED	8 µL	3 µL

7.5.7 Inmunodetección de la porina OprD por Western Blot

Siguiendo el mismo protocolo del apartado 7.5.6 se realizaron dos SDS-PAGE al 10% con extractos de proteína de muestras de bacterias y 1,200 µg de proteínas de las OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de imipenem, utilizando uno de los geles para observación con Coomassie y el otro para realizar el Western Blot.

El SDS-PAGE al 10% sin teñir fue transferido a una membrana de nitrocelulosa por medio de un aparato de transferencia semiseco (Trans-Blot® SD Cell, BioRad) a 15 V durante 40 min. La membrana se bloqueó usando 5% de leche no grasa en PBS 1X y fue incubada en agitación a 37°C por 30 min, al finalizar se realizaron tres lavados de 5 min con PBS adicionado con 0.05% Tween-20 (PBST) y se añadieron los anticuerpos policlonales anti-rOprD (González-Vázquez *et al.*, 2021)(1:2000), incubando a 4°C por una noche. Luego, se realizaron tres lavados de 10 min en agitación con PBST y se añadieron los anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo (H+L) conjugados con fosfatasa alcalina, incubando por 1 hr a temperatura ambiente y 1 hr a 37°C con, a una dilución de 1:5000. Finalmente, las proteínas unidas a los anticuerpos primarios fueron revelados usando 2 mL del reactivo BCIP®/NBT (SIGMA).

7.5.8 Ensayo de inhibición de carbapenémicos

Se sembraron las cepas PE84 y PE21 en placas de TSA, dejando en incubación por 24 hrs. Posteriormente se ajustaron a 4.0 en la escala de MacFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente, se añadió 1 mL a tubos con 2 mL de BHI (uno por cada cepa); agregando a estos un sensidisco de imipenem o meropenem. Los tubos se inocularon en agitación a 37°C por 2 hrs y otras 2 hrs en estado estático.

Por otra parte, se agregaron muestras conteniendo 20 µg de proteínas de OMVs, de cada cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de carbapenémico (imipenem o

meropenem), a tubos de BHI. Posteriormente se agregaron sensidiscos de imipenem o meropenem por separado, dejando incubar 2 hrs en agitación y otras 2 hrs en estático.

Posterior a las 4 hrs de incubación, se colocaron los sensidiscos previamente incubados con bacteria o con OMVs sobre placas de Müller Hilton, las cuales tenían un césped de *E. coli* ATCC 25922 ajustado a 0.5 en la escala de MacFarland (aproximadamente 12×10^8 UFC/mL). Las placas con los sensidiscos se incubaron por 18 hrs a 37°C. Finalmente, se midieron los halos de inhibición.

7.5.9 Evaluación inmunogénica y estructural *in silico* de IMP-62

Con el fin de que en un futuro se puedan obtener anticuerpos contra IMP, para realizar estudios de microscopia y Western-blot de la OMVs, se utilizó la secuencia de IMP-62 recuperada del GenBank (KX753224), y se determinó la toxicidad, alergenicidad e inmunogenicidad a través de los programas ToxinPred2, AllerTop v2.0 y VaxiJen v3.0, correspondientemente. Después, utilizando NetTepi 1.0, Bepipred 2.0 y Bepired 3.0 se predijeron epítopes para linfocitos T y linfocitos B. Luego, se predijo la respuesta inmune ante IMP-62 con C-ImmSim.

Posteriormente, se predijo la estructura terciaria de IMP-62 con Swiss Model y se comparó con la base de datos estructurales de Alpha Fold y UniProt. Finalmente, se utilizó la estructura terciaria de IMP-62 (AlphaFoldDB: A0A1B3B5A0) para visualizar los epítopes para linfocitos T y linfocitos B con ChimeraX 1.8 (tabla 6).

Tabla 6. Programas para la evaluación inmunogénica in silico

Programa	Función	Enlace
ToxinPred2	Predicción de toxicidad	https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred2/batch.html
AllerTop v2.0	Predicción de alergenicidad	https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/
VaxiJen v3.0	Predicción de inmunogenicidad	https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/home/
NetTepi 1.0	Predicción de epítopes para linfocitos T	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetTepi-1.0/
Bepipred 2.0	Predicción de epítopes para linfocitos B	https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/

Bepipred 3.0	Predicción de epítopes para linfocitos B	https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/
C-ImmSim	Predicción de la respuesta inmune	https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php?page=1
Swiss Model	Predicción de la estructura terciaria de proteínas	https://swissmodel.expasy.org
Alpha Fold	Base de datos estructurales de proteínas	https://alphafold.ebi.ac.uk
UniProt	Base de datos de proteínas	https://www.uniprot.org
ChimeraX	Modelaje de proteínas	https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/download.html

1.8

8. RESULTADOS

8.1 Visualización de OMVs por tinción de Gram

Para visualizar y confirmar la pureza de las muestras de OMVs se realizó una tinción de Gram a las OMVs purificadas, donde podemos ver la ausencia de contaminación por bacterias. Igualmente, realizamos tinción de Gram a muestras de bacteria recuperadas de los inóculos utilizados en el proceso de extracción de OMVs. Encontramos que la cepa PE84 y PE21 conservan la morfología bacilar de la especie, sin embargo, la cepa PE21 al ser inducida por 16 horas con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem o meropenem adopta una morfología bacilar con mayor elongación. Por otro lado, observamos que la cepa control PE84 produce OMVs pequeñas y sin agrupaciones aparentes, mientras que la cepa PE21 al estar sometida a un estrés por carbapenémico produce OMVs de mayor tamaño aparente, sucediendo lo contrario al no estar inducida, presentando OMVs más pequeñas y con tendencia a agruparse (figura 3).

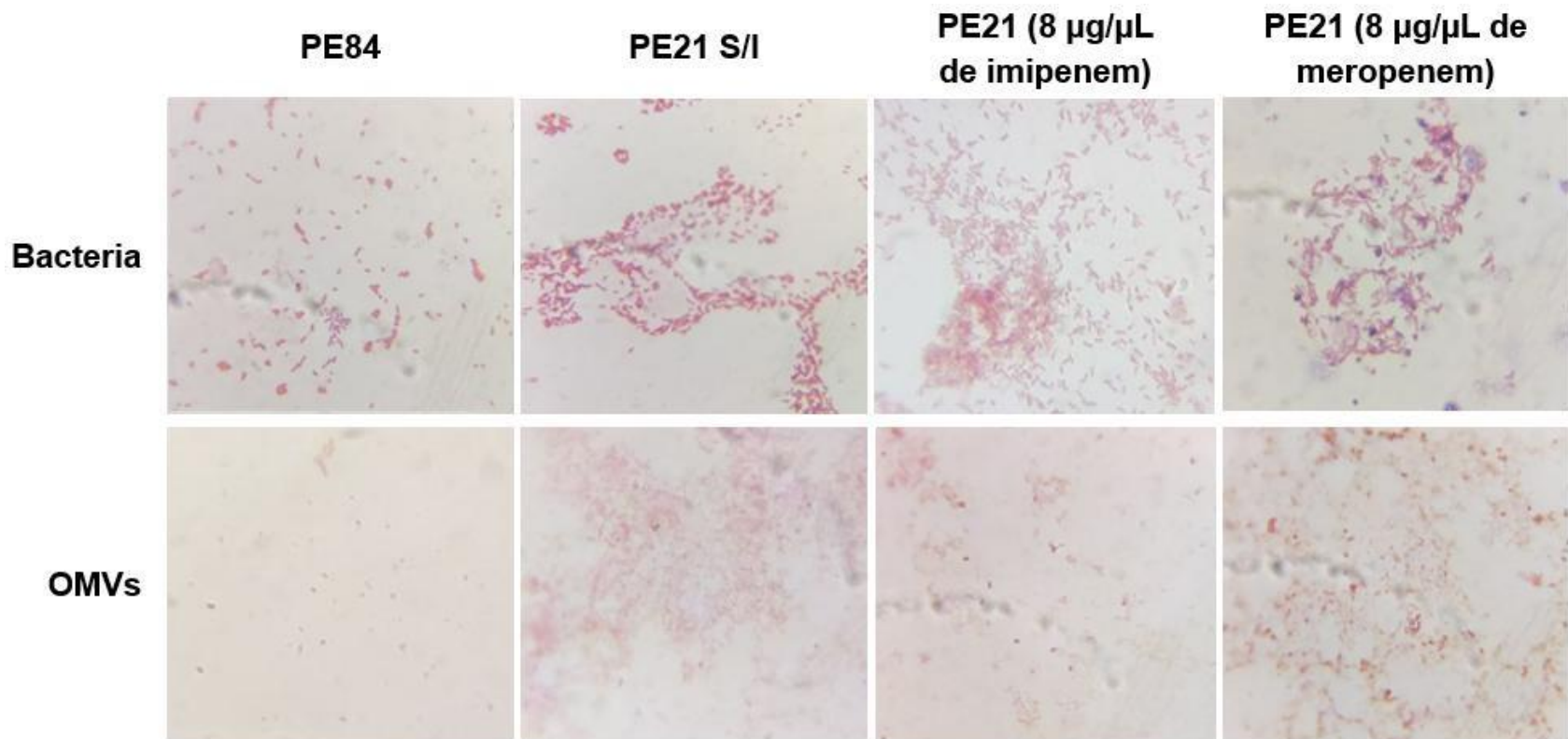


Figura 3. Tinción de Gram de muestras de *Pseudomonas aeruginosa* y microvesículas. Se usaron bacterias y OMVs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas) y de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ imipenem o meropenem. OMVs: microvesículas. S/I: sin inducción con carbapenémico.

8.2 Detección de la porina OprD en muestras de bacteria y muestras de OMVs

Para determinar si las OMVs liberadas por *P. aeruginosa* son portadoras de la porina OprD realizamos inmunofluorescencias indirectas a muestras de bacteria y OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida a estrés por carbapenémicos (IMP o MEM 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Observamos que la porina está presente tanto en bacteria como OMVs purificadas, sin embargo, la señal del fluoróforo es ligeramente más fuerte en la cepa PE21 inducida con carbapenémicos, y notoriamente más fuerte en las muestras de OMVs de la cepa PE21 inducida con carbapenémicos, en especial la inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de meropenem (figura 4). Por otra parte, encontramos que las OMVs de la cepa PE84 y PE21 son aparentemente similares, con la única diferencia en que esta última presentó una agrupación de OMVs. Por otro lado, se observó que la cepa PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem liberó OMVs de mayor tamaño y con algunas agrupaciones, mientras que aquellas liberadas en presencia de inducción con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de meropenem solamente variaron en cantidad y no en morfología.

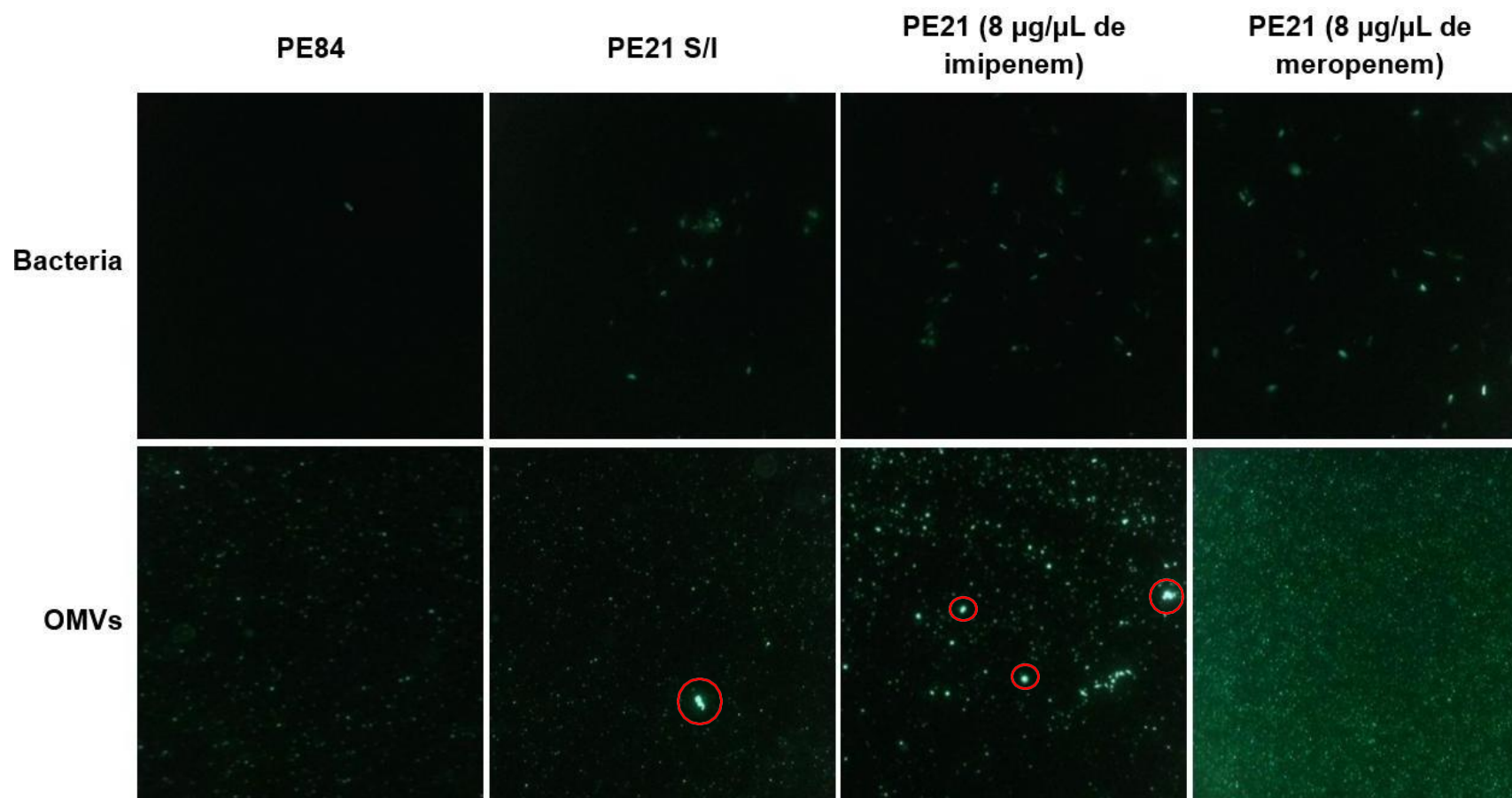


Figura 4. Inmunofluorescencias contra la porina OprD en muestras de bacteria y microvesículas. Se usaron OMVs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) y bacterias de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida por 16 horas con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem o meropenem. Los círculos rojos remarcan algunas agrupaciones de OMVs. OMVs: microvesículas. S/I: sin inducción.

Por otro lado, quisimos analizar la presencia de ADN extracelular (eADN) en OMVs, por lo que, realizamos inmunofluorescencias indirectas a muestras de bacteria adicionadas con OMVs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de meropenem, con la finalidad de utilizar las unidades bacterianas como control positivo de eADN y a la porina OprD como localizador de unidades bacterianas y OMVs. Los resultados se observaron a las longitudes de onda correspondientes para FITC y DAPI en una misma sección para su comparación, en donde encontramos que únicamente algunas OMVs poseen eADN (figura 5).

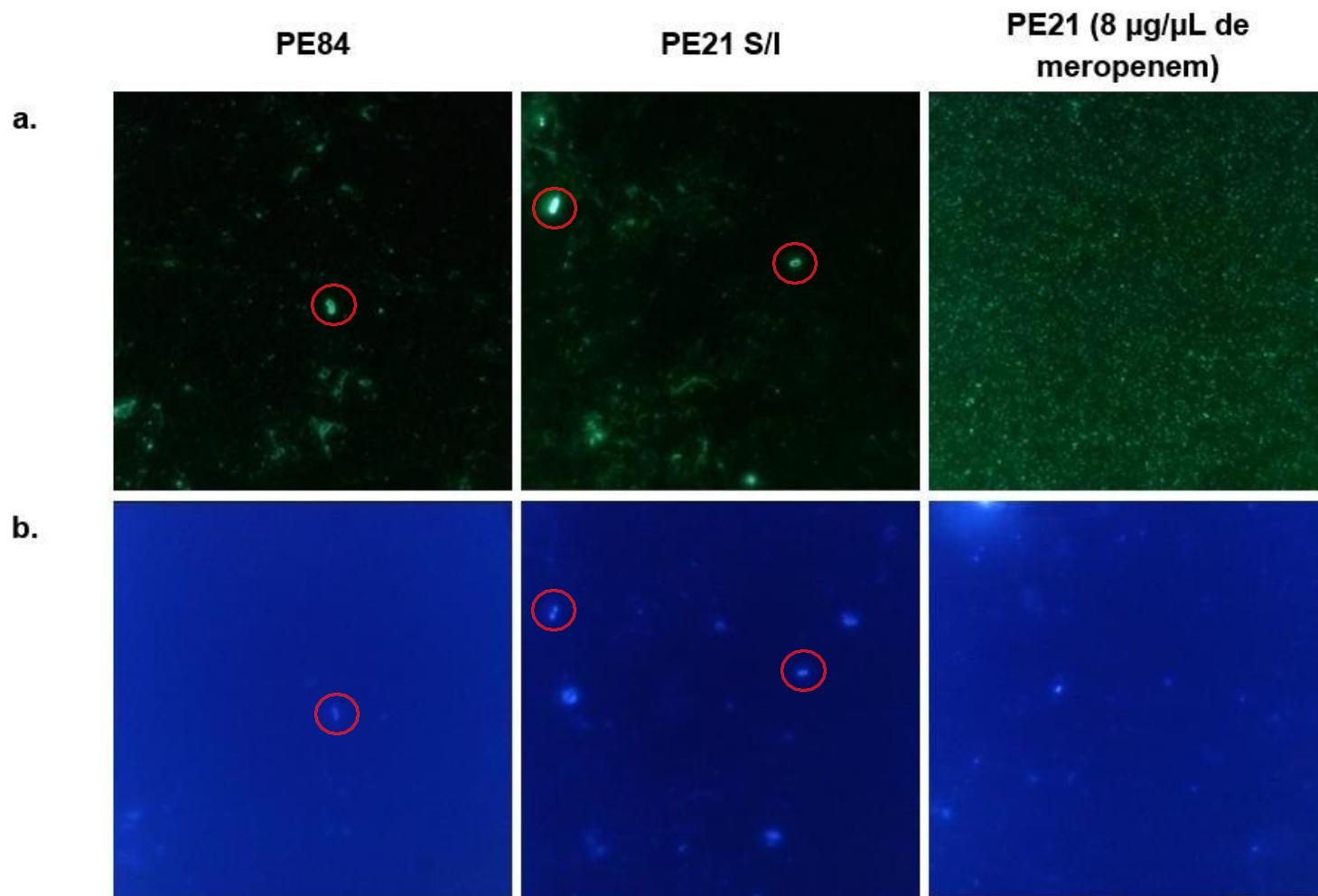


Figura 5. Inmunofluorescencias contra la porina OprD en muestras de bacteria con microvesículas. Se usaron muestras de bacteria adicionadas con OMVs (10 µg/mL de proteína) de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem. Los resultados fueron visualizados en un mismo campo. **a.** Inmunofluorescencia visualizada con el filtro de fluorescencia para FITC. **b.** Inmunofluorescencia visualizada con el filtro para DAPI. Los círculos rojos remarcan unidades bacterianas. OMVs: microvesículas. S/I: sin inducción.

8.3 Perfil de proteínas en muestras de bacteria y OMVs

Para evaluar la variabilidad del cargo proteico entre muestras de bacterias y OMVs ante condiciones de estrés por carbapenémicos, se decidió realizar una electroforesis por SDS-PAGE al 10% (figura 6). En los resultados se observó variabilidad entre las muestras de bacterias y OMVs, por ejemplo; algunas bandas se visualizan más resaltadas en la muestra de bacteria de la cepa PE21 inducida con meropenem en comparación a la no inducida, sin embargo, cuando la cepa PE21 es inducida con imipenem presenta algunas bandas que se encuentran ausentes en la no inducida. En lo que respecta a los perfiles proteicos de OMVs, los bandeos se observan con mayor claridad en ambas condiciones de estrés por carbapenémico, al contrario de las muestras no inducidas. Asimismo, la presencia de proteínas en las muestras de OMVs en la cepa PE84 es prácticamente nula.

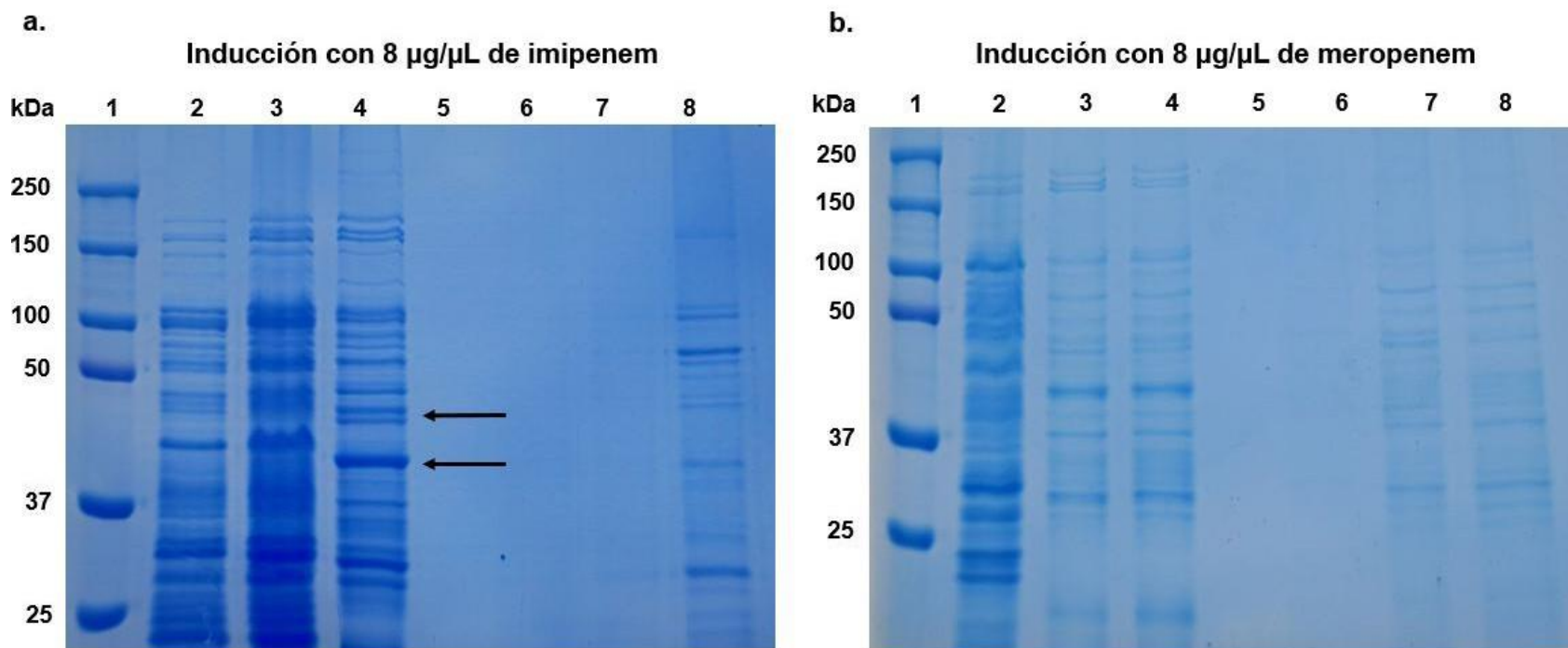


Figura 6. Identificación del perfil de proteínas en muestras de bacteria y OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con imipenem y meropenem. Resultados del corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. **a.** Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2-4: muestras de bacterias de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de imipenem; carriles 6-8: muestras de microvesículas (1,200 µg/mL de proteínas) de PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de imipenem. **b.** Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2-4: muestras de bacterias de PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem; carriles 6-8: muestras de microvesículas (1,200 µg/ml de proteínas) de PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem. Las flechas negras marcan bandas de diferencia entre la cepa PE21 y la cepa PE21 inducida con imipenem.

8.4 Detección de la porina OprD por Western Blot

Debido a que hubo detección de OprD por inmunofluorescencia tanto en muestras de bacteria y en OMVs, se realizó un Western Blot para confirmar la presencia de la porina (figura 7). A diferencia de lo observado en los resultados de la inmunofluorescencia, el Western Blot únicamente reveló la presencia de OprD en las muestras de bacteria de la cepa PE84 y PE21, así como en las OMVs de PE21 sin inducción, pero en menor magnitud.

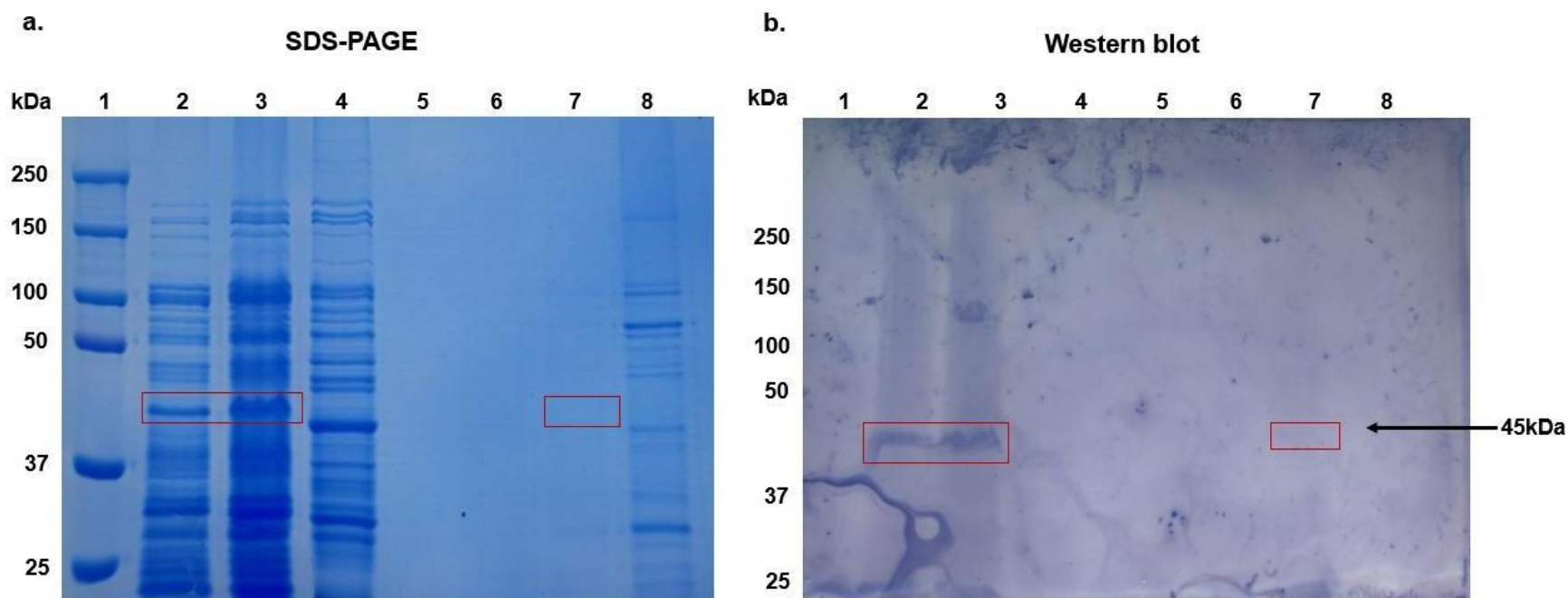


Figura 7. Identificación de OprD en extractos totales de bacteria y OMVs de la cepa PE84, PE21 y PE21 inducida con imipenem. a. SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. **Carril 1:** marcador de peso molecular; **carril 2-4:** muestras de bacterias de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem; **carriles 6-8:** muestras de microvesículas (1,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) de PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem. b. Inmunodetección de OprD. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-rOprD (1:2000), y anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo (H+L) conjugados con fosfatasa alcalina como el anticuerpo secundario (1:5000). **Carril 1:** marcador de peso molecular; **carril 2-4:** muestras de bacterias de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem; **carriles 6-8:** muestras de microvesículas (1,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) de PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem. La flecha negra indica la señal de una banda de aproximadamente 45 kDa.

8.5 Actividad carbapenemasa de la metalo-betalactamasa IMP-62

Anteriormente, López-García y Gómez-Martínez estudiaron la cepa PE21, encontrando que es portadora de la carbapenemasa IMP-62, y, por ende, con un perfil de resistencia hacia los antibióticos carbapenémicos. Con base a esto, se realizó el ensayo modificado de inactivación de carbapenémicos por triplicado en tres experimentos independientes a muestras de bacteria y OMVs purificadas de las cepas en estudio, utilizando sensidiscos de imipenem y meropenem pretratados con muestras de bacteria o con OMVs.

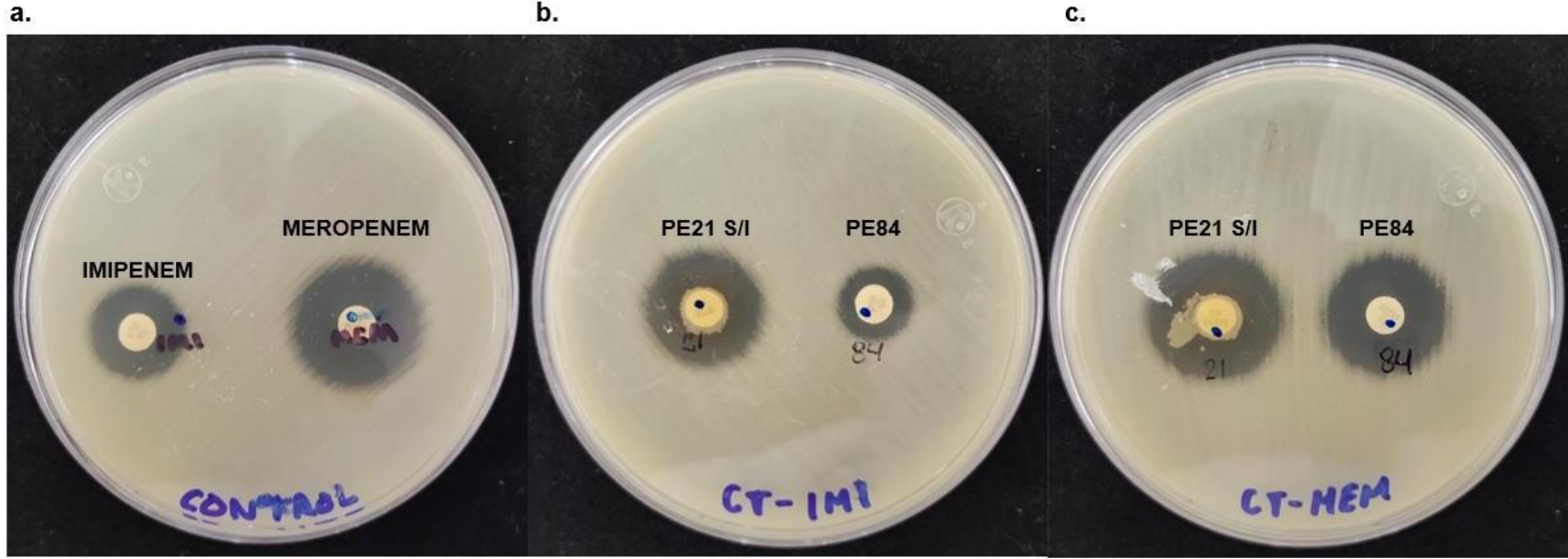


Figura 8. Ensayo de inhibición de carbapenémicos con bacteria. Se realizó en placas de agar Müller-Hilton con un césped de *E. coli* ATCC 25922 ajustado a 0.5 en la escala de MacFarland (aproximadamente 12×10^8 UFC/mL), utilizando sensidiscos previamente tratados con muestras de bacteria ajustadas a 4.0 en la escala de MacFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) de las cepas PE84 y PE21. **a.** Sensidiscos de imipenem y meropenem sin tratamiento previo. **b.** Sensidiscos de imipenem previamente tratados con muestras de bacteria de las cepas PE84 y PE21. **c.** Sensidiscos de meropenem previamente tratados con muestras de bacteria de las cepas PE84 y PE21. S/I: sin inducción.

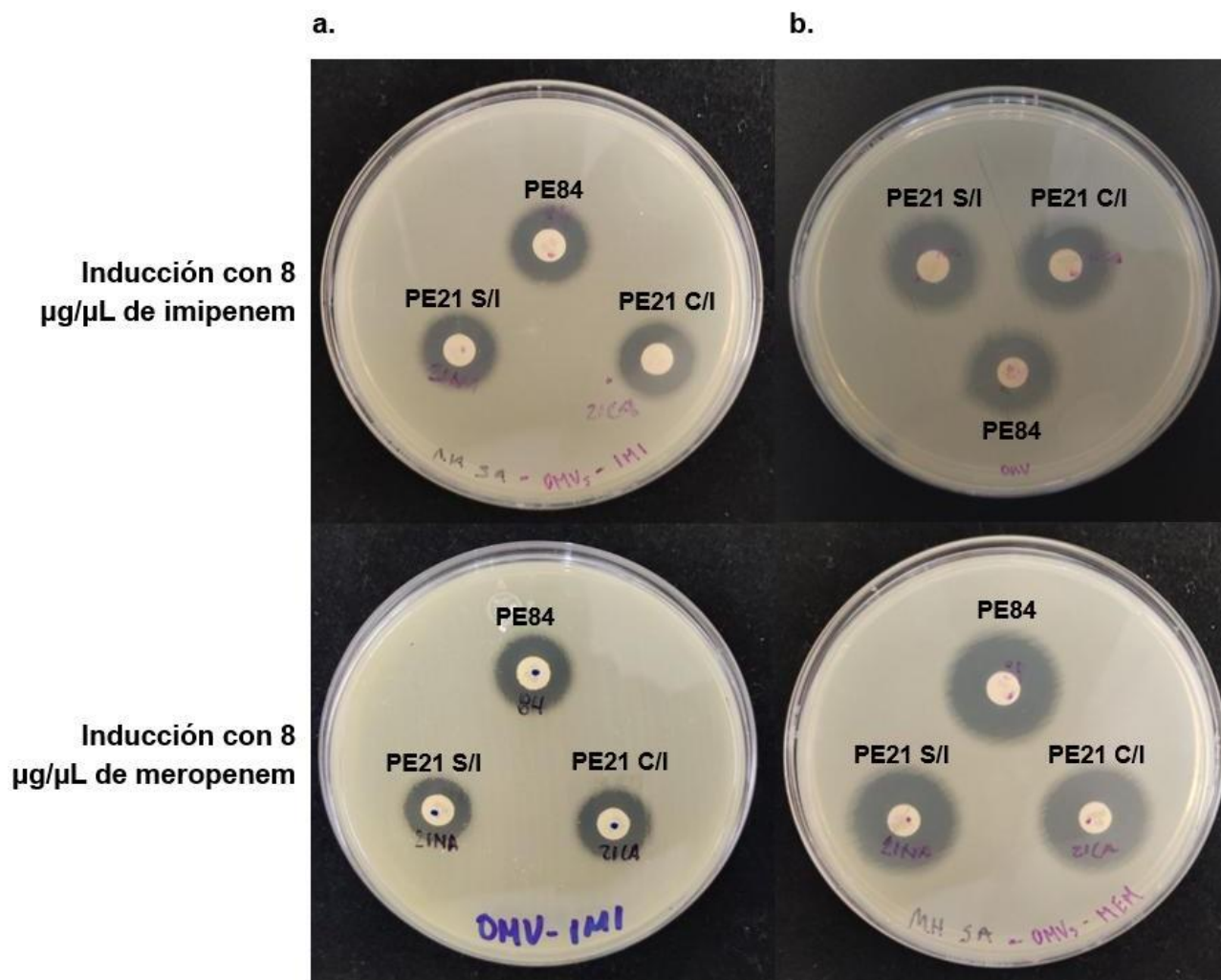


Figura 9. Ensayo de inhibición de carbapenémicos con OMVs. Se realizó en placas de agar Müller-Hilton con un césped de *E. coli* ATCC 25922 ajustado a 0.5 en la escala de MacFarland (aproximadamente 12×10^8 UFC/mL), utilizando sensidiscos previamente tratados con muestras de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas de OMVs purificadas de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem o meropenem. **a.** Sensidiscos de imipenem. **b.** Sensidiscos de meropenem. S/I: sin inducción. C/I: con inducción.

Observamos en las placas de agar Müller-Hilton que el halo de inhibición de las OMVs entre las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con carbapenémicos no muestran diferencia significativa (figura 9), únicamente que los halos tienden a ser de mayor tamaño ante los sensidiscos de meropenem, por lo que, no habría actividad registrada por parte de las carbapenemasas, sin embargo, sucede lo contrario al observar los gráficos de las mediciones de los halos, donde podemos observar actividad carbapenemasa (figuras 9-10).

Con base a los gráficos (figuras 9-10) encontramos que la interacción de los sensidiscos con muestras de la bacteria y muestras de OMVs de la cepa PE84 es semejante al control negativo (sensidiscos sin pretratamiento con bacterias o con OMVs), mientras que la interacción de los sensidiscos con muestras de bacteria de la cepa PE21 hidrolizan al carbapenémico por completo y resulta en el crecimiento bacteriano en el sensidisco (figura 8). Por otro lado, cuando los sensidiscos interaccionan con muestras de OMVs de la cepa PE21 inducidas con carbapenémico, se observa una ligera reducción del halo de inhibición en comparación a las muestras de OMVs no inducidas. Sin embargo, únicamente observamos diferencias significativas en los halos de inhibición de las OMVs de la cepa PE21 con y sin inducción con imipenem respecto a las OMVs de la cepa PE84 (figura 10), contrario a los resultados no significativos encontrados con la inducción con meropenem (figura 11).

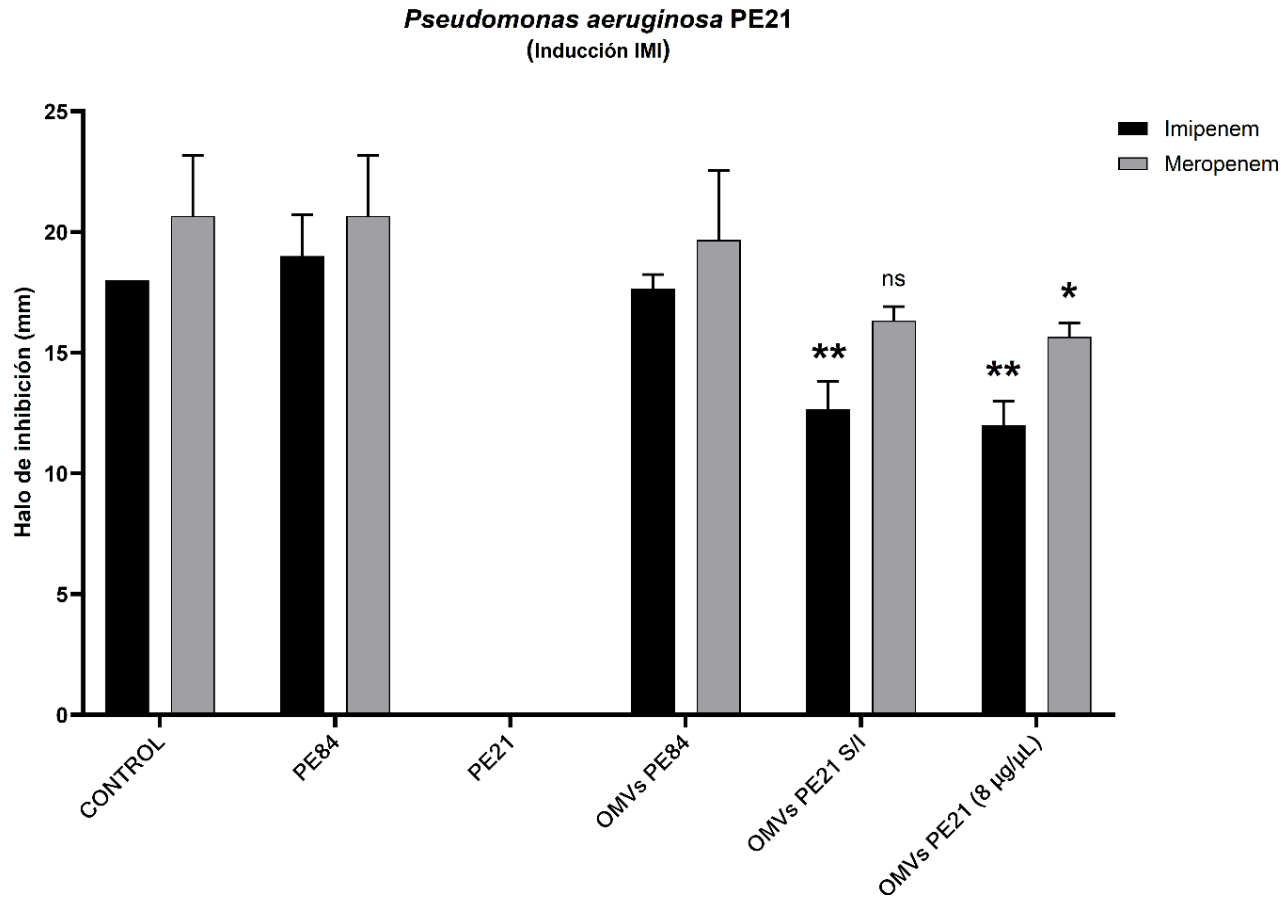


Figura 10. Gráfico de los ensayos de inhibición de carbapenémicos para la inducción con imipenem. Se realizaron con muestras de bacterias y de OMVs (20 µg/mL de proteína) de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de imipenem. Se observaron diferencias significativas en los halos de inhibición contra imipenem entre las OMVs de la cepa PE21 sin inducción y con inducción con imipenem con respecto a las OMVs de la cepa PE84; mientras que en los halos de inhibición contra meropenem únicamente se observó una diferencia significativa en las OMVs de la cepa PE21 inducida con imipenem respecto a las OMVs de la cepa PE84. Las columnas de color negro corresponden a los resultados utilizando sensibilizadores de imipenem. Las columnas de color gris corresponden a los resultados utilizando sensibilizadores de meropenem. Valor de $p = <0.05$. IMI: imipenem. OMVs: microvesículas. El ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

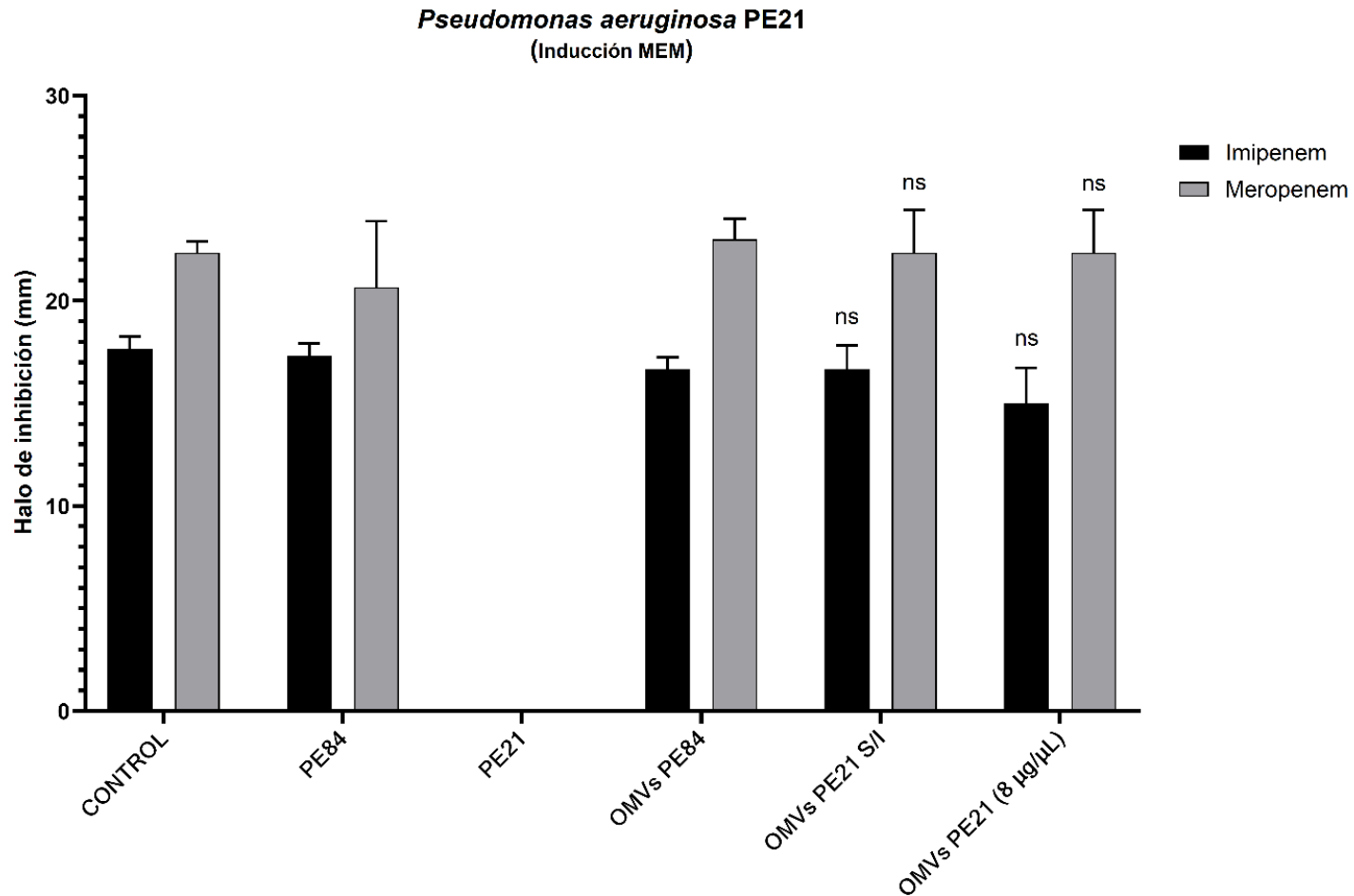


Figura 11. Gráfico de los ensayos de inhibición de carbapenémicos para la inducción con meropenem. Se realizaron con muestras de bacterias y OMVs (20 µg/ mL de proteína) de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con 8 µg/µL de meropenem. No se observaron diferencias significativas en los halos de inhibición contra imipenem ni meropenem entre las OMVs de la cepa PE21 sin inducción y con inducción con meropenem con respecto a las OMVs de la cepa PE84. Las columnas de color negro corresponden a los resultados utilizando sensibilizadores de imipenem. Las columnas de color gris corresponden a los resultados utilizando sensibilizadores de meropenem. Valor de $p = <0.05$. IMI: imipenem. OMVs: microvesículas. El ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

8.6 Determinación de toxicidad, alergenicidad e inmunogenicidad de IMP-62 bioinformáticamente.

Se realizó la evaluación inmunogénica *in silico* de IMP-62 con la finalidad de conocer si la MBL tiene las características adecuadas para usarla en la producción de anticuerpos en posteriores estudios. Se inició con la búsqueda predictiva de toxicidad, alergenicidad e inmunogenicidad, en donde los resultados revelaron que la probabilidad de que sea tóxica es nula (tabla 7), no se define como alérgeno y que es inmunogénica en un 100% (tabla 8).

Tabla 7. Predicción de toxicidad de IMP-62

Proteína	ML Score	MERCI Score	BLAST Score	Hybrid Score	Predicción
IMP-62	0.32	0	0	0.32	No tóxica

Los valores de las métricas utilizadas por ToxinPred2 corresponden a diferentes algoritmos de aprendizaje automatizado para evaluar la similitud de secuencias conocidas respecto a una secuencia problema. Únicamente el Hybrid Score combina métricas de distintas fuentes o métodos. ML Score: Machine Learning Score, por sus siglas en inglés. MERCI Score: Motif Elicitation for Recognition of Conserved Information, por sus siglas en inglés. BLAST Score: Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés.

Tabla 8. Predicción de alergenicidad e inmunogenicidad de IMP-62

Proteína	Alergenicidad	Inmunogenicidad
IMP-62	Definida como no alérgeno	Probabilidad del 100% de ser inmunogénica

8.7 Predicción de epítopes para linfocitos T y linfocitos B en IMP-62 *in silico*

Con base a la nula toxicidad y alergenicidad de la proteína IMP-62, se prosiguió con el estudio *in silico*, pero ahora en búsqueda de sitios de reconocimiento para linfocitos. Se buscaron probables sitios de reconocimiento para linfocitos T y B en la secuencia de IMP-62. La búsqueda arrojó que existen 7 probables epítopes para linfocitos T con una longitud de 9 aminoácidos cada uno (tabla 9). Por otro lado, se encontraron 3 probables epítopes para linfocitos B con variación en la longitud de las secuencias (6, 11 y 18 aminoácidos) (tabla 9); esto fue determinado por medio de una comparativa entre los resultados arrojados por Bepipred 2.0 y Bepipred 3.0 (Anexo II).

Tabla 9. Predicción de epítopes para linfocitos T y B de IMP-62

IMP-62	Secuencia	Longitud (aminoácidos)
Epítopes para linfocitos T	KLSVFFMFM	9
	FMFMFCSIT	9
	FMFCSITAA	9
	YVHTSFEEV	9
	VLVNTEAYL	9
	YLIDTPFTA	9
	WLVNKNKIEV	9
Epítopes para linfocitos B	EVNGWG	6
	ELLKKDGVQAKNSFSGG	18
	KESKKPSLPSN	11

Realizado con NetTepi 1.0, Bepipred 2.0 y Bepipred 3.0.

8.8 Predicción de la respuesta inmune ante IMP-62 *in silico*

Por otro lado, con la finalidad de determinar si IMP-62 es apta para la producción de anticuerpos, determinamos que es necesaria la evaluación y análisis del comportamiento de la respuesta inmune, principalmente de las citocinas y células implicadas, para determinar el tipo de respuesta producida. Es por ello por lo que realizamos el análisis utilizando C-ImmSim, evaluando ante 1, 2 y 3 dosis de administración del antígeno.

Encontramos que la administración de una única dosis de IMP-62 resultó en una población de linfocitos T cooperadores (TH por sus siglas en inglés) en reposo y la ausencia de TH de memoria (figura 12). Del mismo modo, la población de linfocitos B se presentó únicamente en su isotipo IgM, y se denotó la ausencia del isotipo IgG, así como de células de memoria y de células plasmáticas (figura 11). A su vez, la única interleucina encontrada fue INF- γ (figura 13). Con ello, podemos decir que la respuesta inmune ante una dosis de IMP-62 no es favorable para la producción de memoria inmunológica.

A diferencia de la exposición a una dosis, la administración de 2 o 3 dosis potenció en general la respuesta inmune; en donde observamos en ambos casos una población de linfocitos TH activos, así como TH de memoria (figuras 14 y 16). Además,

identificamos linfocitos B de memoria, al igual que isotipos IgM e IgG de células plasmáticas (figuras 14 y 16). Asimismo, observamos la presencia de las inmunoglobulinas IgM e IgG1, con un mayor predominio por parte de la primera (figuras 15 y 17). Por otro lado, se detectaron citocinas como INF- γ , TGF- β , IL-2, IL-10 e IL12 (figuras 15 y 17). Igualmente, denotamos que la administración de 3 dosis de IMP-62 ocasiona una respuesta inmune relativamente de mayor magnitud en comparación a la obtenida a 2 dosis, especialmente en la población de TH y linfocitos B.

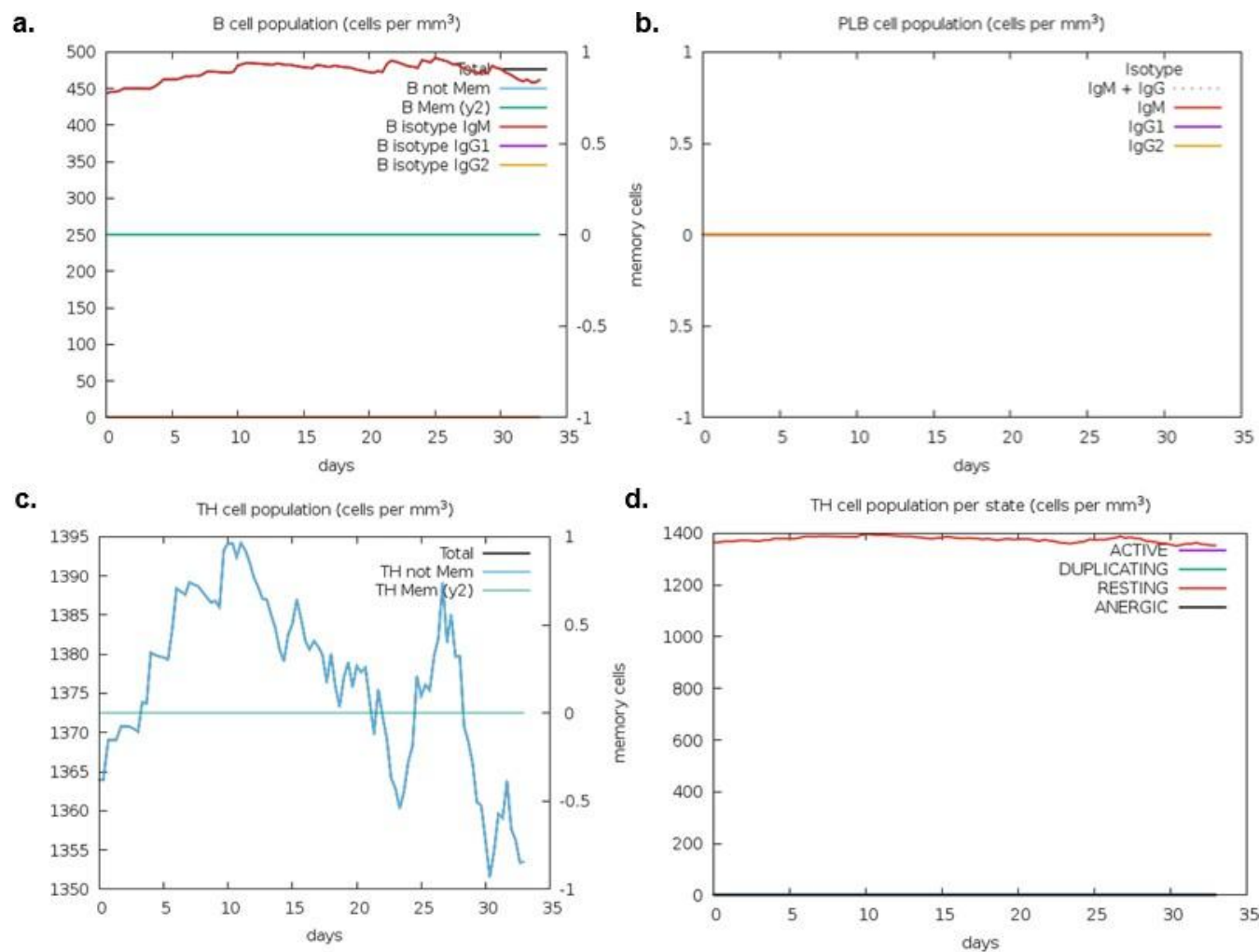


Figura 12. Perfil poblacional de linfocitos B, células plasmáticas, linfocitos T a una dosis de IMP-62. a. Isotipos de linfocitos B. **b.** Isotipos de células plasmáticas. **c.** Isotipos de linfocitos TH. **d.** Estado de actividad de linfocitos TH. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

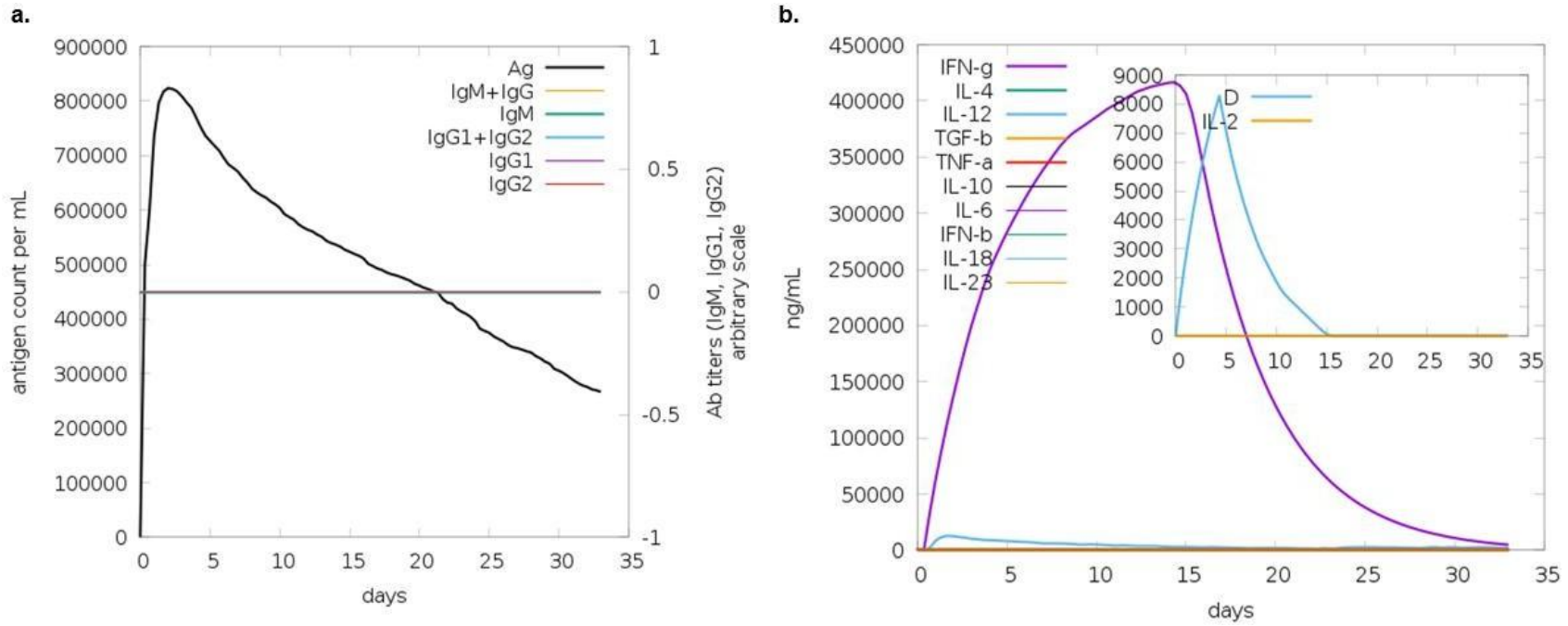


Figura 13. Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a una dosis de IMP-62. **a.** Títulos de inmunoglobulinas respecto a la exposición del antígeno. **b.** Títulos de citocinas producidas ante la exposición del antígeno. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

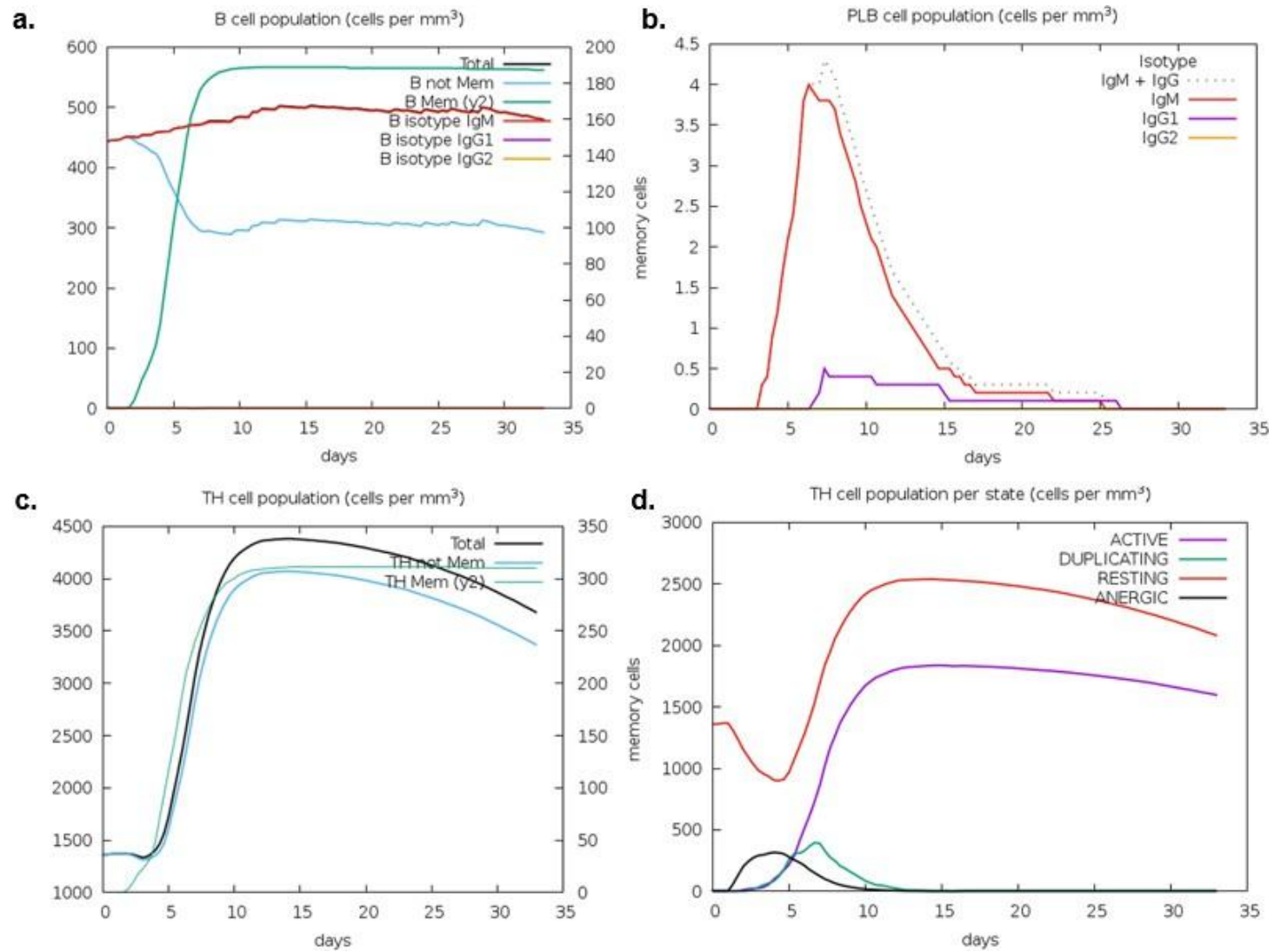


Figura 14. Perfil poblacional de linfocitos B, células plasmáticas y linfocitos T a 2 dosis de IMP-62. a. Isotipos de linfocitos B. b. Isotipos de células plasmáticas. c. Isotipos de linfocitos TH. d. Estado de actividad de linfocitos TH. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

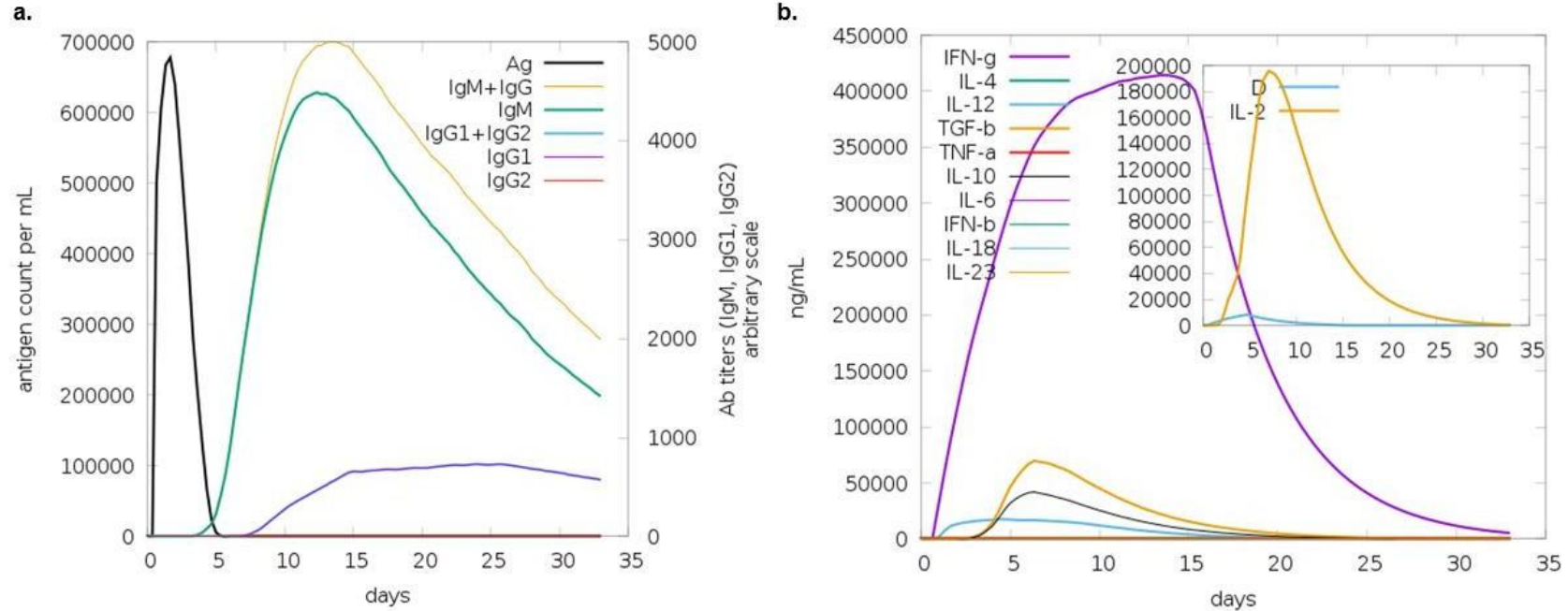


Figura 15. Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a 2 dosis de IMP-62. a. Títulos de inmunoglobulinas respecto a la exposición del antígeno. **b.** Títulos de citocinas producidas ante la exposición del antígeno. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

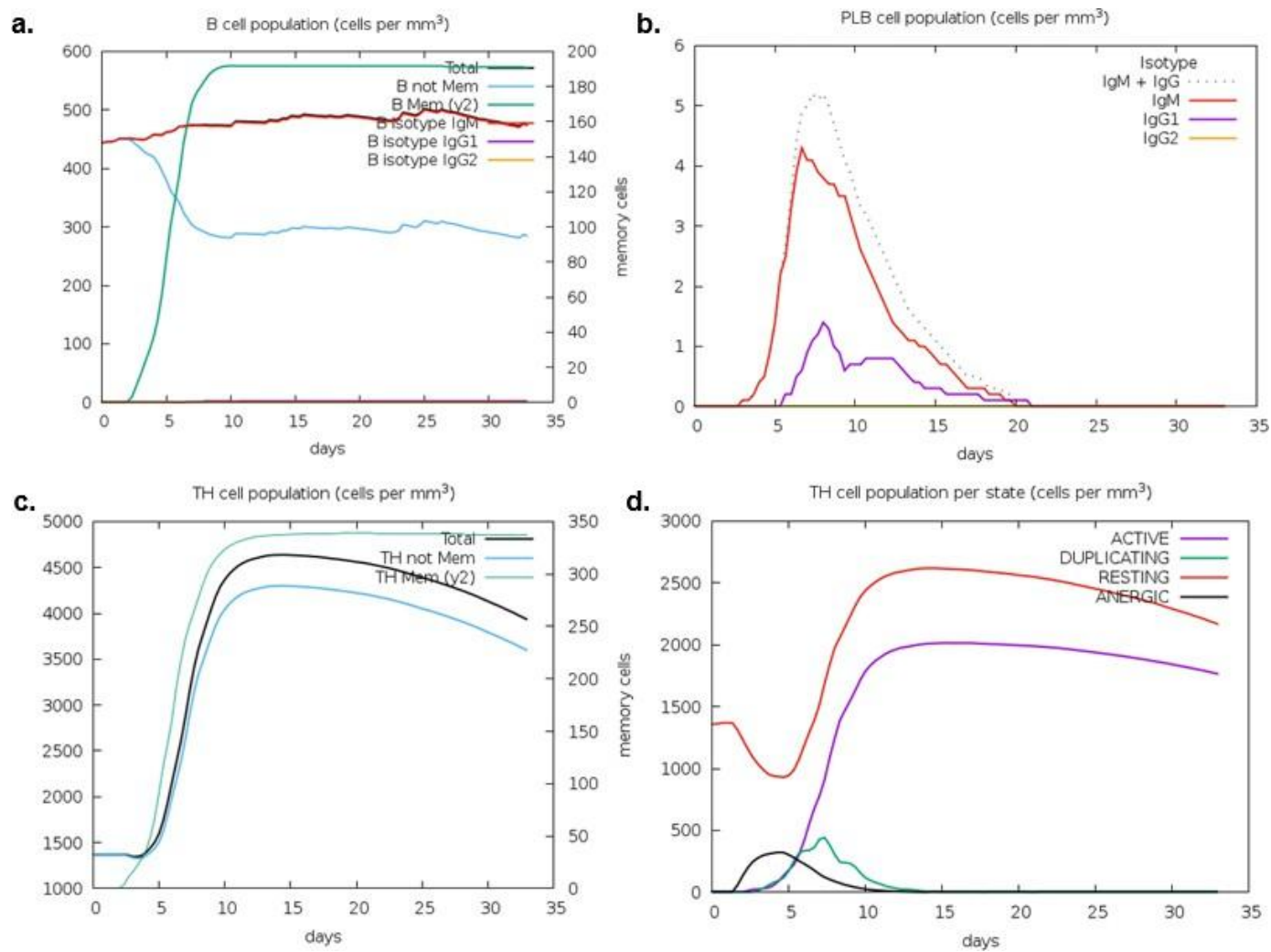


Figura 16. Perfil poblacional de linfocitos B, células plasmáticas y linfocitos T a 3 dosis de IMP-62. a. Isotipos de linfocitos B. **b.** Isotipos de células plasmáticas. **c.** Isotipos de linfocitos TH. **d.** Estado de actividad de linfocitos TH. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

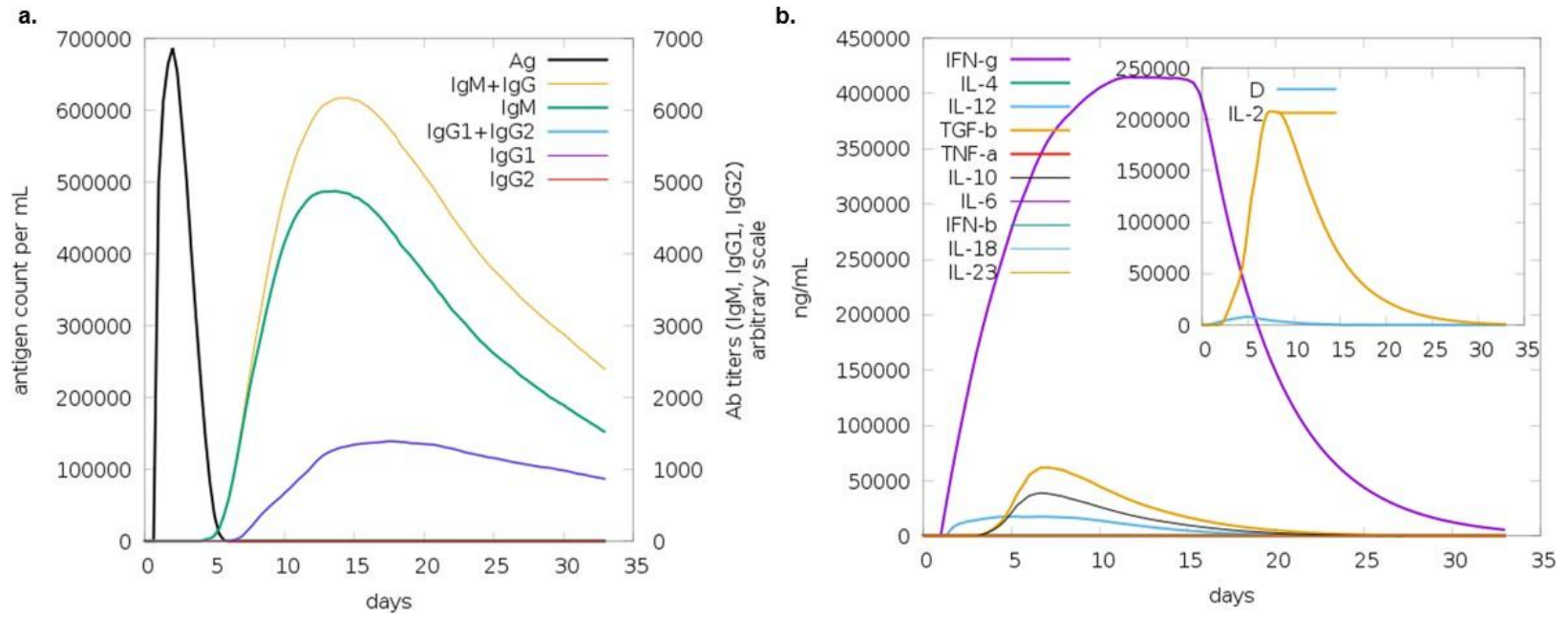


Figura 17. Títulos de inmunoglobulinas y citocinas a 3 dosis de IMP-62. a. Títulos de inmunoglobulinas respecto a la exposición del antígeno. **b.** Títulos de citocinas producidas ante la exposición del antígeno. Los gráficos se realizaron con C-ImmSim.

8.9 Visualización tridimensional de los epítopes para linfocitos T y linfocitos B en la proteína IMP-62 *in silico*

Por último, teniendo como base lo obtenido en el análisis *in silico* de IMP-62, se decidió realizar la evaluación tridimensional de los epítopes para linfocitos T y linfocitos B, con la finalidad de visualizar si estos se encuentran expuestos. Se realizó el análisis tomando como base la estructura de IMP-62 en AlphaFold y al insertar las secuencias de reconocimiento se logró denotar que la mayoría de estos se encuentran expuestos según la estructura de la proteína (figura 18). Además, algunos de los epítopes para linfocitos T se encuentran adyacentes uno con el otro y se encontró una región en la que los epítopes para linfocitos T y para linfocitos B se encuentran unidos.

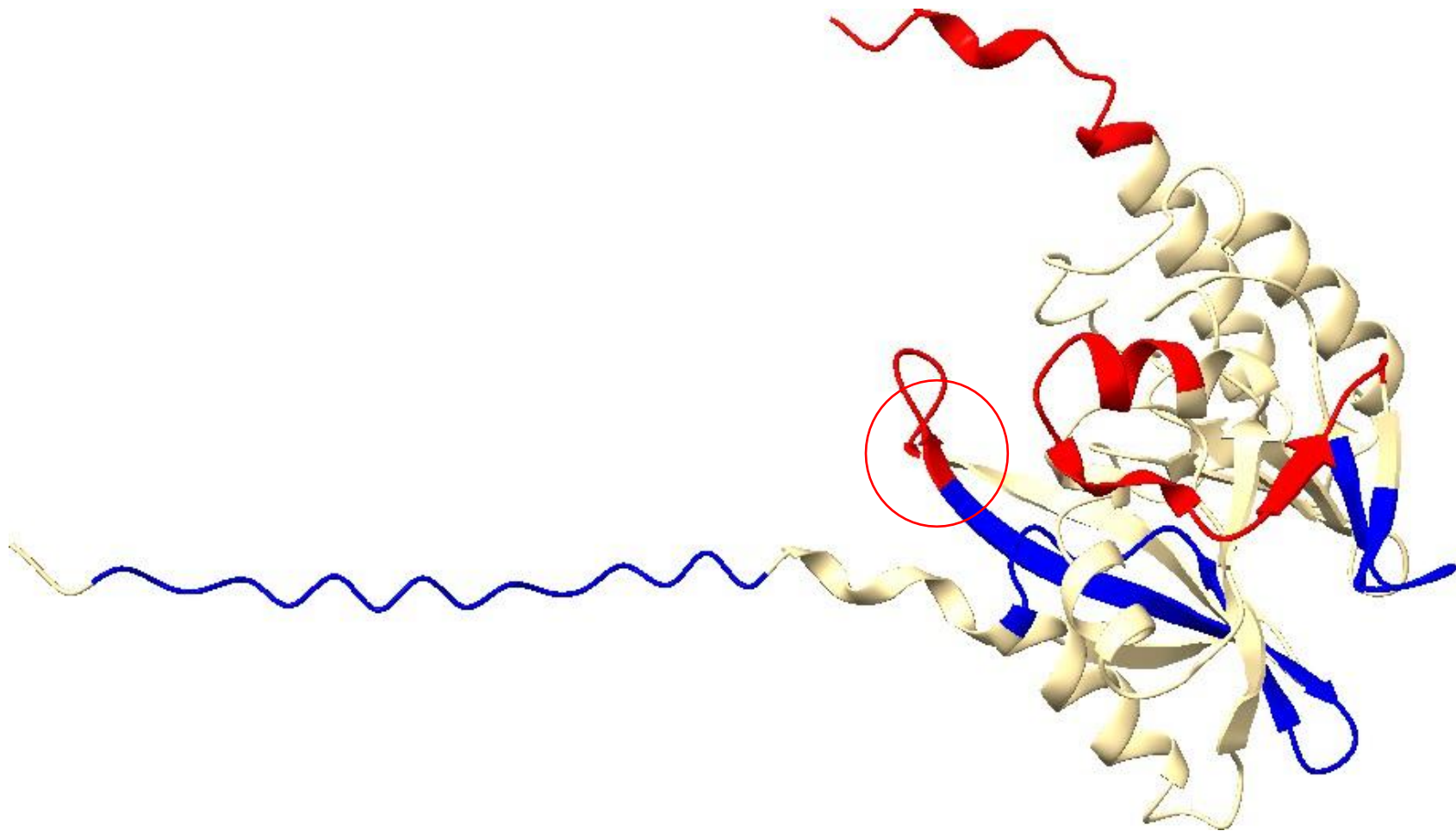


Figura 18. Epítopes para linfocitos T y linfocitos B en la estructura tridimensional de IMP-62. De color azul se remarcan los epítopes para linfocitos T, y de color rojo los epítopes para linfocitos B. El círculo rojo destaca la zona de unión entre epítopes para linfocitos T y para linfocitos B. La figura se realizó en ChimeraX 1.8.

9. DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas a la salud (IAAS) son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo debido a que gran parte de estas IAAS son ocasionadas por patógenos bacterianos con resistencia a antibióticos (Balasubramanian *et al.*, 2023). En México *P. aeruginosa* es el segundo microorganismo con mayor incidencia clínica acorde a la RHOVE en 2024. Desafortunadamente, se desconoce el porcentaje de cepas bacterianas implicadas en IAAS con perfiles de resistencia a antibióticos en México. Por otro lado, *P. aeruginosa* cuenta con un sistema regulatorio central que le confiere una alta adaptabilidad, capacidad que se encuentra altamente relacionada a la aparición acelerada de cepas resistentes a múltiples antibióticos, dentro de ellos los carbapenémicos (Moradali *et al.*, 2017).

En este estudio, para comenzar el análisis de las OMVs en este modelo bacteriano y su papel en la resistencia a los carbapenémicos, comenzamos por obtenerlas y visualizarlas por medio de tinción de Gram a través de microscopía óptica. Se sabe que el tamaño aproximado de las OMVs de *P. aeruginosa* se encuentra entre 50-400 nm (Zavan *et al.*, 2023) y que el límite de resolución de un microscopio óptico es de 200 nm (Wang *et al.*, 2022); con base en esto, las OMVs que observamos teñidas tienen un tamaño aproximado de ≥ 200 nm.

Por otro lado, encontramos que la morfología de las OMVs es variable según el estímulo al que se haya sometido el inóculo. Específicamente, la cepa PE84 al no ser sometida a algún tipo de estrés, secretó pocas OMVs y de morfología uniforme entre ellas, lo que resulta consistente con el conocimiento base de que todos los microorganismos liberan OMVs como parte de su ciclo celular (Zavan *et al.*, 2023).

Por el contrario, observamos la presencia de OMVs de mayor tamaño en la cepa PE21 ante la inducción a estrés celular por imipenem y meropenem lo cual pudo ser ocasionada por la alteración en la pared celular y la estabilidad de la membrana externa por acción de los carbapenémicos, tal como sucede con los betalactámicos (Glen & Lamont, 2021). Sin embargo, para corroborar estas variaciones morfológicas es necesario realizar microscopía electrónica de transferencia (TEM).

Se sabe que la cepa PE21 presenta un codón de paro prematuro en el aminoácido 417 y un loop L7 corto para el gen *oprD*, por lo que era poco probable su detección por inmunofluorescencia (Gómez-Martínez, 2023; López-García *et al.*, 2018). Sin embargo, en este trabajo se logró la detección de OprD, por lo que podemos deducir que se está expresando. Este resultado puede indicar tres situaciones: existen variantes de la cepa PE21 que no poseen las mutaciones en OprD; los anticuerpos anti-OprD son capaces de unirse a la variante de OprD en la cepa PE21 o están detectando la presencia de proteínas homologas a OprD.

Los anticuerpos anti-OprD utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta fueron obtenidos utilizando la proteína recombinante de OprD, obteniendo el gen de PAO1 de *P. aeruginosa* (González-Vázquez *et al.*, 2021), por lo que, para corroborar que los anticuerpos utilizados contra OprD son capaces de detectar variantes de la misma, incluyendo la presente en la cepa PE21, decidimos evaluar las secuencias y predicciones de sitios de unión a epítopes para linfocitos T y linfocitos B de distintas variantes de OprD (Anexo II), donde encontramos que las variantes tienen sitios de reconocimiento similares y algunos idénticos a los detectados en la porina nativa de la cepa PAO1. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que la cepa PE21 tenga clonas que posean una OprD mutada y otras que no.

Es importante destacar que en la detección por inmunofluorescencia observamos que la presencia de OprD podría ser parecida tanto en la cepa PE84 como la cepa PE21, sin embargo, se deben hacer otros estudios para confirmarlo. Al observar por medio de la fluorescencia que las OMVs liberadas de la cepa PE21 ante la inducción con imipenem resulta en OMVs de mayor tamaño aparente (lo que concuerda con lo observado en las tinciones de Gram (figura 3)) y con una mayor detección de OprD en membrana en comparación a las producidas por la cepa PE21 sin inducción, podríamos pensar que OprD se pudiera estar expresando más durante la inducción con el carbapenémico y con ello haber mayor cantidad de dicha proteína en las OMVs. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería necesario realizar una cuantificación de OprD o determinarlo por proteómica. Por otra parte, pudimos observar que la inducción con meropenem pudiera ocasionar la liberación de un mayor número de

OMVs, similar a lo encontrado por Hadadi-Fishan en 2021 a una concentración diferente de meropenem (Hadadi-Fishani *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Grande en 2015, se determinó la presencia de eADN en la superficie de OMVs en una cepa de *Helicobacter pylori* (Grande *et al.*, 2015). Es por ello por lo que, decidimos analizar por medio de fluorescencia la presencia de eADN en muestras de bacteria adicionadas con OMVs, con la finalidad de contrastar la señal emitida en las bacterias con respecto a las OMVs. Al comparar las señales emitidas con el filtro para FITC y el filtro para DAPI, encontramos la presencia de eADN tanto en bacterias como en algunas OMVs, resultados que van acorde a lo reportado por Grande en 2015, aun cuando mediante esta técnica no podemos saber si están dentro o fuera de la OMVs.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista con una gran versatilidad y capacidad de adaptación a diferentes nichos, dentro de ellos entornos hostiles (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Identificamos con anterioridad la variabilidad morfológica de las OMVs liberadas con y sin estrés por carbapenémicos, sin embargo, desconocemos si existe también una probable variación en el perfil proteico de las OMVs. Es por ello por lo que decidimos proseguir con el análisis del perfil de proteínas en extractos de bacteria y OMVs. Dentro de nuestros hallazgos encontramos que en los extractos de bacteria algunas bandas proteicas se conservaban tanto en la cepa PE84 como la cepa PE21, mientras que el bandeo entre la cepa PE21 y la cepa PE21 inducida con carbapenémicos mostraron muy poca variación, a excepción de unas bandas observadas en el gel con la inducción con imipenem, lo cual se asemeja a lo reportado en un estudio realizado por Wehmhöner en 2003 (Wehmhöner *et al.*, 2003).

En el caso de las OMVs de la cepa PE84, no presentaron bandas de proteínas usando tinción por Coomassie, probablemente se deba a la baja concentración de OMVs utilizadas en el ensayo, por lo cual se debe repetir usando mayor concentración de OMVs. Por otro lado, las OMVs liberadas ante la inducción con carbapenémicos no poseen el mismo bandeo que los extractos de bacteria. Las OMVs de la cepa PE21 presentaron un bandeo casi imperceptible en el gel con la inducción con imipenem, mientras que en el gel con la inducción con meropenem se presentó tenue y parecido al observado en las OMVs de la cepa PE21 inducida con carbapenémicos, las cuales

fueron más notorias. Por otra parte, el rango de proteínas visibles fue más denso en la inducción con imipenem respecto a meropenem, e inclusive, identificamos proteínas de peso molecular >150 kDa en las OMVs liberadas ante el estrés por imipenem que se encuentran ausentes en las inducidas con meropenem. Estas diferencias en el contenido de las OMVs podrían fundamentarse en que el cargo proteico es dependiente del carbapenémico utilizado para la inducción, debido a que la cepa estudiada posee diferentes carbapenemasas como son IMP y GES. Este tipo de resultados se han reportado en otros estudios, como el realizado por Hadadi-Fishani en 2021, el cual observó que el contenido de proteínas era mayor en OMVs liberadas en presencia de amikacina y meropenem en comparación a condiciones normales (Hadadi-Fishani *et al.*, 2021). Además, es probable que estén implicados distintos mecanismos de biogénesis de OMVs y que estén estrechamente relacionados a su contenido (Zavan *et al.*, 2023). Pero aún se requieren otros estudios para conocer el cargo proteico de estas microvesículas, tal como análisis proteómicos.

Dado que observamos OprD en las inmunofluorescencias, decidimos realizar un ensayo de inmunodetección en extractos de proteína totales para confirmar la expresión de la porina en muestras de bacteria y OMVs de las cepas PE84, PE21 y PE21 inducida con carbapenémicos, nuestros resultados revelaron la presencia de la porina en extractos de bacteria de las cepas PE84 y PE21, y únicamente en uno de extractos de OMVs de la cepa PE21 sin inducción. Esto resulta contradictorio a lo observado en las inmunofluorescencias, donde obtuvimos señal para OprD en todas las muestras, esto puede deberse a la cantidad de muestra utilizada para el corrimiento de proteínas, por lo que se deben repetir estos experimentos para ajustar las concentraciones. No obstante, Rueda en 2018 observó que la conformación de las proteínas en medio acuoso presenta una mayor diversidad conformacional en comparación a medios no acuosos (Rueda *et al.*, 2018), por lo que la presencia de la porina en las inmunofluorescencias no está directamente correlacionada con los resultados obtenidos en la inmunodetección, ya que en el primer caso OprD se encuentra en su estado nativo unido a membrana, mientras que en el otro se presenta en su conformación en medio acuoso. Además, la desnaturalización de OprD por el SDS de la electroforesis pudo haber contribuido a esta hipotética diferencia

conformacional entre los ensayos. Aunado a esto, la no detección de OprD en las muestras de bacteria y OMVs de la cepa PE21 inducida con imipenem puede deberse precisamente al estímulo sometido, ya que, inclusive en el SDS-PAGE la banda que corresponde a la porina no se encuentra, mientras que en los otros extractos sí, es por ello por lo que también se requiere optimizar y repetir el experimento con una mayor concentración de OMVs, debido a que en este estudio se realizó un solo ensayo de inmunodetección.

Por otro lado, sabemos que la cepa PE21 es resistente a carbapenémicos (López-García *et al.*, 2018) pero desconocíamos si las OMVs tenían actividad de la carbapenemasa. En nuestros ensayos de inhibición a carbapenémicos encontramos la presencia de actividad carbapenemasa en muestras de OMVs de la cepa PE21. La presencia de actividad en las OMVs ya se había reportado en otros estudios como el realizado por López en 2021 donde se encontró que OMVs de *E. coli* pueden acarrear una MBL como IMP-1 (López *et al.*, 2021). Igualmente, observamos que las OMVs de la cepa PE21 utilizadas en los ensayos con imipenem (figura 9) mostraron una mayor hidrólisis en comparación con los ensayos con meropenem (figura 10), esto puede ser debido a que el cargo de las OMVs de *P. aeruginosa* es variable y dependiente del estímulo y tipo de biogénesis (Zavan *et al.*, 2023). Además, encontramos que la actividad carbapenemasa en las OMVs liberadas por la cepa PE21 inducida con carbapenémicos presentó un ligero aumento en el halo de inhibición en comparación a la no inducida, situación que se puede atribuir a un mayor contenido de la enzima, sin embargo, al no ser estadísticamente significativos se requieren de más ensayos con mayor cantidad de OMVs para su confirmación.

Curiosamente, la cepa PE21 es portadora no solo de IMP-62, sino también de GES-32, AmpC y OXA-50, todas con actividad carbapenemasa, no obstante, varían en el grado de hidrólisis (tabla 10) respecto a su constante de catálisis (K_{cat}) y constante de afinidad (K_m). Si bien, existe la posibilidad de que la actividad carbapenemasa registrada en las OMVs se deba a una sobreproducción de AmpC como respuesta a la inducción de antibiótico (Glen & Lamont, 2021) o a la participación de una variante de GES-1 u OXA-50, es poco probable debido a que la K_{cat} de ambas betalactamasas es menor en comparación a IMP-1. En contraparte, la K_m de AmpC, GES-1 y OXA-50

son menor a la de IMP-1, lo cual pudo haber influido a que la biodisponibilidad de imipenem haya disminuido y por ende la hidrolisis del antibiótico sea debido a IMP-62 en las muestras de OMVs. Pese a no contar con la K_{cat} y K_m para GES-32 e IMP-62, realizamos un alineamiento entre GES-1 y GES-32, así como para IMP-1 e IMP-62, obteniendo que su porcentaje de identidad entre secuencias es de 95.1% y 91.4%, respectivamente, por lo que asumimos que son semejantes (Anexo II).

Tabla 10. Parámetros de hidrolisis de β -lactamasas

β -lactamasa	Sustrato	K_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	Referencia
IMP-1	Imipenem	190	33	Queenan et al., 2010.
AmpC	Imipenem	≤ 0.03	1.6	Queenan et al., 2010.
GES-1	Imipenem	0.006	0.8 ± 0.1	Piccirilli et al., 2018.
OXA-50	Imipenem	0.1	20	Girlich et al., 2004.

Realizada con los datos proporcionados por Girlich, 2004; Queenan, 2010; Piccirilli, 2018.

El desarrollo de vacunas utilizando OMVs ha sido registrado con anterioridad, teniendo como ejemplo a la vacuna para la meningitis de serogrupo B BEXSERO® (Kim *et al.*, 2023). Es por ello por lo que, a modo de cierre de este estudio, decidimos estudiar la posibilidad de utilizar a IMP-62 y las OMVs de la cepa PE21 como prospecto para la producción de anticuerpos para utilizarlos en estudios posteriores. De esta manera, determinamos por ensayos *in-silico* que IMP-62 no es alergena ni toxica para su uso en biomodelos. Además, hicimos una construcción 3D de la predisposición de epítopes para linfocitos T y linfocitos B, a modo de sustento de que IMP-62 presenta sitios de reconocimiento para promover una respuesta inmunitaria. Con base a esto, encontramos que los sitios de reconocimiento para linfocitos T y linfocitos B se encuentran expuestos, lo cual resulta conveniente, porque de lo contrario, si estuviesen internalizados la probabilidad de una interacción de estos epítopes con células del sistema inmune sería prácticamente nula.

En la actualidad la participación de las OMVs como mediadores en procesos proinflamatorios, su relación con la activación del endotelio y contribución en casos de sepsis han sido ampliamente estudiados; desde la activación de receptores de tipo TLRs (Michel & Gaborski, 2022) y el incremento de niveles séricos de TNF- α e IL-6 (Park *et al.*, 2010). Además, en un estudio realizado por Hadadi-Fishani en 2021 se encontró que OMVs de *P. aeruginosa* inducidas con amikacina y meropenem

incrementan significativamente la liberación de IL-8, IL-12, IL-17, TNF- α , y el título de IgG1 en comparación a OMVs sin inducción (Hadadi-Fishani *et al.*, 2021).

El hecho de encontrar en ensayos *in-silico* que IMP-62 tiende a ser inmunogénica a partir de una administración de ≥ 2 dosis es causa de preocupación, ya que, no solamente las OMVs de *P. aeruginosa* son capaces de desencadenar una respuesta proinflamatoria (Hadadi-Fishani *et al.*, 2021), sino que también la carbapenemasa IMP-62 está involucrada en la respuesta inmunitaria. Estos resultados sustentan la gravedad de la aparición de cepas clínicas de *P. aeruginosa* portadoras de MBL, recalcando la importancia de su vigilancia y la necesidad de alternativas para contrarrestarlas.

10. CONCLUSIONES

En este estudio abordamos la secreción de las OMVs de la cepa PE21 ante la exposición a imipenem y meropenem, observando que en la presencia de carbapenémicos las OMVs pueden variar en morfología y contenido de proteínas. Encontramos que OprD se encuentra en mayor cantidad en las membranas de OMVs liberadas en condiciones de estrés por carbapenémicos. Observamos que el cargo proteico en las OMVs es dependiente a la inducción del carbapenémico utilizado. Además, se demostró que las OMVs obtenidas con la inducción de carbapenémicos tiene mayor actividad de carbapenemasa que las OMVs sin inducción. Por otro lado, reportamos que IMP-62 puede tener capacidad inmunogénica y carecer de capacidades alergénicas y tóxicas, por lo que es un buen prospecto para obtener anticuerpos y para su uso en ensayos experimentales posteriores.

11. PERSPECTIVAS

- Caracterizar la morfología de OMVs de la cepa PE21 sin y con estrés celular por carbapenémicos mediante microscopía electrónica de transferencia (TEM).
- Analizar la actividad carbapenemasa de OMVs liberadas por la cepa PE21 usando concentraciones $>8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de imipenem y meropenem.
- Analizar la actividad carbapenemasa de OMVs liberadas por la cepa PE21 con ertapenem.
- Optimizar la técnica de SDS-PAGE para OMVs.
- Determinar si las OMVs de la cepa PE21 son tóxicas para otras especies bacterianas.
- Determinar si el estrés celular por carbapenémicos en la cepa PE21 induce la expresión de alguna variante de OprD.
- Corroborar la presencia del gen *bla_{IMP-62}* y la proteína IMP-62 en OMVs de la cepa PE21 mediante PCR y proteómica, respectivamente.
- Profundizar el análisis bioinformático sobre el perfil inmunógeno de la proteína IMP-62.
- Obtener anticuerpos policlonales para la proteína IMP-62.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *54*(1), 20–24.
- Augustyniak, D., Olszak, T., & Drulis-Kawa, Z. (2022). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of *Pseudomonas aeruginosa* Provide Passive Resistance but Not Sensitization to LPS-Specific Phages. *Viruses*, *14*(1). <https://doi.org/10.3390/v14010121>
- Bahr, G., González, L. J., & Vila, A. J. (2021). Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. In *Chemical Reviews* (Vol. 121, Issue 13, pp. 7957–8094). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00138>
- Balasubramanian, R., Van Boeckel, T. P., Carmeli, Y., Cosgrove, S., & Laxminarayan, R. (2023). Global incidence in hospital-associated infections resistant to antibiotics: An analysis of point prevalence surveys from 99 countries. *PLoS Medicine*, *20*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004178>
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 7, Issue 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, *44*(July), 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 54, Issue 3, pp. 969–976). <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Cooke, A. C., Florez, C., Dunshee, E. B., Lieber, A. D., Terry, M. L., Light, C. J., & Schertzer, J. W. (2020). *Pseudomonas* Quinolone Signal-Induced Outer Membrane. *MSphere*, *5*(6), e01109-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mSphere.01109-20>. Editor
- Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. V. (2017b). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert*

Review of Anti-Infective Therapy, 15(3), 277–297.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>

- Espinosa Hernández, S. (2024). CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE OMVs PURIFICADAS DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2043–2048. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004>
- Glen, K. A., & Lamont, I. L. (2021). β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>
- Gómez-Martínez, J. (2023). CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE CARBAPENEMASAS Y ESTUDIO DEL RESISTOMA DE AISLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*. In *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Gómez-Martínez, J., Rocha-Gracia, R. del C., Bello-López, E., Cevallos, M. A., Castañeda-Lucio, M., López-García, A., Sáenz, Y., Jiménez-Flores, G., Cortés-Cortés, G., & Lozano-Zarain, P. (2022). A Plasmid Carrying blaIMP-56 in *Pseudomonas aeruginosa* Belonging to a Novel Resistance Plasmid Family. *Microorganisms*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091863>
- Gómez-Martínez, J., Rocha-Gracia, R. del C., Bello-López, E., Cevallos, M. A., Castañeda-Lucio, M., Sáenz, Y., Jiménez-Flores, G., Cortés-Cortés, G., López-García, A., & Lozano-Zarain, P. (2023). Comparative Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Ecological Niches. *Antibiotics*, 12(866). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050866>
- González-Vázquez, M. C., Rocha-Gracia, R. del C., Carabarán-Lima, A., Bello-López, E., Huerta-Romano, F., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2021). Location of OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Apmis*, 129(4), 213–224. <https://doi.org/10.1111/apm.13118>
- Grande, R., Di Marcantonio, M. C., Robuffo, I., Pompilio, A., Celia, C., Marzio, L. Di, Paolino, D., Codagnone, M., Muraro, R., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., & Mincione, G. (2015). Helicobacter pylori ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01369>
- Hadadi-Fishani, M., Najjar-Peerayeh, S., Davar Siadat, S., Sekhavati, M., & Mohabati Mobarez, A. (2021). Isolation and immunogenicity of extracted outer membrane

- vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* under antibiotics treatment conditions (Vol. 13, Issue 6). <http://ijm.tums.ac.ir>
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2022). The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. In *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 95).
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections – An overview. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 2321–2333). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S177247>
- Hassuna, N. A., Darwish, M. K., Sayed, M., & Ibrahim, R. A. (2020). Molecular epidemiology and mechanisms of high-level resistance to meropenem and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 285–293. <https://doi.org/10.2147/IDR.S233808>
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 1–52. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- Johnston, E. L., Zavan, L., Bitto, N. J., Petrovski, S., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2023). Planktonic and Biofilm-Derived *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles Facilitate Horizontal Gene Transfer of Plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05179-22>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–37). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kim, J. Y., Suh, J. W., Kang, J. S., Kim, S. B., Yoon, Y. K., & Sohn, J. W. (2023). Gram-Negative Bacteria's Outer Membrane Vesicles. In *Infection and Chemotherapy* (Vol. 55, Issue 1, pp. 1–9). Korean Society of Infectious Diseases, Korean Society for Antimicrobial Therapy, Korean Society for AIDS. <https://doi.org/10.3947/ic.2022.0145>
- Kocsis, B., Gulyás, D., & Szabó, D. (2021). Diversity and distribution of resistance markers in *Pseudomonas aeruginosa* international high-risk clones. *Microorganisms*, 9(2), 359. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms9020359>
- Li, H., Luo, Y., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. (2012). International Journal of Medical Microbiology Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>

- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 4, pp. 582–610). <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- López, C., Prunotto, A., Bahr, G., Bonomo, R. A., González, L. J., Peraro, M. D., & Vila, A. J. (2021). Specific protein-membrane interactions promote packaging of metallo- β -lactamases into outer membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00507-21>
- López-García, A., Rocha-Gracia, R. D. C., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., González-Vázquez, M. C., Torres, C., Ayala-Nuñez, T., Jiménez-Flores, G., de la Paz Arenas-Hernández, M. M., & Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1523–1536. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173455>
- Marinacci, B., Krzyżek, P., Pellegrini, B., Turacchio, G., & Grande, R. (2023). Latest Update on Outer Membrane Vesicles and Their Role in Horizontal Gene Transfer: A Mini-Review. In *Membranes* (Vol. 13, Issue 860). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/membranes13110860>
- Metruccio, M. M. E., Evans, D. J., Gabriel, M. M., Kadurugamuwa, J. L., & Fleiszig, S. M. J. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles triggered by human mucosal fluid and lysozyme can prime host tissue surfaces for bacterial adhesion. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00871>
- Michel, L. V., & Gaboriski, T. (2022). Outer membrane vesicles as molecular biomarkers for Gram-negative sepsis: Taking advantage of nature's perfect packages. *Journal of Biological Chemistry*, 298(10). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102483>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue 39). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morales-Aguirre, J. J., & Andrade-Velásquez, J. K. (2006). Artemisa Factores asociados a mortalidad y patrones de susceptibilidad antibiótica en bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 63(5), 291–300.
- Park A. J., Murphy K., Surette M. D., Bandoro C., Krieger J. R., Taylor P., & Khursigara C. M. (2015) Tracking the Dynamic Relationship between Cellular Systems and Extracellular Subproteomes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Proteome Res*, 6;14(11):4524-37. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00262.

- Park, K. S., Choi, K. H., Kim, Y. S., Hong, B. S., Kim, O. Y., Kim, J. H., Yoon, C. M., Koh, G. Y., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2010). Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome. *PLoS ONE*, *5*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011334>
- Piccirilli, A., Mercuri, P. S., Galleni, M., Aschi, M., Matagne, A., Amicosante, G., & Perilli, M. (2018). P174E Substitution in GES-1 and GES-5-Lactamases Improves Catalytic Efficiency toward Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aac.01851-17>
- Pongchaikul, P., & Mongkolsuk, P. (2022). Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- β -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia. *Antibiotics*, *11*(236). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics11020236>
- Queenan, A. M., Shang, W., Flamm, R., & Bush, K. (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 565–569. <https://doi.org/10.1128/AAC.01004-09>
- Qin, Shugang., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(199). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). (2024). *Boletín de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud Cierre 2023*. www.gob.mx/salud
- Rueda, A. J. V., Monzon, A. M., Ardanaz, S. M., Iglesias, L. E., & Parisi, G. (2018). Large scale analysis of protein conformational transitions from aqueous to non-aqueous media. *BMC Bioinformatics*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2044-2>
- Schiavano, G. F., Carloni, E., Andreoni, F., Magi, S., Chironna, M., Brandi, G., & Amagliani, G. (2017). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of oprD in imipenem resistant isolates. *PLoS ONE*, *12*(12), e0189172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189172>
- Suh, J. W., Kang, J. S., Kim, J. Y., Kim, S. B., Yoon, Y. K., & Sohn, J. W. (2024). Characterization of the Outer Membrane Vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* Exhibiting Growth Inhibition against *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicines*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030556>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P.,

- Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tashiro, Y. (2022). Bacterial membrane vesicles with multiple lipid bilayers: vesicles harboring organelle-like structures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 86(8), 967–973. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac066>
- Tenover, F. C., Nicolau, D. P., & Gill, C. M. (2022). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 811–814. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972>
- van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology Journal*, 10, 1689–1706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
- Vilar-Compte, D., Jacquemin, B., Díaz-González, A., Velásquez, C., & Volkow, P. (2003). Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. *Salud Publica Mex*, 45(5), 371–378.
- Wang, Y., Zhang, X., Xu, J., Sun, X., Zhao, X., Li, H., Liu, Y., Tian, J., Hao, X., Kong, X., Wang, Z., Yang, J., & Su, Y. (2022). The Development of Microscopic Imaging Technology and its Application in Micro- and Nanotechnology. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.931169>
- Wehmhöner, D., Häussler, S., Tümmeler, B., Jänsch, L., Bredenbruch, F., Wehland, J., & Steinmetz, I. (2003). Inter and intracolonial diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5807–5814. <https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5807-5814.2003>
- Zavan, L., Fang, H., Johnston, E. L., Whitchurch, C., Greening, D. W., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2023). The mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicle biogenesis determines their protein composition. *Proteomics*, 23(10). <https://doi.org/10.1002/pmic.202200464>

13. ANEXOS

I. Anexos de material y métodos

Preparación de PBS 10X (1 L).

PBS 10X

Reactivo	Concentración	Cantidad
KCl	27 mM	2 g
NaCl	1.36 mM	80 g
KH ₂ PO ₄	15 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	8 mM	21.6 g

Preparación de buffer de transferencia para Western Blot (1 L).

Buffer de transferencia

Reactivo	Concentración	Cantidad
Glicina	39 mM	2.9 g
Tris-Base	48 mM	5.8 g
SDS	0.037%	0.37 g
Metanol	20%	200 mL

Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de OprD y homólogos utilizando Kalign

```

OccD2      -----MRNLFALTPMALALCTASAANA----- DEGEAK
OccD3      MRYQRVTGATLGLALMASAAPGWAADEQATPPTPDNPSYAAQVQSIPSVKPKIKGQAGAS
OccD5      -----MQNLRRAVFAGLVAGTLSEGA----- ATAGDG-
OccD1_OprD -----MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK
OprD_PE21 -----MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK

```

```

OccD2      EGFIEGSSLQLLTRNYFNRDHRHA-----SG----- HDSKEWAQGFIA
OccD3      -GLFEGQSLTLTRNFYSRENMKDS ----- FTFRIPKAGGGSQRIHQRNAWVQGTVL
OccD5      -GFVEDSELQFLARTYYFNRYRDS PNNAGRNRFKPRSERNG----- YREEATQGLRL
OccD1_OprD -GFIEDSSLNLLLRNYFNRDGKEG-----RG----- DRVDWTQGFLLT
OprD_PE21 -GFIEDSSLNLLLRNYFNRDGKSG-----SG----- DRVDWTQGFLLT

```

```

OccD2      TFQSGYTPGVVGFVGDVAYGMLGLKLDGGGGTGGTSLPITAPSKDGYESGKAPDEFSSGG
OccD3      KYSSGYTQGSIGFGFDVAAFNEIALERKGRIGGGGNRTLA----- NSDGEAIGEWKLG
OccD5      QFASGYTPGSLGFLDAHMLGLQLDSSGGRTGTGNLPV ----- GADGHPDHRYGKVG
OccD1_OprD TYESGFTQGTVGFVDAFVYGLGLKLDGTS DKTGTGNLPV ----- MNDGKPRDYSRAG
OprD_PE21 TYESGFTQGTVGFVDAFVYGLGLKLDGTS DKS DKTGTGNLPV ----- MNDGTPRDYSRAG

```

```

OccD2      AA-LKIRAFDTELKLDQFLSNPVVAGGESRMLPQTFRGVSLTNNSEFEDLTLTAGQVSFT OccD3
VANIRLRASNTEFKAGRFLVNTPVFSYIDNRALPSSFTGFAVTSEELDNLSLQAGS--FR OccD5 GA-
LRLRHGETRLKYGQTTTAPVFAASSNRTLAMAYGLLEDRSFDGLLEGG--FT OccD1_OprD GA-
VKVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGH--FT OprD_PE21 GA-
VKVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSELEGLDLEAGH--FT

```

```

OccD2      KYYNQSGHRRLSY -- YGEL-PGDRDSSHLSWLGGTWGGIEGFTSSLYAAELQNVWKQY
OccD3      KVSPTGSGDEDMT-TEYGTR -- QVKGDRNLNGLGGNYKPLDGLLEISLYGSHFQDVWNQY
OccD5      AASGPGESKVRGDI STVYGRGLGAYPVRLDAVGLGGQWQATERLQLSLYASRFDDIWQQA
OccD1_OprD EGKEPTTVKSRGEL -- YATY-AGQT-AKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAELKDIYRQY
OprD_PE21 EGKQGT TTKSRGEL -- YATY-AGET-AKSADFIGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQY

```

```

OccD2      YADVDTY-EIDDNWSLNPGAHYKYTVDSGDSLLGRIDNNTYSLHFAVGYRQHTVTAVLQ OccD3
YLGVT HDIGLENGIALRTAFNGYHTGDTGAREAGYIDNDTWSLAF TLGHRHAHALTLAYQ OccD5
YFGASHRQ-PLGGERALRVLDL DAYRTRDSGQSRFGRIDTLASSLALGYEQGPQRITLAYQ OccD1_OprD
YLNTNYTI-PLASDQSLGFDFNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQ OprD_PE21
YLNSNYTI-PLASDQSLGFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQ

```

```

OccD2      KVNGNTPFDIYINQ ----- DSIFL DNSQQYSDFNPNKESWKLQYDYDFVALGLPLGL
OccD3      QVDGNEYFDYVHET ----- SAIFLANSM-LADYNSPNEKSAQIRYETDWSYGVPGGL
OccD5      RVHGEQPFDIYMAFGD -- GRSSASMLANSVGYSDFNPGERSWQLRYDLDLGALGLPLGL
OccD1_OprD QVHGEDEPFDIYIGFGNGSGAGGDSIFLANSVQYSDFNPGEKSWQARYDLNLASYGVPGGL
OprD_PE21 KVHGDQPFDIYIGFGENSGGGGDSIFLANSVQYSDFNPGEKSWQARYDLNLASYGVPGGL

```

```

OccD2      SASASYSRGK-LDLTRVDPDPSPGYGGW-YSA --- DGKNAKHWERDLDIQYVVQGGPAKD
OccD3      STGVVYVKWDIDGTHYDGRNGAYGN-YAEVRAQDGE--KHHELGLMAAYKVQNGPIKD
OccD5      SLHALHARGR-AGASASSAAESIYAGL-YGR----DG -- RHRESDLGFAYRVKAGPLAG
OccD1_OprD TFMLRYINGKIDIGTKV-DSSSYAGL-YGE----DG -- KHHE TNLEAKYVVQSGPAKD
OprD_PE1 TFMVRYINGKIDIGTKMSDNNVGYKNGYGE----DG -- KHHE TNLEAKYVVQSGPAKD

```

```

OccD2      LSLRLRWATHRGTGGYS AVDNDIDEYRVIVDYPIDVF OccD3
STFKLTYMMHKASQNG--VDG SVNELRLVSTFPFNLL OccD5
LALRASQAWHRGNASY--LDGDIDETRLVVDYSRSIW

```

OccD1_OprD LSFRRIRQA-----
 OprD_PE21 LSFRRIRQAWHRANADQAEGDQND ----- YPLSIL

Alineamientos de las secuencias de aminoácidos y epítopes para linfocitos T de OprD y homólogos

OccD2 -----MRNLFALTPMALALCTASAAWA----- DEGEAK
 OccD3 MRYQRVTGATLGLALMASAAPGWAADQATPPTPDNPSYAAQVQSIPSVEKPIKQAGAS
 OccD5 -----MQNLRRAVFAGLVAGTLSEGAA----- ATAGDG-
 OccD1_OprD ----- MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK
 OprD_PE21 ----- MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK

OccD2 EGFIEGSSSLQLLTRNYFNFHRRHA-----SG----- HDSKEWAQGFIA
 OccD3 -GLFEGQSLTLTRNFYSRENMKDS ----- FTFRIPKAGGGSQRIHQRNAWVQGTVL
 OccD5 -GFVEDSELQFLARTYYFNRDYRDSPPNAGRNRFKPRSERNG----- YREEATQGLRL
 OccD1_OprD -GFIEDSSLNLLLRNYFNRDQKEG-----RG----- DRVDWTQGFLLT
 OprD_PE21 -GFIEDSSLDLLLRNYFNRDQKSG-----SG----- DRVDWTQGFLLT

OccD2 TFQSGYTPGVVGFVGDVAYGMLGLKLDGGGGTGGTSILPITAPSKDGYESGKAPDEFSSGG
 OccD3 KYSSGYTQGSIGFGFDVAAFNEIALERKGRIGGGGNRTLA----- NSDGEAIGEWKLG
 OccD5 QFASGYTPGSLGFLDAHMLGLQLDGGGRTGTGNLPV ----- GADGHPDHRYGKVG
 OccD1_OprD TYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKTGTGNLPV ----- MNDGKPRDDYSRAG
 OprD_PE21 TYESGFTQGTVGFGVDAFGYLGLKLDGTSDKSGTGNLPV ----- MNDGTPRDDYSRAG

OccD2 AA-LKIRAFDTELKLDQFLSNPVVAGGESRMLPQTFRGVSLTNNSEFEDLTLTAGQVSFT OccD3
 VANIRLRASNTEFKAGFLVNTPVFSYIDNRALPSSFTGFAVTSEELDNLSQLAGS--FR OccD5 GA-
 LRLRHGETRLKYGQTTSAPVFAASSNRTLGMAYGLLLEDERSFDGLLEGG--FT OccD1_OprD GA-
 VKVRIKSTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGH--FT OprD_PE21 GA-
 VKVRIKSTMLKWGEMQPTAPVFAAGSRLFPQTATGFQLQSSELEGLDLEAGH--FT

OccD2 KYNQSGHRRLLGSY---YGEL-PGDRDSSHLSWLGWTGGIEGFTSSLYAAELQNVMKQY OccD3
 KVSPRTGSGDEDMTTEYGTR---QVKGDRLNLYLGGNYKPLDGLAISLYGSHFQDVWNQY OccD5
 AASGPGESKVRGDISTVYGRLGAYPVRDVAVGFLGGQWQATERLQLSIYASRFDDIWQQA OccD1_OprD
 EGKEPTTVKSRGEL---YATY-AGQT-AKSAADFAGGRYAITDNLSASLYGAELKDIYRQY OprD_PE21
 EGKQGTTVKSRGEL---YATY-AGET-AKSAADFAGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQY

OccD2 YADVDTY-EIDDNWSLNPGAHYKTVDSGDSLLGRIDNNTYSLHFAVGYRQHTVTAVLQ OccD3
 YLGVTHDIGDLENGIALRTAFNGYHTGDTGAREAGYIDNDTWSLAF TLGHRRAHALTLAYQ OccD5
 YFGASHRQ-PLGGERALRVLDAYRTRDSGQSRFGRIDTLASSLALGYEQGPQRITLAYQ OccD1_OprD
 YLNTNYTI-PLASDQSLGFDFNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQ OprD_PE21
 YLNSNYTI-PLASDQSLGFDFNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQ

OccD2 KVNNTFPFDYINQG ----- DSIFLDNSQQYSDFNPNKSWKLOYDYDFVALGLPGL
 OccD3 QVDGNEYFDYVHET ----- SAIFLANSMLADYNSPNEKSAQIRYETDWSYYGVPL
 OccD5 RVHGEQPFDYMAFGD -- GRSSASMVLANSVGYSDFNPGERSWQLRYDLDLGALGLPGL
 OccD1_OprD QVHGDEPFDYIGFGNGSAGGDSIFLANSVQYSDFNPGEKSWQARYDLNLSYGVPL
 OprD_PE21 KVHGDQPFDYIGFGENSGGGGDSIFLANSVQYSDFNPGEKSWQARYDLNLSYGVPL

OccD2 SASASYSRGK-LDLTRVDFSPGYGGW-YSA --- DGKNAKHWERDLDLQYVVQGGPAKD
 OccD3 STGVVYVKGWDIDGTHYDGDRNGAYGN-YAEVRAQDGE--KHHELGLMAAYKVQNGPIKD
 OccD5 SLHALHARGR-AGASSAAESIYAGL-YGR----DG -- RHRESDLGFAYRVKAGPLAG
 OccD1_OprD TFMLRYINGKIDIGTKV-DSSSYAGL-YGE----DG -- KHHEINLEAKYVVQSGPAKD

OprD_PE21 TFMVRYINGKDIDGT KMSDNNVGYKNGYGE----DG---KHHEITNLEAKYVVQSGPAKD

OccD2 LSLRLRWATHRGTGGYSAVDNDIDEYRVIVDYPIDVF OccD3
STFKLTYMMHKASQNQ--VDGSVNEILRVSTFPFNLL OccD5
LALRASQAWHRGNASY--LDGDIDETRLVVDYSRSIW OccD1_OprD
LSFRIRQA -----
OprD_PE21 LSFIRIRQAWHRANADQAEQDQND YPLSIL

Alineamientos de las secuencias de aminoácidos y epítopes para linfocitos B de OprD y homólogos

OccD2 -----MRNLFALTPMALALCTASAANA----- DEGEAK
OccD3 MRYQRVTGATLGLALMASAAPGWA ADEQATPPTP DNPSYAAQVQSIPSVKEPIKGQAGAS
OccD5 -----MQNLRRAVFAVLVAGTLSEGA----- ATAGDG-
OccD1_OprD -----MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADA FVSDQAEAK
OprD_p21 -----MK-VMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAK

OccD2 EGFIEGSSLQLLTRNYYFNH DRRHA-----SG----- HDSKEWAQGFIA
OccD3 -GLFEGQSLTLTRNFYSRENMKDS----- FTFRIPKAGGGSQRIHQRNAWVQGTVL
OccD5 -GFVEDSELQFLARTYYFNRDYRDS PNNAGRNRFKPRSERNG----- YREATQGLRL
OccD1_OprD -GFIEDSSLNLLLRNYYFNRDGKEG-----RG----- DRVDWTQGFLLT
OprD_p21 -GFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGKSG-----SG----- DRVDWTQGFLLT

OccD2 TFQSGYTPGVVGFVGDVAYGMLGLKLDGGGGTGGTSLPITAPSKDGYESGKAPDEFSSGG
OccD3 KYS SGYTQGS IGFGFDVAAFNEIALERKGRIGGGNRTLA----- NSDGEAIGEWKLG
OccD5 QFASGYTPGSLGFGLDAHAMLGLQLDSGGGRTGTGNLPV----- GADGHPDHRYGKVG
OccD1_OprD TYESGFTQGT VVGFVGDVAFYGLGLKLDGTS DKTGTGNLPV----- MNDGKPRDDYSRAG
OprD_p21 TYESGFTQGT VVGFVGDVAFYGLGLKLDGTS DKS DKTGTGNLPV----- MNDGTPRDDYSRAG

OccD2 AA-LKIRAFDTELKLDQFLSNPVVAGGESRMLPQTFRGVSLTNNSEFEDLTLTAGQVSFT OccD3
VANIRLRASNETFKAGRFLVNTPVFSYIDNRALPSSFTGFAVTSEELDNLSLQAGS--FR OccD5 GA-
LRLRHGETRLKYQTTTAPVFAASSNRTLAGMAYGLLEDRSFDGLLEGG--FT OccD1_OprD GA-
VKVRIKSTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGH--FT OprD_p21 GA-
VKVRIKSTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSELEGLDLEAGH--FT

OccD2 KYYNQSGHRRLLGSY---YGEL-PGDRDSHLSWLGGTWGGIEGFTSSLYAAELQNVWKQY OccD3
KVSPRTGSGDEDMT-TEYGTR---QVKGDRNLNYLGGNYKPLDGLLEISLYGSHFQDVWNQY OccD5
AASGPGESKVRGDI STVYGRLGAYPVRDLDAVGFGLGQWQATERLQLSLYASRFDDIWQQA OccD1_OprD
EGKEPTTVKSRGEL---YATY-AGQT-AKSADFAGGRYAITDNLSASLYGAELKDIYRQY OprD_PE21
EGKQGTTKSRGEL---YATY-AGET-AKSADFIGGRYAITDNLSASLYGAELEDIYRQY

OccD2 YADVDTY-EIDDNWSLNPGAHYKTVDSGDSLLGRIDNNTYSLHFVGYRQHTVTAVLQ OccD3
YLGVTHDIGDLENGIALRTAFNGYHTGDTGAREAGYIDNDTWSLAFTLGHRAHALTLAYQ OccD5
YFGASHRQ-PLGGERALRVDLDAYRTRDSGQSRFGRIDTLASSLALGYEQGPQRITLAYQ OccD1_OprD
YLNTNYTI-PLASDQSLGDFDNIYRTTDEGKSKAGDISNTTWSLAGAYTLDAHTFTLAYQ OprD_PE21
YLNSNYTI-PLASDQSLGDFDNIYRTNDEGKAKAGDISNTTWSLAAAYTLDAHTFTLAYQ

OccD2 KVNQNTFPDYINQG----- DSIFLDNSQQYSDFNQPNKESWKLQYDYDFVALGLPGL
OccD3 QVDGNEYFDYVHET----- SAIFLANSMLADYNLSPNPKSAQIRYETDWSYGVVPL
OccD5 RVHGEQPFDYMAFGD-- GRSSASMLANSVGYSDFNQPGERSWQLRYDLDLGALGLPGL
OccD1_OprD QVHGDEPFDYIGFNGGNSGAGGDSIFLANSVQYSDFNQPGKESWQARYDLNLSYGVVPL
OprD_PE21 KVHGDQPFDYIGFNGGNSGAGGDSIFLANSVQYSDFNQPGKESWQARYDLNLSYGVVPL

OccD2 SASASYSR GK-LDLTRVDPDSPGYGGW-YSA --- DGKNAKHWERDLDLQYV VQGGPAKD
 OccD3 STGVWYVKGWDIDGTHYDGDRNGAYGN-YAEVRAQDGE--KHHELGLMAAYKVQNGPIKD
 OccD5 SLHALHARGR-AGASASSAAESIYAGL-YGR-----DG -- RHRESDLGFAYRVKAGPLAG
 OccD1_OprD TFMLRYINGKIDGTKV-DSSSSYAGL-YGE-----DG -- KHHETNLEAKYVVQSGPAKD
 OprD_PE1 TFMVRYINGKIDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGE-----DG -- KHHETNLEAKYVVQSGPAKD

OccD2 LSLRLRWATHRG TGGYSAVDNDI DEYRVIVDYPIDVF OccD3
 STFKLTYMMHKASQNC--VDGSVNELRLVSTFPFNLL OccD5
 LALRASQAWHRGNASY--LDGDI DETRLVVDYSRSIW OccD1_OprD
 LSFIRQA -----
 OprD_PE21 LSFIRQAWHRANADQAE G DQND YPLSIL

Código de colores

Epítomos para linfocitos T: ABCD

Epítomos para linfocitos B: ABCD

Alineamientos de las secuencias de GES-1 y GES-32 utilizando Kalign

GES-1 MRFIHALLAGIAHSAYASEKLTFRITDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRF
 GES-32 MRFIHALFLAGIAHSASASENLTFRITDLEKLEREKAAEIGVAIVDPQGGIVAGHRIEORF

GES-1 AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPD MIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQA
 GES-32 AMCSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGRDMIVKWSPAAERFLASGHMTVLEAAQA

GES-1 AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSR LDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTPIA
 GES-32 AVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVSR LDRKEPEMGDNTPGDLRDTTTPIA

GES-1 MARTVAKVLYGGALTSSTHTTIERWLIGNQTGDATLRAGFPKDWVIGEKTGTCANGGRND
 GES-32 MARTVAKVLYGGALTPTSTHTTIERWLIGNQTGDATLRAGFPKDWVIGEKTGTCANGGRND

GES-1 IGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK
 GES-32 IGFFKAQDRDYAVAVYTTAPKLSAEQRDELVASVGQVITQLILSTDK

GES-1: 287 aminoácidos

GES-32: 287 aminoácidos.

Cambios aminoacídicos entre GES-1 y GES-32: 14 aminoácidos.

Relación GES-1/GES-32: 95.1%.

Alineamientos de las secuencias de IMP-1 e IMP-62 utilizando Kalign

```
IMP-1      MSKLSVFFIFLFCSIATAAESLPDLKIEKLDEGVYVHTSFEEVNGWGVVPKHGLVVLVNA
IMP-62     MNKLSVFFMFMFCSITAAGESLPDLKIEKLDEGVYVHTSFEEVNGWGVVPKHGLVVLVNT

IMP-1      EAYLIDTPFTAkdTEKLVTWFVERGYKIKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSRSIPTYASELT
IMP-62     EAYLIDTPFTAkdTEKLVTWFVERGYKIKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSQSIPTYASELT

IMP-1      NELLKKGDKVQATNSFSGVNYWLVKNKIEVFYPGPGHTPDNVVVWLPERKILFGGCFIKP
IMP-62     NELLKKGDKVQAKNSFSGGSYWLVNKNKIEVFYPGPGHTPDNVVVWLPERVLFGGCFVKKP

IMP-1      YLGNLGDANIEAWPKSAKLLKSKYGKAKLVVPSHSEVGDASLLKLTLEQAVKGLNESKK
IMP-62     YLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSGHSETGNASLLKLTWEQAVKGLKESKK

IMP-1      PSKPSN
IMP-62     PSLPSN
```

IMP-1: 246 aminoácidos

IMP-62: 246 aminoácidos.

Cambios aminoacídicos entre IMP-1 e IMP-62: 21 aminoácidos.

Relación IMP-1/IMP-62: 91.4%.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS COMO TESISISTA

Participación como expositor de cartel en el **1er Congreso Nexus: De la Bioinformática a lo Experimental**, celebrado el 07 y 08 de noviembre del 2024 en **Puebla, Puebla**. Obteniendo el 2º lugar en la **Categoría de Nivel Pregrado** con la presentación del cartel: **“Evaluación inmunogénica in silico de la nueva variante IMP-62 presente en una cepa de Pseudomonas aeruginosa de un hospital en México”**.



CONEXBIO

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y
el comité organizador de CONEXBIO

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

Diego Díaz de la Cruz

Por haber obtenido el **2do lugar en la Categoría de Nivel pregrado con la presentación del cartel: "Evaluación inmunogénica in silico de la nueva variante IMP-62 presente en una cepa de Pseudomonas aeruginosa de un hospital en México"**

Durante las actividades del: **1er Congreso NEXUS: De la Bioinformática a la Experimental.**

Celebrada en la Benemérita Universidad de Puebla los días 7 y 8 de noviembre de 2024

Expedido en la H. Puebla de Z, Puebla a 08 de noviembre de 2024


Dr. Alan Carrasco Carballo
Comité Organizador CONEXBIO