



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PURIFICACIÓN DE OMV's de *Citrobacter freundii* y  
*Citrobacter amalonaticus*: DETERMINACIÓN DEL  
CARGO MOLECULAR ASOCIADO A LA RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

C. AYLIN ALEJANDRA JUÁREZ CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS:

D. C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ



CO-DIRECTOR DE TESIS:

D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

PUEBLA, PUE.

SEPTIEMBRE 2023

## Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a mi mamá, gracias por tu apoyo, sacrificios y amor. Por ser mi mayor ejemplo de fortaleza, la persona que soy ahora, es gracias a ti. Este logro, también es tuyo, te quiero.

A mis hermanas, Dany y Danna, por su apoyo incondicional y estar siempre en todo momento, por ser mi mejor compañía. Sé que siempre puedo contar con ustedes, así como ustedes conmigo, las quiero.

A mi directora de tesis Dra. María Cristina González Vázquez, por aceptarme y brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de tesis, por compartirme sus enseñanzas. Gracias por su apoyo incondicional y guiarme durante todo este tiempo.

A mi co-director Dr. Alejandro Carabarán Lima, por permitirme trabajar en su laboratorio y compartir conmigo sus conocimientos. Muchas gracias por su tiempo, dedicación y paciencia para llevar a cabo este trabajo de tesis.

A mis compañeras de laboratorio, Oli y Sofi, por el tiempo compartido, su apoyo y brindarme su amistad.

A mis amigos, Melissa, Haz, Jak y Eve, por creer en mí y apoyarme siempre. Gracias por los momentos tan bonitos que vivimos en la universidad y por su amistad incondicional.

A mi mejor amigo, por ser mi felicidad y lo más bonito que tengo.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser mi *alma mater*, brindarme años llenos de conocimiento y experiencia que me fortalecieron de manera personal, académica y profesional, así como la oportunidad de participar en programas de investigación que me dejaron mucho aprendizaje.

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Índice de tablas.....	5
Índice de figuras.....	5
Glosario de abreviaturas.....	7
Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Generalidades.....	10
1.2 Importancia clínica.....	10
1.3 Resistencia antimicrobiana.....	11
1.4 Microvesículas de Membrana Externa (OMV's).....	12
1.4.1 Generalidades.....	12
1.4.2 Funciones.....	17
1.4.3 OMV's como factor de virulencia y su papel en la patogenicidad.....	17
1.4.4 Resistencia a los antibióticos mediada por OMV's.....	18
2. Antecedentes.....	19
2.1 Antecedentes generales .....	19
2.2 Antecedentes particulares .....	21
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	23

6.	Esquema general de trabajo.....	24
7.	Materiales y método.....	25
	7.1 Aislamiento de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> .....	25
	7.2 Secreción de OMV's.....	25
	7.3 Purificación de OMV's por centrifugación.....	25
	7.4 Tinciones en OMV's.....	26
	7.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	27
	7.6 Obtención del perfil proteico de extractos totales de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> y de las OMV's secretadas.....	27
	7.6.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	28
	7.7 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.....	28
	7.8 Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's.....	29
	7.8.1 Análisis estadístico.....	31
	7.9 Extracción de DNA genómico de bacterias transformadas por OMV's.....	31
	7.9.1 Amplificación de genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
8.	Resultados.....	34
	8.1 Purificación de OMV's.....	34
	8.2 Microscopía Electrónica de Transmisión .....	35
	8.3 Perfil proteico de OMV's en gel SDS-PAGE.....	36
	8.4 Ensayo de inmunofluorescencia.....	38
	8.5 Ensayo de protección contra antibiótico .....	40
	8.6 Amplificación de diferentes genes de resistencia .....	41
9.	Discusión.....	44

10.	Conclusiones.....	50
11.	Líneas de trabajo a futuro.....	51
12.	Referencias.....	51
13.	Anexos.....	60

## Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para <i>C. freundii</i> .	30
2	Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para <i>C. amalonaticus</i> .	30
3	Componentes para PCR con la enzima Green Taq DNA Polymerase.	32
4	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia.	33
5	Proteínas presuntamente presentes en el cargo de OMV's de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> .	37

## Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Cargo molecular de las OMV's.	13
2	Representación esquemática de una vesícula de membrana externa (OMV's).	15

<b>3</b>	Esquema de producción de OMV's a causa de estrés por antibiótico.	19
<b>4</b>	Diseño experimental.	24
<b>5</b>	Tinción de Gram en bacterias y OMV's.	35
<b>6</b>	Tinción de Hiss.	35
<b>7</b>	Microscopía electrónica de transmisión de microvesículas purificadas de <i>C. freundii</i> .	36
<b>8</b>	Migración electroforética de las proteínas de OMV's de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> .	37
<b>9</b>	Microscopía de epifluorescencia de OMV's de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> marcadas con FITC.	39
<b>10</b>	Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's de <i>C. freundii</i> .	41
<b>11</b>	Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> .	41
<b>12</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado del gen <i>bla TEM</i> .	42
<b>13</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado del gen <i>bla CTX-M-UNIVERSAL</i> y <i>bla CTX-M</i> .	43
<b>14</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado de los genes <i>bla KPC</i> y <i>bla OXA-58</i> .	43

## Glosario de abreviaturas y símbolos

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
bla	Genes de resistencia a betalactamasas
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
EPC	Enterobacterias productoras de Carbapenemasas
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
g	Gramos
hrs	Horas
IgM	Inmunoglobulina M
ITU	Infecciones de Tracto Urinario
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mg	Miligramos
MV	Vesícula de membrana
MPM	Marcador de Peso Molecular
NaCl	Cloruro de Sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de Amonio
nm	Nanómetros
OMV's	Microvesículas de Membrana Externa
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	Revoluciones por minuto

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de proteínas
sp	Especie
spp	Especies
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TM-SMZ	Trimetoprima-Sulfametoxazol
T0SS	Sistema de Secreción Tipo 0
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Voltios



## Resumen

*Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* son consideradas bacterias patógenas oportunistas, causantes de infecciones intestinales y extraintestinales que poseen un sistema de secreción para el transporte de moléculas a nivel extracelular. Las microvesículas de membrana externa (OMV's) son esferas lipídicas de tamaño nanométrico originadas a partir de la membrana externa de la bacteria que le dio origen. Estas partículas pueden transportar una importante variedad de biomoléculas como: enzimas, toxinas, proteínas e incluso ácidos nucleicos. Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, se prepararon medios de cultivo para la inducción de secreción de OMV's, así como su purificación. Se realizaron tinciones en las bacterias y sus OMV's. Se llevó a cabo una comparación del perfil proteico de los extractos totales bacterianos y de las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* mediante SDS-PAGE. También, se realizó una inmunofluorescencia indirecta en las OMV's. Se hicieron ensayos de protección mediados por OMV's en una cepa susceptible a un antibiótico y finalmente se amplificaron los genes codificantes para resistencia a beta-lactámicos en *Citrobacter*, así como la transferencia horizontal de estos genes. Los resultados demostraron que *C. freundii* y *C. amalonaticus* son capaces de secretar OMV's, además poseen un cargo molecular importante para asegurar su supervivencia en ambientes con antibióticos, presenta enzimas betalactamasas y pueden transferir los genes codificantes para las betalactamasas a otros géneros bacterianos. Este mecanismo de secreción de OMV's puede estar involucrado en la patogenicidad y virulencia de estas bacterias.

**Palabras clave:** *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, microvesículas de membrana externa (OMV's), Betalactamasas, Transferencia de genes.

# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades

*Citrobacter* es un género de bacterias Gram-negativas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo anaerobio facultativo móvil, descrito por vez primera en el año 1932 por Werkman y Gillen. La presencia de *Citrobacter* sp. ha sido reportada en suelo, restos de aguas residuales, cuerpos de agua, intestino humano e intestinos de animales, siendo reconocida como un agente etiológico (Manganello et. al., 2001). *C. freundii* y *C. amalonaticus* son bacterias patógenas frecuentes de infecciones asociadas a la atención de la salud del tracto urinario, tracto respiratorio y sangre (Uliauri-González y Freire-Cuesta, 2019).

## 1.2 Importancia clínica

*Citrobacter freundii* es un patógeno nosocomial causante de infecciones intestinales y extraintestinales como: infecciones del tracto urinario (ITU), meningitis, septicemia y absceso cerebral (Uliauri-González y Freire-Cuesta, 2019), por otro lado, *Citrobacter amalonaticus* también es considerado un patógeno humano oportunista, ya que tiene el potencial de causar meningitis neonatal e ITU. Puede encontrarse en orina, exudados de tejidos blandos e incluso agua o alimentos (Goh et. al., 2016). Este género es el agente causal de infecciones, principalmente en hospederos inmunocomprometidos y neonatos, identificándose que la vía de entrada más frecuente es la vía respiratoria, seguido del tracto intestinal (Uliauri-González y Freire-Cuesta, 2019).

En el tracto intestinal, capaz de destruir microvellosidades, formando lesiones muy características denominadas de adherencia y eliminación. *Citrobacter* origina abscesos, la bacteria se disemina por vía hematológica hasta el parénquima cerebral. Los abscesos cerebrales en neonatos y lactantes muestran signos de infección e hipertensión endocraneana, y síntomas como vómitos (Azrak et. al., 2009).

El género de *Citrobacter* es el tercer agente causante más común de infecciones urinarias en pacientes hospitalizados, después de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. (Kumar, Meghvansi & Kamboj, 2021), sin embargo, el porcentaje que representa es muy bajo. Cabe destacar que, aunque este género es considerado un patógeno raro en humanos, posee genes de resistencia que le confieren la capacidad de sobrevivir en un ambiente con antibióticos.

### **1.3 Resistencia antimicrobiana**

Con el paso de los años, la ciencia se ha encargado de desarrollar nuevos fármacos antimicrobianos para combatir las infecciones, sin embargo, el mal uso de estos ha provocado que las bacterias patógenas generen resistencia a varios antibióticos como los carbapenémicos y las cefalosporinas.

La presencia de *Citrobacter* sp. en cuerpos de agua es una grave amenaza a la salud pública, ya que este tipo de bacterias tienen la facilidad de propagarse y provocar infección de manera muy rápida. La resistencia a los antibióticos es la responsable de muchas muertes al año a nivel mundial y estas seguirán aumentando de manera gradual. Los ecosistemas naturales se han considerado como reservorios importantes de genes con resistencia a antibióticos, además existen reportes de la presencia de *Enterobacteriaceae* en ríos, aguas fluviales y sistemas de alcantarillado hospitalario. Estas bacterias se diseminan al medio ambiente provocando una interacción entre el humano y fuentes de agua que conlleva a adquirir infecciones graves (Suzuki et. al., 2020).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede ser de manera innata o por resistencia adquirida dada por alguna mutación o por transferencia de genes. El mecanismo de transferencia de genes entre las bacterias es rápido, eficaz y puede darse de manera horizontal, ya que es independiente a cualquier otro mecanismo de reproducción, o vertical cuando se presenta durante la reproducción bacteriana. La transferencia horizontal de genes puede darse de 3 maneras que son transducción, transformación y conjugación (Oromí Durich, 2000).

La transducción ocurre por medio de un vector bacteriófago que transfiere un fragmento de ADN de una bacteria a otra, capaz de infectar a una nueva bacteria y suministrar genes nuevos, como los genes de resistencia a antibióticos. La transformación es un proceso que ocurre por adquisición e integración de ADN exógeno captado por la bacteria del medio externo. Y la conjugación, es un mecanismo en donde el ADN se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora por contacto celular, este tipo de transferencia horizontal es considerado el más común entre las especies bacterianas (Oromí Durich, 2000; Rozo & Dussán, 2010).

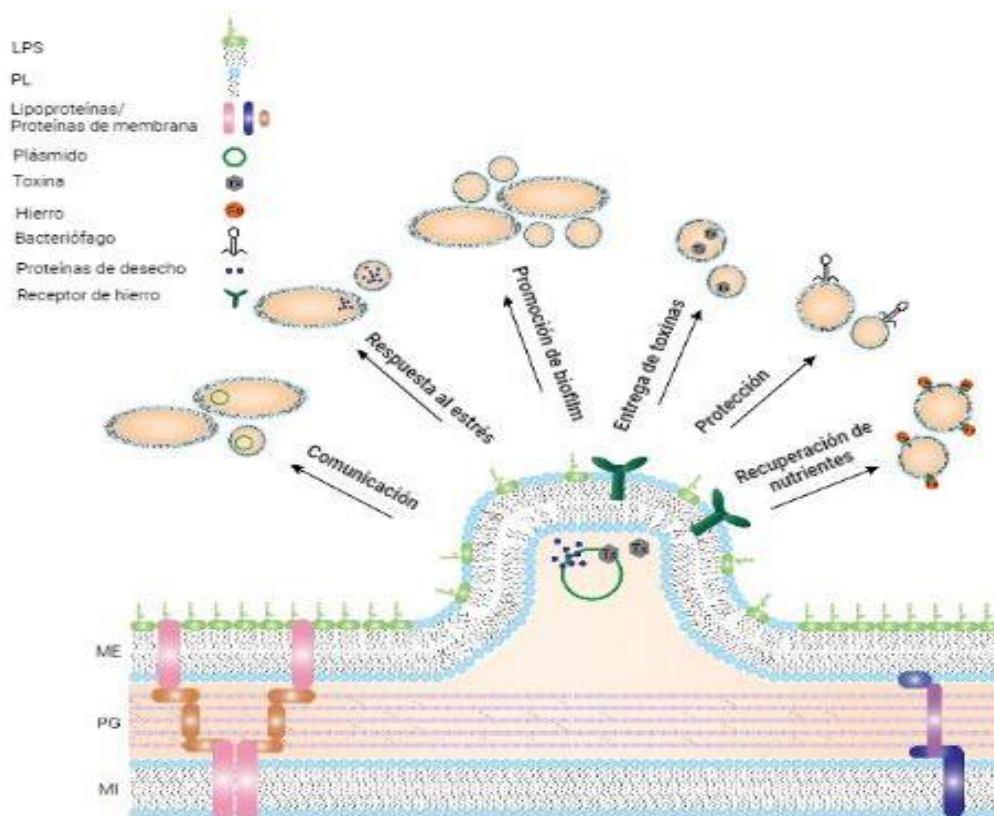
En la actualidad, varios autores han propuesto que las estructuras extracelulares, son un sistema de secreción y de transporte de biomoléculas. En 1966, se demostró la presencia de estructuras de membrana que formaban vesículas derivadas de la membrana externa (Sartorio et. al., 2021). Posteriormente, se siguieron realizando observaciones sobre la secreción de vesículas de membrana y sus funciones, entre ellas la diseminación de resistencia. Las microvesículas de membrana externa (OMV's por sus siglas en inglés) son estructuras de tamaño nanométrico originadas de la membrana externa de la bacteria capaces de transportar una gran variedad de biomoléculas como enzimas, toxinas e incluso ácidos nucleicos. Estas OMV's son un potencial mecanismo de transporte de biomoléculas relacionadas a una amplia gama de funciones (Parker et. al., 2010; Jiang et. al., 2022).

## **1.4 Microvesículas de Membrana Externa (OMV's)**

### **1.4.1 Generalidades**

La formación y liberación de vesículas extracelulares es un mecanismo celular conservado. En células eucariotas, la liberación de vesículas extracelulares surge de manera natural para llevar a cabo diversos procesos biológicos y se han clasificado en tres tipos que son: exosomas (40-100 nm), microvesículas (50-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (800-5000 nm). Estas últimas, comparten algunas propiedades con las microvesículas bacterianas (Gill, Catchpole & Forterre, 2019).

En las bacterias, las microvesículas son denominadas microvesículas de membrana externa (OMV's), éstas son partículas lipídicas que se desprenden de la envoltura celular de las bacterias, y estas se producen en varios entornos tales como biopelículas, células hospederas y cuerpos de agua. Generalmente, las bacterias Gram-negativas son capaces de producir estas estructuras esféricas de aproximadamente 20 a 300 nm de diámetro que son derivadas de su membrana externa (ME) y en su interior poseen un contenido molecular biológicamente activo que cumple un papel importante en diferentes procesos como se muestra a continuación en la Figura 1.



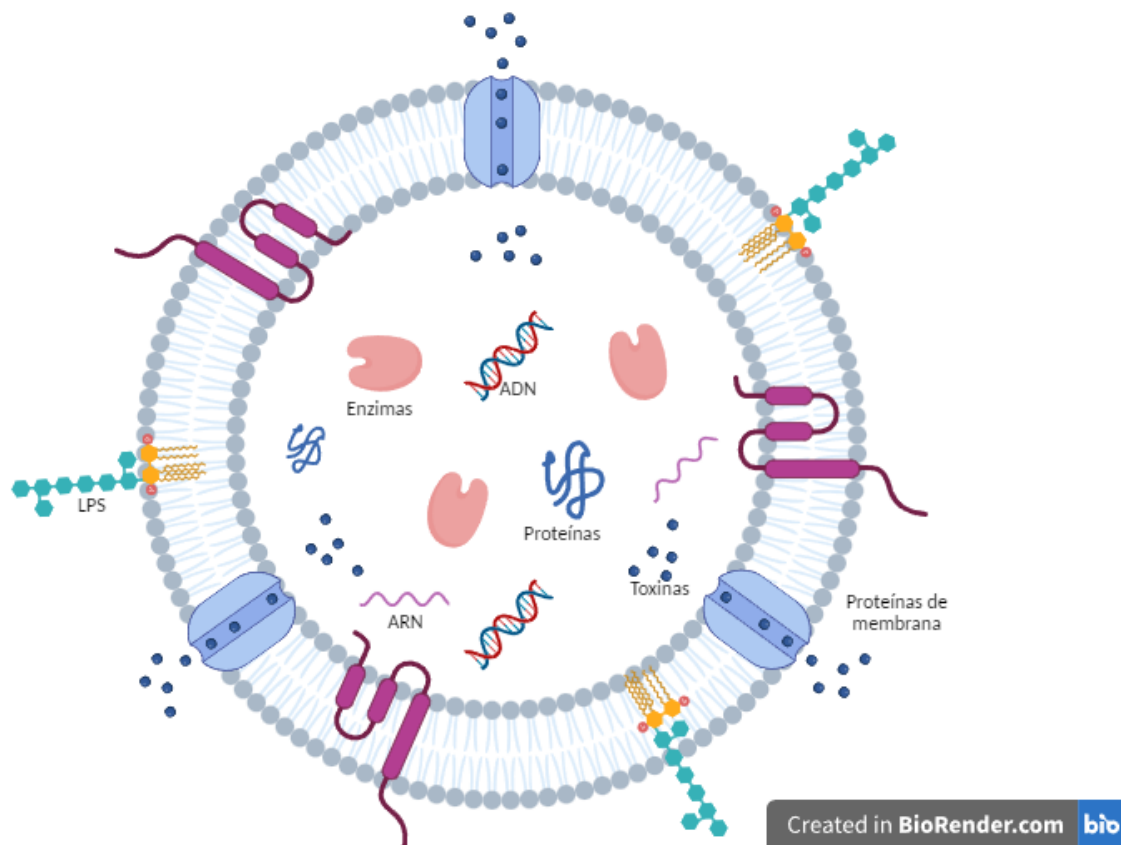
**Figura 1.** Cargo molecular de las OMV's involucrado en múltiples funciones como la comunicación, en transporte de toxinas, entre otras. LPS: lipopolisacárido, PL: fosfolípido, Me: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna. (Imagen modificada obtenida de Balhuizen et. al., 2021).

Las OMV's fueron detectadas por vez primera en bacterias cuando se observó el sobrenadante libre de células de cultivos de *E. coli* cultivados en condiciones de crecimiento limitantes de lisina (Bishop & Work, 1965).

Los mecanismos de secreción de las OMV's son diversos. En 2007, McBroom & Kuehn hicieron una descripción sobre la respuesta al estrés de la envoltura bacteriana de *E. coli*, además de la identificación de un posible mecanismo para liberar la producción de OMV's empaquetando proteínas de estrés para ser eliminadas de la célula, siendo este un proceso de selección de carga preferencial para la supervivencia bacteriana (MacBroom & Kuehn, 2007).

Desde hace algunos años, se han realizado estudios sobre algunos procesos de secreción y cómo es que las bacterias, por medio de efectos distales como la secreción (Zou et. al., 2022). Las bacterias han desarrollado una gran variedad de nanomáquinas especializadas y enviar proteínas u otras moléculas biológicas al exterior, además, permiten a las bacterias interactuar con el medio en el que se encuentran, así como con otros organismos que forman parte de su hábitat (Costa et. al., 2015). Actualmente, existen seis sistemas de secreción (tipos I-VI) de las bacterias Gram-negativas, aunque es importante destacar la existencia de un nuevo tipo de secreción independiente denominado como tipo 0 (T0SS).

El T0SS posee algunas ventajas en comparación con otros sistemas que utilizan las bacterias Gram-negativas, una de las ventajas es que permite la secreción de proteínas hidrofóbicas y lípidos (Guerrero-Mandujano et. al., 2017), y la encapsulación de una variedad de moléculas. Asimismo, es capaz de encapsular y transportar toxinas, lipopolisacáridos (LPS), proteínas, enzimas, ADN, ARN entre otras moléculas (Figura 2), por lo que varios autores consideran que las moléculas que transportan podrían ser de mayor diversidad que la de efectores transportados por otros sistemas (Kulp y Kuehn, 2010; Thay et. al., 2014; Guerrero-Mandujano et. al., 2017).



**Figura 2.** Representación esquemática de una vesícula de membrana externa (OMV's) con cargo molecular que puede estar contenido en el interior de la OMV's, asociada o integrada en la membrana de la vesícula (elaboración propia).

Los mecanismos que dan lugar a la biogénesis de las OMV's son variados e involucra que la membrana externa sufra una serie de modificaciones por medio de una evaginación, fisión y desprendimiento para la formación de la vesícula. Es importante considerar la arquitectura de la envoltura celular, pues consta de la membrana interna (MI) o citoplasmática, membrana externa (ME) y en medio de ellas se encuentra el espacio periplásmico que contiene una capa de peptidoglicano (PG) (Kamio y Nikaido, 1976; Silhavy, Kahne & Walker, 2010).

La MI es una bicapa de fosfolípidos que tiene la función de barrera electroquímica. El espacio periplasmático o periplasma es un compartimento que rodea al citoplasma y provee un ambiente oxidante donde muchas estructuras proteicas pueden estabilizarse por medio de puentes disulfuro, en donde además se establece una estrecha relación con la capa de PG, compuesta por unidades repetidas del disacárido N-acetil glucosamina- ácido N-acetilmurámico (NAG–NAM), que están

entrecruzadas por cadenas laterales que brinda protección contra los cambios osmóticos y el estrés (Dmitriev, Toukach & Ehlers, 2005; Schwechheimer & Kuehn, 2015). La ME también es una bicapa lipídica en la que la capa interna está compuesta por fosfolípidos, y la capa externa principalmente por lipopolisacáridos (LPS) los cuales están compuestos por el lípido, oligosacárido central y el antígeno O (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Para que se lleve a cabo la producción de OMV's, la ME se desprende de la capa de PG hasta que se forma la vesícula, sin dañar la integridad de la membrana, preservando así la viabilidad bacteriana. Existen diversos mecanismos que se encargan de la biogénesis. Esta se da por la actividad de varias enzimas y proteínas que se encuentran en el periplasma y que están relacionadas con los entrecruzamientos de PG (Kulp y Khuen, 2010).

Un mecanismo es la reducción de enlaces cruzados entre la lipoproteína de Braun (Lpp) y el PG (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Otro mecanismo de biogénesis es la acumulación de proteínas mal plegadas en la ME, en donde los enlaces se desplazan y se genera un abultamiento provocando que la OMV's sobresalga y se encapsule (Kulp y Khuen, 2010). Otro modelo de biogénesis es por la acumulación de moléculas específicas como LPS, algunos fosfolípidos o moléculas asociadas que, debido a la carga y al aumento de volumen en la membrana, resulta en la producción de OMV's. Existe otro mecanismo más selectivo, en el cual algunos componentes integrales o auxiliares de la ME tienden a brotar y ser expulsados por OMV's (Mogensen & Otzen, 2005; McBroom & Kuehn, 2007; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Los cambios biofísicos en la curvatura de la membrana se han estudiado en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, pues el incremento de los niveles de quinolona (PQS), una molécula de detección de quórum en la capa externa de la membrana se une o incorpora a la matriz de LPS y forma una curvatura que da lugar a la producción de OMV's (Tashiro et. al., 2010; Schertzer & Whiteley, 2012; Wessel et. al., 2013; Florez et. al., 2017).



#### **1.4.2 Funciones de las OMV's**

Las OMV's cumplen diversas funciones importantes, las cuales contribuyen en la integridad bacteriana. El incremento en la producción de OMV's se correlaciona con una mayor supervivencia bacteriana, debido a que el material contenido en su interior puede realizar diversos procesos biológicos como la señalización del quorum sensing, en donde las bacterias producen múltiples moléculas de señalización que son transportadas por OMV's hacia el exterior para que una bacteria se comunique con otras y así puedan controlar su propia densidad bacteriana (Mashburn-Warren et. al., 2008); la adquisición de nutrientes como lo es la captación de hierro, y la adquisición de enzimas de tipo glucosidasas y proteasas (Schwechheimer & Kuehn, 2015); en la patogénesis, las OMV's pueden administrar factores de virulencia y ofrecen protección a las bacterias actuando como señuelos que se unen a antibióticos para absorberlo; eliminación de competidores con la finalidad de adquirir nutrientes y permitir su propagación (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Guerrero-Mandujano et. al., 2017); y la transferencia de genes que le permiten a la bacteria sobrevivir en ambientes hostiles (Santajit & Indrawattana, 2016).

#### **1.4.3 OMV's como factor de virulencia y su papel en la patogenicidad**

Las OMV's pueden aumentar la patogenicidad bacteriana a través de diversos mecanismos con la finalidad de proteger a los efectores de la virulencia, de la respuesta inmunitaria. Se cree que la selección de los factores de virulencia que se transportan dentro de las OMV's ha ido evolucionando para beneficiar a las especies bacterianas patógenas. En el cargo molecular de las OMV's, existe una gran cantidad de biomoléculas relacionadas a la invasión, daño a la célula huésped, virulencia y modulación de la respuesta inmune.

Por ejemplo, en *Helicobacter pylori*, esta bacteria exporta sus OMV's y suministra sus toxinas como la citotoxina vacuolizante (VacA) y el LPS en la unión de OMV's en la captación de vesículas por las células epiteliales gástricas y se lleve a cabo una mejor asociación de OMV's con las células, mejorando la internalización de VacA. Otro papel que llevan a cabo las OMV's en *H. pylori* es promover la proliferación de células

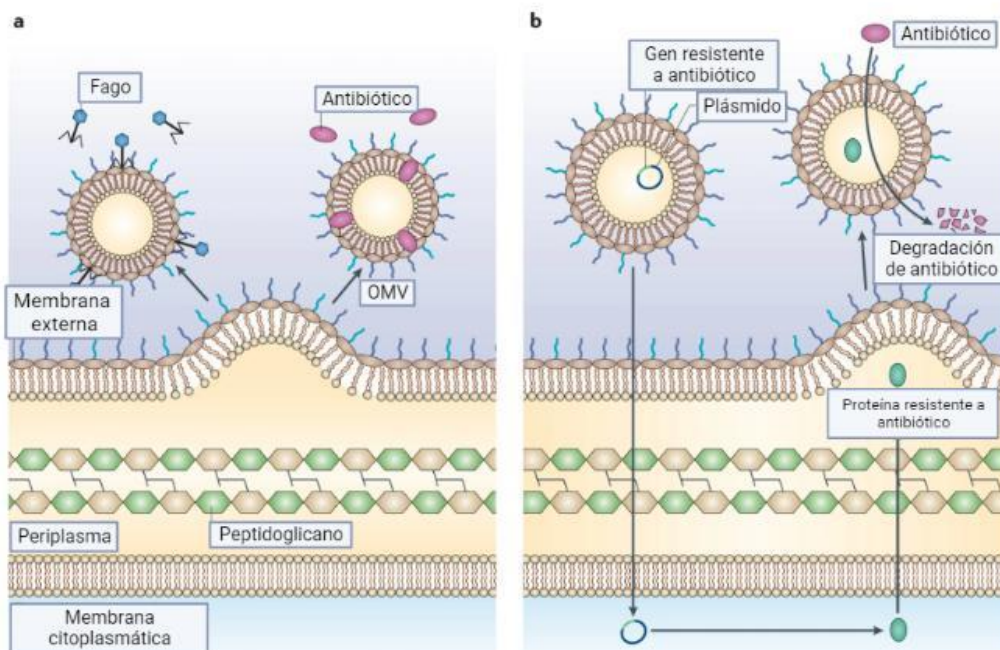
epiteliales gástricas, la apoptosis y la liberación de la cascada de citocinas proinflamatorias (Parker et. al., 2010).

En el caso de *Salmonella spp.*, se pueden producir OMV's con LPS y antígenos de superficie modificados para poder evadir el sistema inmune (Guerrero-Mandujano et. al., 2017). Las OMV's de *Moraxella catarrhalis* contienen en la membrana externa a la proteína de unión a inmunoglobulina D (MID), la cual es administrada a las células B para activarlas y que se lleve a cabo la producción de inmunoglobulina M policlonal (IgM), lo que conduce a un retraso en la producción de anticuerpos específicos, y así, aumentar la supervivencia de *M. catarrhalis* (Schaar et. al., 2011).

Muchas biomoléculas asociadas con las OMV's producidas por las bacterias patógenas, además de estar involucradas en la virulencia, también se encuentran relacionadas con la resistencia a los antibióticos.

#### **1.4.4 Resistencia a los antibióticos mediada por OMV's**

La resistencia a los antibióticos es un punto importante en la patogenicidad, pues actúa de manera inmediata en la protección de las bacterias al tomar el papel de señuelos o permitiendo absorber y degradar antibióticos (Figura 3) (McBroom & Kuehn, 2007; Schaar et. al., 2011; Schwechheimer & Kuehn, 2015; Rueter & Bielaszewska, 2020). Se han realizado varios estudios acerca del empaquetamiento vesicular de la  $\beta$ -lactamasa capaz de aumentar la resistencia a los antibióticos de especies bacterianas sensibles a ellos. Por ejemplo, las OMV's de *M. catarrhalis* resistente al antibiótico amoxicilina transporta una  $\beta$ -lactamasa que protege a la bacteria del antibiótico (Schaar et. al., 2011).



**Figura 3.** Esquema de la producción de OMV's a causa del estrés por antibiótico. **a)** Las OMV's que son liberadas al ambiente externo llevan a cabo el papel de señuelo para antibióticos o fagos, protegiendo la integridad de la bacteria. **b)** Las OMV's contienen ADN en su interior que pueden transferir entre células, principalmente son genes de resistencia a antibióticos, que se integran a la célula receptora y codifican a enzimas capaces de degradar antibióticos. (Imagen modificada obtenida de Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Un potente mecanismo que poseen las bacterias patógenas, es la transferencia de genes de resistencia a antibióticos a la comunidad bacteriana. Un estudio demostró que las OMV's producidas por cepas portadoras de genes de virulencia y resistencia como *Haemophilus influenzae* y *E. coli* O157:H7, son capaces de transformar a otras cepas receptoras (Guerrero-Mandujano et. al., 2017)

## 2. Antecedentes

### 2.1 Antecedentes generales

Los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) son un grupo de bacterias nosocomiales que causan múltiples infecciones a personas

inmunocomprometidas o con un estado de salud grave. Una característica muy importante que posee este grupo de bacterias, es que son multirresistentes a fármacos antimicrobianos, lo cual dificulta el tratamiento para terminar con ellas en pacientes infectados. La presencia de genes de resistencia a antibióticos es un factor clave para que las bacterias puedan contrarrestar los efectos de antibióticos y llevar a cabo diversos mecanismos de resistencia (Santajit & Indrawattana, 2016).

En 1975, se reportaron 24 casos de sepsis con *Citrobacter* en niños menores de 2 años en la Unidad de Lactantes del Servicio de Pediatría del Hospital Sótero del Río, Chile. El 75% de los niños tenía 6 meses o menos de edad. Las principales características clínicas que presentaban estos lactantes fueron: diarrea, vómito, deshidratación, fiebre, ITU y manifestaciones hemorrágicas, además de que también el 75% de los niños presentaban desnutrición moderada o severa. De los 24 casos estudiados, fallecieron 6, lo que representó una letalidad del 25%. Se realizaron análisis *in vivo* e *in vitro* para evaluar la sensibilidad a antibióticos, siendo el Trimetoprima-sulfametoxazol (TM-SMZ) el medicamento más efectivo, aunque también se reportó una alta resistencia a la ampicilina (Puentes et. al. 1975).

En Marsella, Francia, se reportó el caso de una mujer de 75 años con insuficiencia renal, había recibido un trasplante de riñón en el año 2010 en el Hospital de Concepción. Desde que la paciente recibió su trasplante, desarrolló ITU y glomerulonefritis membranoproliferativa. Además, contrajo bacteriuria por lo que se realizó un análisis de muestra de orina, identificando a *C. amalonaticus* como causante de la infección. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana revelaron que el aislado presentaba resistencia a varios antibióticos (García et. al., 2016).

Otro caso clínico fue el de un paciente que presentaba antecedentes patológicos como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) al ingresar a emergencias en el Hospital "Isidro Ayora", en Ecuador. El diagnóstico fue por un episodio de neumonía nosocomial e ITU que se desarrollaron luego de ingresar, diagnosticando el ITU por un urocultivo realizado 48 hrs posteriores a ser internado, en donde los estudios demostraron que la infección intrahospitalaria fue ocasionada por *C. freundii*. Una vez internado, se le dio tratamiento con antibiótico, pero se agudizó la ITU, mostrando multirresistencia a los fármacos; al segundo día de hospitalización, se le dio un

tratamiento farmacológico con meropenem (un antibiótico de amplio espectro) y acetilcisteína. Posteriormente, se le realizó un examen bacteriológico que resultó negativo. Los resultados de laboratorio de este paciente fueron positivos a *C. freundii* en urocultivo y en la identificación, así como en las pruebas de susceptibilidad del microorganismo aislado, determinando que *C. freundii* era resistente a cefalosporinas y carbapenémicos, con bajas concentraciones inhibitorias para imipenem, meropenem, doripenem, ceftriaxona, cefepime y ceftazidima; sensible a amikacina, gentamicina, tigeciclina y colistina. Dos días después de la hospitalización del paciente, se notó una evolución de resistencia a ciprofloxacino, amikacina y gentamicina. Se realizó una prueba fenotípica de búsqueda de carbapenemasas, obteniendo como resultado la inactivación del carbapenémico; también media

nte técnicas moleculares se confirmó la presencia del gen *bla KPC*, llegando a la conclusión de que la cepa produce carbapenemasas KPC (Uilauri-González & Freire-Cuesta, 2019).

## **2.2 Antecedentes particulares**

Además de los reportes clínicos, *C. freundii* y *C. amalonaticus* fueron recientemente encontradas en aguas termales de un balneario y en fuentes de agua para consumo humano en la localidad de Tehuacán, Puebla. Las muestras de esos cuerpos de agua presentaron diversas bacterias que fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, y luego de seleccionar bacterias productoras de ácido sulfhídrico y analizarlas mediante espectroscopía de masas por MALDI TOF MS se identificaron bacterias patógenas, entre ellas las especies de *C. freundii* y *C. amalonaticus* (Leyva, H, Tesis de Licenciatura en Biotecnología, comunicación directa).

## **3. Justificación**

Actualmente, se desconoce información sobre la secreción de OMV's por *C. freundii* y *C. amalonaticus*, por ende, se desconoce la composición molecular del cargo. Estas bacterias que han sido reportadas como nosocomiales oportunistas, podrían presentar mecanismos de multirresistencia a una gran variedad de antibióticos

basados en la presencia de genes de resistencia, los cuales codifican proteínas enzimáticas capaces de degradar o modificar a los antibióticos. En bacterias Gram-negativas, se ha reportado la transferencia horizontal de genes de resistencia hacia bacterias que no son patógenas, provocando un problema grave para la salud pública en todo el mundo.

En el estado de Puebla, los manantiales representan una fuente de agua para consumo humano y en ocasiones se les atribuye un carácter curativo. Sin embargo, en estos cuerpos de agua se encuentran bacterias patógenas oportunistas como *C. freundii* y *C. amalonaticus* que pueden causar infecciones en la población susceptible, además de actuar como posibles agentes de transferencia de genes de resistencia a antibióticos. El presente trabajo pretende conocer más acerca de la secreción de OMV's y de las moléculas que están relacionadas con los mecanismos de patogenicidad mismos que aún no han sido caracterizados.

#### **4. Hipótesis**

*Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* tienen la capacidad de producir OMV's con un cargo molecular que podría estar asociado a mecanismos de resistencia a antibióticos y de patogenicidad.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Purificar OMV's secretadas a partir de aislados de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* y determinar su cargo molecular asociado a la resistencia a antibióticos.

## 5.2 Objetivos específicos

1. Obtener OMV's a partir de aislados de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*.
2. Identificar la morfología de las OMV's de *C. freundii*.
3. Analizar el perfil proteico de las OMV's y los extractos totales de *C. freundii* y *C. amalonaticus*.
4. Realizar un ensayo de protección contra antibiótico en bacterias sin resistencia a antibióticos en presencia de OMV's.
5. Analizar la presencia de proteínas inmunogénicas en OMV's purificadas.
6. Evaluar la transferencia horizontal de genes de resistencia a través de OMV's.

## 6. Esquema general de trabajo

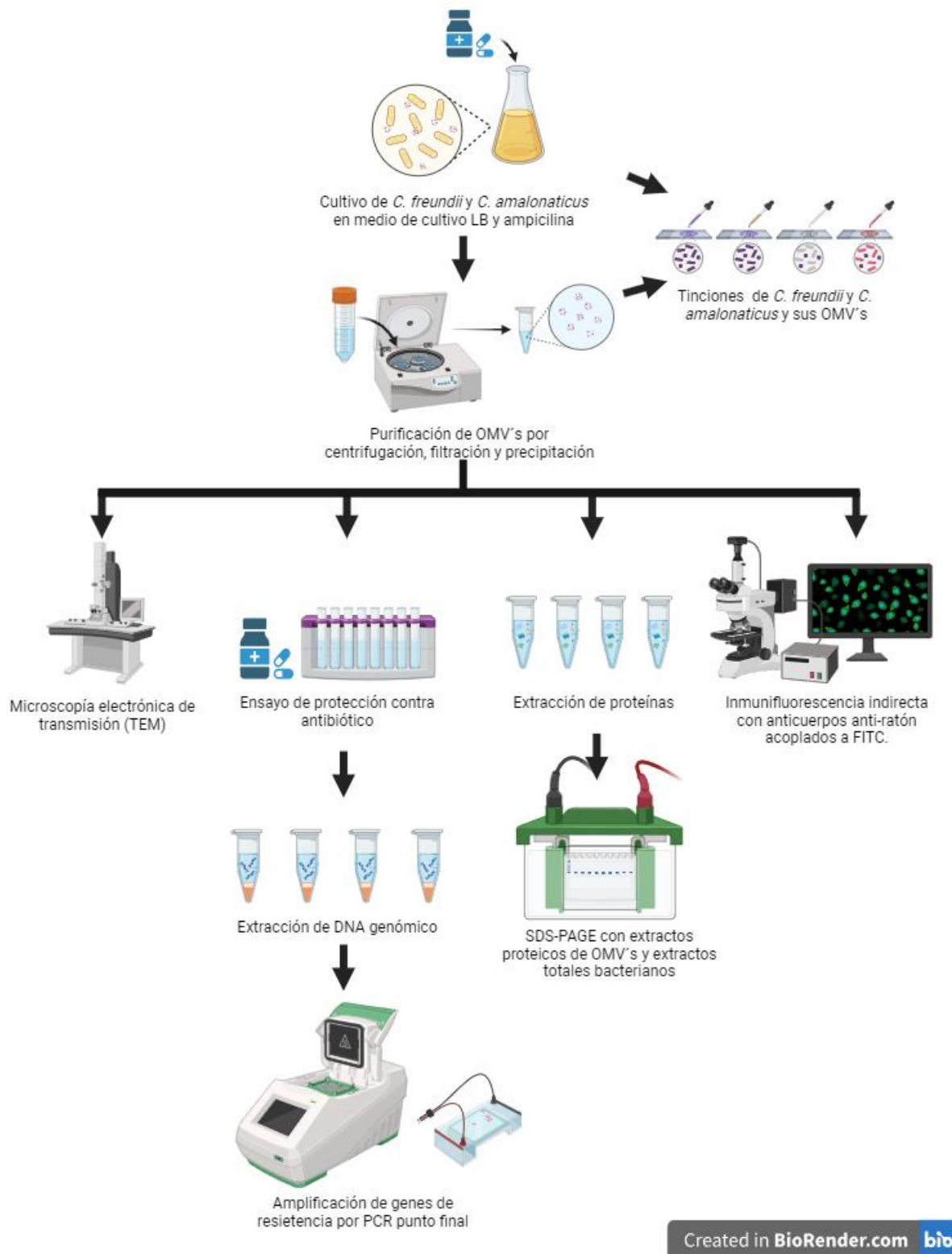


Figura 4. Diseño experimental (Imagen propia).



## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Aislamiento de *C. freundii* y *C. amalonaticus***

En un estudio previo del laboratorio se realizaron muestreos de aguas termales del balneario “San Lorenzo” ubicado en la localidad de Tehuacán, Puebla. Se realizó la identificación de *C. freundii* y *C. amalonaticus* mediante técnicas rutinarias de microbiología y mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF MS) (equipo: Bruker Daltonics, Microflex LT) y usando el software MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Estas bacterias fueron preservadas en crioviales a -80°C. Para el presente trabajo se recuperaron las bacterias a partir de los crioviales, *C. freundii* y *C. amalonaticus* se cultivaron en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB). Se sembraron por estría cruzada, se etiquetaron de manera rutinaria y se incubaron a temperatura ambiente por 24 hrs.

### **7.2 Secreción de OMV´s**

Para la secreción y purificación de OMV´s, se prepararon 2 matraces con 100 ml de medio LB líquido estéril se adicionaron con una dosis sub concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) de ampicilina (40 µg/ml), posteriormente se inocularon con dos asadas de *C. freundii* y *C. amalonaticus* y se mantuvieron durante 5 días en incubación a 37° C en agitación a 120 rpm, esto con la finalidad de obtener una hiper vesiculación de *C. freundii* y *C. amalonaticus* al estar sometidas a estrés por antibiótico. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram para OMV´s (modificada) y bacterias a partir del cultivo en medio LB. Se observaron las muestras en un microscopio óptico (Motic).

### **7.3 Purificación de OMV´s por centrifugación**

Se realizó la extracción de OMV´s por medio de una serie de centrifugaciones (Centrífuga refrigerada Centurion PRO-K1015R), se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a 4°C para precipitar a las células bacterianas por gradiente de densidad y se recuperó el sobrenadante para ser filtrado dos veces a través de membranas de nylon

de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . Después, se adicionó acetona fría en una proporción 1:1 para precipitar las OMV's y se mantuvieron a 4°C por 24 hrs.

Posteriormente, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de buffer PBS estéril. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y finalmente se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de PBS estéril para conservar los extractos de OMV's a 4°C por 24 hrs. A estas OMV's purificadas se les realizó una prueba de esterilidad sembrándolas en cajas Petri con medio LB e incubándolas a 37°C por 42 hrs para corroborar la ausencia de bacterias o contaminación

#### **7.4 Tinciones de OMV's**

Se hizo la tinción de Gram modificando los tiempos para mejorar la tinción, y la visibilidad del color y la forma de las células, así como de las OMV's: se fijó el frotis de una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  de medio LB con bacterias y OMV's con calor y se colocó sobre el puente de coloración, se cubrió el portaobjetos completamente con cristal violeta por 2 minutos y se lavó con agua destilada. Posteriormente, se cubrió la lámina con solución de lugol para dejar actuar durante 2 minutos y se lavó con agua. Por último, se decoloró por 10 segundos con alcohol-acetona y se lavó con agua para finalmente cubrir con safranina por 2 minutos y se lavó con agua. Se dejó secar espontáneamente al aire en posición vertical. Una vez seco, se colocó 1 gota de aceite de inmersión para observar bajo el objetivo de 100X en el microscopio óptico (Motic) la morfología bacteriana y la presencia de OMV's secretadas por cada especie.

Para la tinción de Hiss se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de alícuota de OMV's y se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de suero humano a un portaobjetos, se homogeneizaron con un asa bacteriológica, se dejó secar al aire libre y se fijó con calor. Luego, se cubrió la lámina con cristal violeta al 1% y se fijó al calor por 2 minutos (sin dejar secar el cristal violeta). Se lavó con sulfato de cobre al 20%. Sin dejar secar la muestra, se colocó 1 gota de aceite de inmersión para observar bajo el objetivo de 100X en el microscopio óptico. Esta tinción se realizó solo en OMV's purificadas para observar la abundancia de estas, así como confirmar la ausencia de bacterias o contaminantes.

## **7.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Una vez obtenidas las OMV's de *C. freundii* purificadas y conservadas con PBS estéril, se sometieron a centrifugación a 11000 rpm por 20 min para precipitar y formar la pastilla. Se decantó el PBS y se agregó 200 µl de solución buffer glutaraldehído al 2.5% en cacodilato 0.1 M y CaCl. Las muestras de OMV se incubaron y almacenaron a 4 °C hasta que se enviaron a la unidad de microscopía electrónica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) para ser analizadas.

## **7.6 Obtención del perfil proteico de extractos totales de *C. freundii* y *C. amalonaticus* y de las OMV's secretadas**

La obtención del perfil proteico de los extractos totales de *C. freundii* y *C. amalonaticus* y de sus OMV's, se realizó con el propósito de hacer una comparación en cuanto a presencia y similitud de carga proteica. Se preparó buffer RIPA modificado con NaCl 5 M (J.T.Baker), SDS 10% (Macron Fine Chemicals™), Tris HCl 1M a pH 8.0 (Merck Millipore) Tritón X-100 1% (Sigma-Aldrich), Tween 20 al 20% (Hycel), y EDTA 0.5 M (Macron Fine Chemicals™). Se obtuvieron los extractos proteicos de las OMV's, para ello, se tomaron 100 µl de OMV's purificadas en PBS estéril, después se adicionaron 500 µl de buffer RIPA y 5 µl de inhibidores de proteasas. Se homogeneizó y se dejaron precipitar a 4°C por 24 hrs. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se agregaron 500 µl de acetona fría. Se dejaron a 4°C por 24 hrs. Por último, se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla de proteínas obtenida se resuspendió en 100 µl de PBS estéril.

La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de Bradford acorde a las instrucciones del proveedor y por medio de una curva de calibración construida con albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 0.1 a 1.0 mg/ml. Las mediciones se realizaron en un microlector de placas (Accuris SmartReader™ 96 Microplate Absorbance Reader).

Para obtener los extractos totales bacterianos, se sembró a *C. freundii* y *C. amalonaticus* en placas de agar con medio LB con ampicilina y se dejaron crecer por 48 horas a temperatura ambiente. Se mezclaron dos asadas de cultivo con 500 µl de PBS estéril y se centrifugaron a 1100 rpm por 15 min. Una vez obtenida la pastilla, se eliminó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 200 µl de PBS estéril, se homogeneizó y se llevó a ebullición a 100 °C por 10 min. Luego, se centrifugaron las muestras a 11000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante con los extractos totales bacterianos.

### **7.6.1 Electroforesis SDS-PAGE**

Se tomaron 390 µg de extractos proteicos en una alícuota de 20 µl ó 20 µl de extractos totales bacterianos. Se adicionaron 20 µl de buffer de carga y se llevaron a ebullición las muestras a 100 °C por 10 min.

Posteriormente, se realizó la migración de proteínas en una cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell). Se preparó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, con una fase separadora al 12% a fase concentradora. para cargar las muestras. Se agregaron 20 µL de la muestra preparada, es decir, de los extractos proteicos de OMV's y extractos totales bacterianos, migrando a través del buffer de Tris-glicina. Para la migración en el gel concentrador, se utilizó un voltaje de 70 V y para el gel separador 100 V. Para verificar el tamaño de la banda, se empleó el marcador de peso molecular (MPM) (MaestroGen). Una vez terminado el corrimiento, el gel se tiñó en azul de Coomasie por 24 hrs en agitación. Posteriormente, el gel se destiñó por 24 horas en una solución desteñidora de metanol, ácido acético y agua tridestilada.

### **7.7 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta**

Se tomó una alícuota de 20 µl de OMV's resuspendidas en PBS estéril y se colocaron en un portaobjetos. Se realizaron duplicados de las muestras para someterlas a tratamientos distintos. Estas se fijaron añadiendo 20 µl de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) por 30 min a temperatura ambiente. Luego se retiró el paraformaldehído realizando 3 lavados con PBS estéril. Se añadió a la muestra 1 ml

de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Merck Millipore) a 50 mM por 15 min a temperatura ambiente y se volvieron a hacer 3 lavados con PBS estéril para retirar la solución. Un conjunto de muestras se sometió a un tratamiento de bloqueo con albúmina al 2%, mientras que las muestras del otro conjunto se permeabilizaron con una mezcla de albúmina al 2% y Tritón X-100 al 0.5%, ambos tratamientos por 1 hora a temperatura ambiente y se hicieron lavados con PBS estéril.

Posteriormente, se incubaron con el primer anticuerpo heterólogo anti-OMV's de *Klebsiella pneumoniae* (1:2000) a 4 °C toda la noche y luego se lavaron las muestras con PBS estéril. Se incubaron las muestras con el segundo anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a FITC (1:5000) por 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se realizó el montaje con Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1200-10) Vectro Laboratories y se observaron las muestras en un microscopio de epifluorescencia (Motic). Esta técnica se realizó con la finalidad de observar la unión de anticuerpos específicos a proteínas inmunogénicas presentes en las OMV's. Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN blue edition 3.4 (Carl Zeiss microscopy GmbH).

## **7.8 Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's**

Se prepararon 2 tubos de ensaye (Pyrex) con 5 ml de PBS estéril, en cada tubo se inoculó una asada de una cepa de *Escherichia coli*: en un tubo se inoculó *E.coli* DH5 $\alpha$  (no resistente a ampicilina) y en el otro tubo se inoculó *E. coli* BI21 DE3 pLysS (tiene el plásmido pRSETB con resistencia a ampicilina). Los tubos se igualaron a un tubo estándar de 0.5 en la escala de Mc Farland.

Se prepararon 6 tubos de ensaye con 5 ml de medio LB líquido, se les agregaron 5  $\mu\text{l}$  de antibiótico (ampicilina 100 mg/ml), posteriormente, a 4 tubos se les adicionaron las OMV's en diferentes concentraciones: 2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  y 20  $\mu\text{g}$ , y se homogeneizaron por 2 hrs. Una vez transcurridas las 2 hrs, a los tubos que contenían las OMV's se les adicionaron 100  $\mu\text{l}$  ( $1.5 \times 10^8$  UFC) de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se homogeneizaron. De los tubos sin OMV's, se tomó como control positivo (C+), a un tubo con LB/antibiótico al cual se le agregaron 100  $\mu\text{l}$  de *E. coli* BI21 ( $1.5 \times 10^8$  UFC) resuspendida en PBS; y como negativo (C-) a otro tubo con LB/antibiótico adicionado con 100  $\mu\text{l}$  de *E. coli*

DH5 $\alpha$  resuspendida en PBS (Tabla 1 y 2). Posteriormente, se incubaron a 37°C por 24 hrs, el crecimiento bacteriano se determinó mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific Génesis 10S UV-Vis spectrophotometer) a una longitud de onda de 600 nm.

**Tabla 1.** Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para *C. freundii*.

Tubo	Contenido
Control positivo	LB/Antibiótico/ <i>E. coli</i> BI21
Control negativo	LB/Antibiótico/ <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 1A	LB/Antibiótico/2 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 2A	LB/Antibiótico/4 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 3A	LB/Antibiótico/10 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 4A	LB/Antibiótico/20 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$

**Tabla 2.** Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para *C. amalonaticus*.

Tubo	Contenido
Control positivo	LB/Antibiótico/ <i>E. coli</i> BI21
Control negativo	LB/Antibiótico/ <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 1B	LB/Antibiótico/2 $\mu$ g de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 2B	LB/Antibiótico/4 $\mu$ g de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
Problema 3B	LB/Antibiótico/10 $\mu$ g de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$

### 7.8.1 Análisis estadístico

Para los ensayos de protección contra antibiótico, cada tratamiento se realizó por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (One way ANOVA) y la prueba de Tukey de comparación múltiple. Los análisis estadísticos se realizaron en Minitab®. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

### 7.9 Extracción de DNA genómico de bacterias transformadas por OMV's

Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico de *C. freundii*, *C. amalonaticus* y *E. coli* DH5α con resistencia adquirida por las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*. Se colectó la bacteria del medio LB líquido y se centrifugó a 8000 rpm por 3 min para obtener la pastilla y hacerle un lavado con PBS estéril. Se resuspendió la pastilla en 250 µl de buffer de lisis y 5 µl de lisozima, se dejó incubando a 37 °C por 20 min y se centrifugó a 1100 rpm por 10 min. Se tomaron 250 µl del sobrenadante, se agregaron 250 µL de fenol cloroformo-alcohol isoamílico (12.5:12:12.5) (Golden Bell), se agitó y se centrifugó a 8000 rpm por 3 min para lograr separar la fase acuosa. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadieron 200 µl de cloroformo (Meyer), se agitó para después centrifugar a 11000 rpm por 10 min. Nuevamente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron 200 µl de isopropanol (J.T.Baker) frío, se homogeneizó por 10 min y se guardó a -20 °C por 30 min, posterior a ello, se centrifugó a 11000 rpm por 20 min. El sobrenadante se decantó, y la pastilla se lavó con 500 µl etanol (J.T.Baker) frío al 70% para después centrifugar a 11000 rpm por 15 min. Se decantó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar totalmente residuos de etanol. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril y se guardó hasta su uso a 4°C.

La adecuada extracción de ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (1x), utilizando un voltaje de 100 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad).

### 7.9.1 Amplificación de genes de resistencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La extracción de ADN se realizó para examinar la presencia de genes codificantes para beta-lactamasas y carbapenemasas. Se llevó a cabo la amplificación de distintos genes mediante PCR en un termociclador (Bio-Rad T100 Thermal-cycler) con un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l y cuyos componentes se muestran en la Tabla 3. Los genes de resistencia que se amplificaron fueron: *bla*<sub>TEM</sub> en *C. freundii*, *C. amalonaticus* y *E. coli* DH5 $\alpha$ ; *bla*<sub>CTX-M UNIVERSAL</sub> en *C. freundii* y *C. amalonaticus*; *bla*<sub>CTX</sub> en *E. coli* DH5 $\alpha$ ; *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-58</sub> en *C. freundii*, *C. amalonaticus*. Estos genes han sido previamente reportados en *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *E. coli* (Bertini et. al., 2006; Wu et. al., 2015; León et. al., 2021).

Se utilizaron los pares de oligonucleótidos para cada gen en reacciones individuales y en diferentes condiciones de reacción (Tabla 4).

**Tabla 3.** Componentes para la PCR.

Componentes	Condiciones para PCR (Volumen por tubo)
Green Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	12 $\mu$ l
Oligonucleótido Forward	0.3 $\mu$ l
Oligonucleótido Reverse	0.3 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	11.4 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	25 $\mu$ l



**Tabla 4.** Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR empleados para amplificar los diferentes genes de resistencia.

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Condiciones de reacción	Referencia
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	526	TEM-F	TTATCCGCCTCCATCCAGTC	94 °C x 5 min 94 °C x 1 min 67 °C x 1min 30 ciclos 72°C x 1 min 72°C x 10 min	
		TEM-R	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC		
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	909	CTX-M-F	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	94 °C x 5min 94 °C x 50 s 55 °C x 1min 30 ciclos 72°C x 1 min 72°C x 10 min	Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:509–13
		CTX-M-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
<i>bla<sub>CTX-M UNIVERSAL</sub></i>	566	CTX-M-F	CGATGTGCAGTACCAGTAA	94 °C x 5min 94 °C x 30 s 52 °C x 30 s 30 ciclos 72°C x 1 min 72°C x 10 min	
		CTX-M-R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG		
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	882	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	94 °C x 5min 94 °C x 50 s 58 °C x 1min 30 ciclos 72°C x 1 min 72°C x 10 min	Akpaka PE, Swanston WH, Ithemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, et al. Emergence of KPC-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Trinidad and Tobago. J Clin Microbiol 2009;47:2670–1. doi:10.1128/JCM.00362-09
		KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCA		
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	599	OXA-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	94 °C x 5min 94 °C x 50 s 56 °C x 1min 30 ciclos 72°C x 1 min 72°C x 10 min	Salehi, B., Ghalavand, Z., Mohammadzadeh, M., Taghizadeh Maleki, D., Kodori, M., & Kadkhoda, H. (2019). Clonal relatedness and resistance characteristics of OXA -24 and -58 producing carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates in Tehran, Iran. Journal of Applied Microbiology. doi:10.1111/jam.14409
		OXA-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		

\* F: Forward; R: Reverse; TEM: temoniera; CTX-M: cefotaximasas; CTX-M-UNIVERSAL: cefotaximasas universal; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; OXA-58: oxacilinasas; pb: pares de bases; bla: genes de resistencia a betalactamasas.

El producto de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (1X) teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad). Para verificar el tamaño del ADN amplificado, se empleó el marcador de peso molecular (MPM) (MaestroGen) para ADN. La migración electroforética se realizó a 100 V por 30 min.

## 8. Resultados

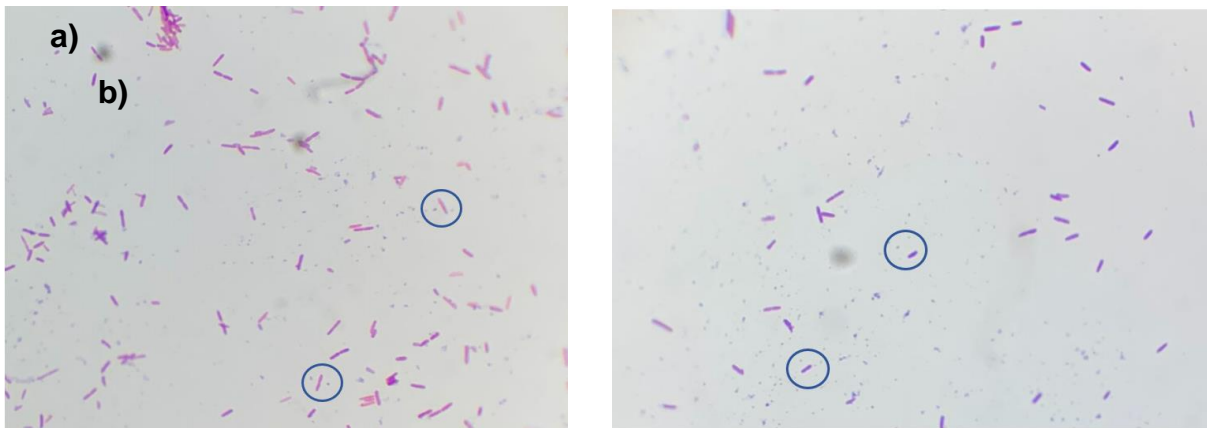
Las OMV's de membrana externa secretadas por bacterias Gram-negativas, presentan una variedad de funciones como la comunicación, la liberación de toxinas, la eliminación de desechos, la transferencia de genes, entre otras. Su producción se puede inducir por algún método para aumentar la vesiculación y así llevar a cabo la purificación de éstas.

*C. freundii* y *C. amalonaticus* secretan OMV's cuando se encuentran en un ambiente hostil, en este trabajo, se adicionó ampicilina al cultivo bacteriano para inducir la secreción de OMV's. Una vez transcurrido el tiempo, la obtención de OMV's se llevó a cabo mediante la centrifugación del cultivo, en el cual las bacterias se precipitaron y se obtuvo un gradiente de densidad que permitió la separación del sobrenadante en donde se encontraban las OMV's. El sobrenadante se filtró por membranas de nylon para eliminar restos de bacterias o algún contaminante, posteriormente, las OMV's fueron precipitadas y conservadas en PBS estéril. Se verificó que en las muestras con OMV's ya filtradas no hubiera presencia de alguna bacteria o contaminante.

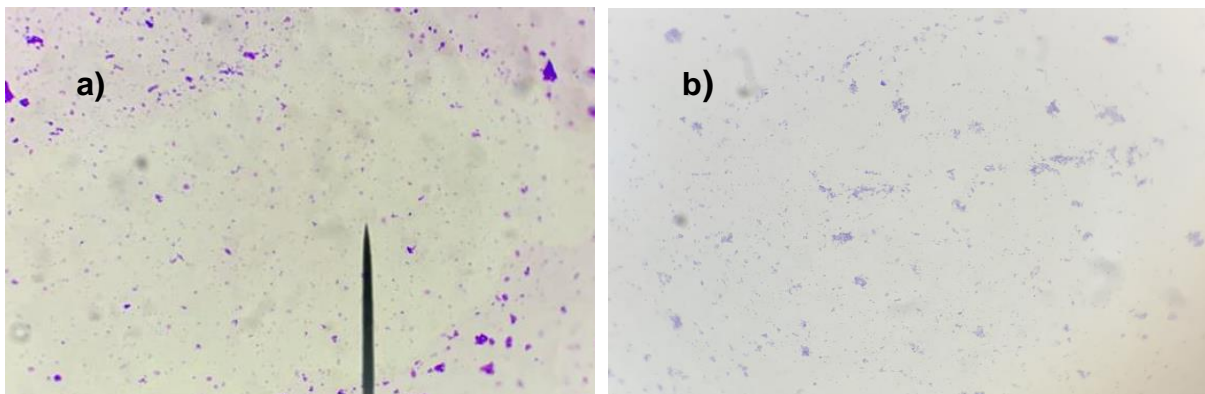
### 8.1 Purificación de OMV's

*C. freundii* y *C. amalonaticus* fueron inoculadas en medio LB líquido en donde fueron sometidas a estrés por la presencia de antibiótico durante 5 días obteniendo así una hiper vesiculación. Para corroborar la producción de OMV's, se realizó la tinción de Gram de la especie y sus OMV's así como la tinción de Hiss únicamente de las OMV's una vez purificadas, las cuales fueron observadas en un microscopio óptico a 100x. Las OMV's presentaron una morfología esférica de tamaño homogéneo. Mediante la tinción de Gram, se observó una tinción negativa en las células bacterianas que debido a las propiedades de la membrana presentaron una coloración rosada-rojiza, mientras que las OMV's se tiñeron de color azul-violeta. Los círculos azules muestran bacterias con OMV's a su alrededor (Figura 5).

Mediante la tinción de Hiss, se pudo observar la presencia de OMV's teñidas de color violeta y la ausencia de bacterias (Figura 6).



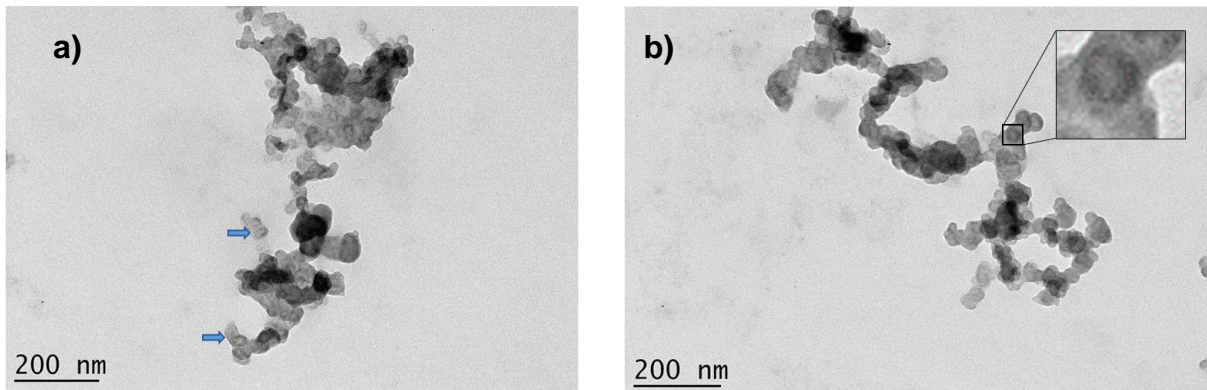
**Figura 5.** Tinción de Gram en bacterias y OMV's. **a)** Microfotografía tomada en microscopio óptico a 100X de *C. freundii* y su las OMV's. **b)** Microfotografía tomada en microscopio óptico a 100X de *C. amalonaticus* y su las OMV's.



**Figura 6.** Tinción de Hiss de OMV's. Purificación de OMV's en ausencia de bacterias y otros contaminantes. **a)** Microfotografía tomada en microscopio óptico a 100X de las OMV's de *C. freundii*. **b)** Microfotografía tomada en microscopio óptico a 100X de las OMV's de *C. amalonaticus*.

## 8.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

Para confirmar la purificación de las OMV's, se realizó la microscopía electrónica de transmisión con las OMV's de *C. freundii*. En la Figura 7a, las flechas indican OMV's pequeñas con un tamaño aproximadamente de 20 a 50 nm y la Figura 7b muestra un recuadro con aumento de una de las OMV's. Además, es posible observar la aglomeración de estas.

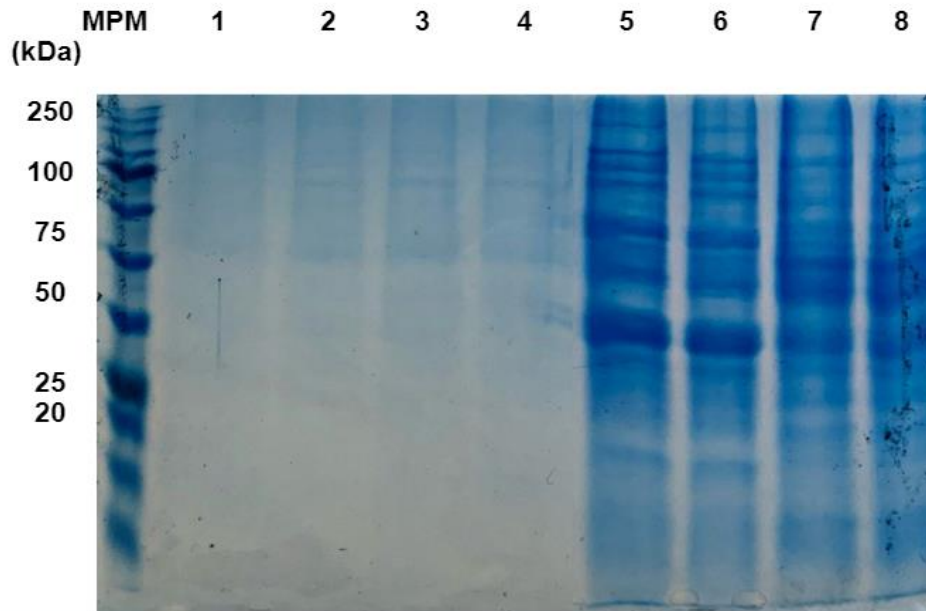


**Figura 7.** Microscopía electrónica de transmisión en microvesículas purificadas de *C. freundii* cultivada en medio LB con ampicilina. **a)** OMV's de *C. freundii* visualizadas por TEM a 20 000X. **b)** OMV's de *C. freundii* visualizadas por TEM a 25 000X. El tamaño de la barra es de 200 nm.

### 8.3 Perfil proteico de OMV's en gel SDS-PAGE

Estudios anteriores han reportado la presencia de proteínas asociadas a OMV's que cumplen diversas funciones. Por tal motivo se obtuvieron proteínas totales de las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* con el fin de determinar la presencia de un cargo proteico, por lo que se realizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, esto permitió la separación de proteínas en función de su tamaño gracias al campo eléctrico al que fueron sometidas.

En la Figura 8 se muestra el perfil proteico de las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*, asimismo, el perfil proteico total de cada especie de bacteria. Se hizo la comparación de ambos perfiles, en donde se observaron bandas enriquecidas de alto peso molecular tanto en los extractos proteicos de OMV's como en los extractos totales bacterianos. Cabe mencionar que con esta técnica se comprueba la presencia de un cargo proteico enriquecido en las OMV's secretadas por *C. freundii* y *C. amalonaticus*.



**Figura 8.** Migración electroforética de las proteínas de OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*: carril MPM: Marcador de Peso Molecular; carriles 1 y 2, OMV's de *C. freundii*; carriles 3 y 4, OMV's de *C. amalonaticus*; carriles 5 y 6, extractos totales de *C. freundii*; carril 7 y 8, extractos totales de *C. amalonaticus*.

Se sugiere tentativamente la presencia de algunas proteínas en las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*, esto de acuerdo con el peso molecular de algunas bandas reveladas en la electroforesis (Figura 8) que se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Proteínas presuntamente presentes en el cargo de OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*

Nombre de la proteína	Masa (kDa)	Función	Referencia
Outer membrane proteins (OmpA, Omp4)	~42	Actúa como una porina de baja permeabilidad que permite la penetración lenta de solutos pequeños	(Lee, Kim & Gho, 2016)
Protein TolB	~43	Forma un complejo con las porinas y lipoproteínas en la membrana externa	(Lee, Kim & Gho, 2016; Clavel et. al., 1998)
		Promueve la unión dependiente de GTP de	<a href="https://www.uniprot.o">https://www.uniprot.o</a>

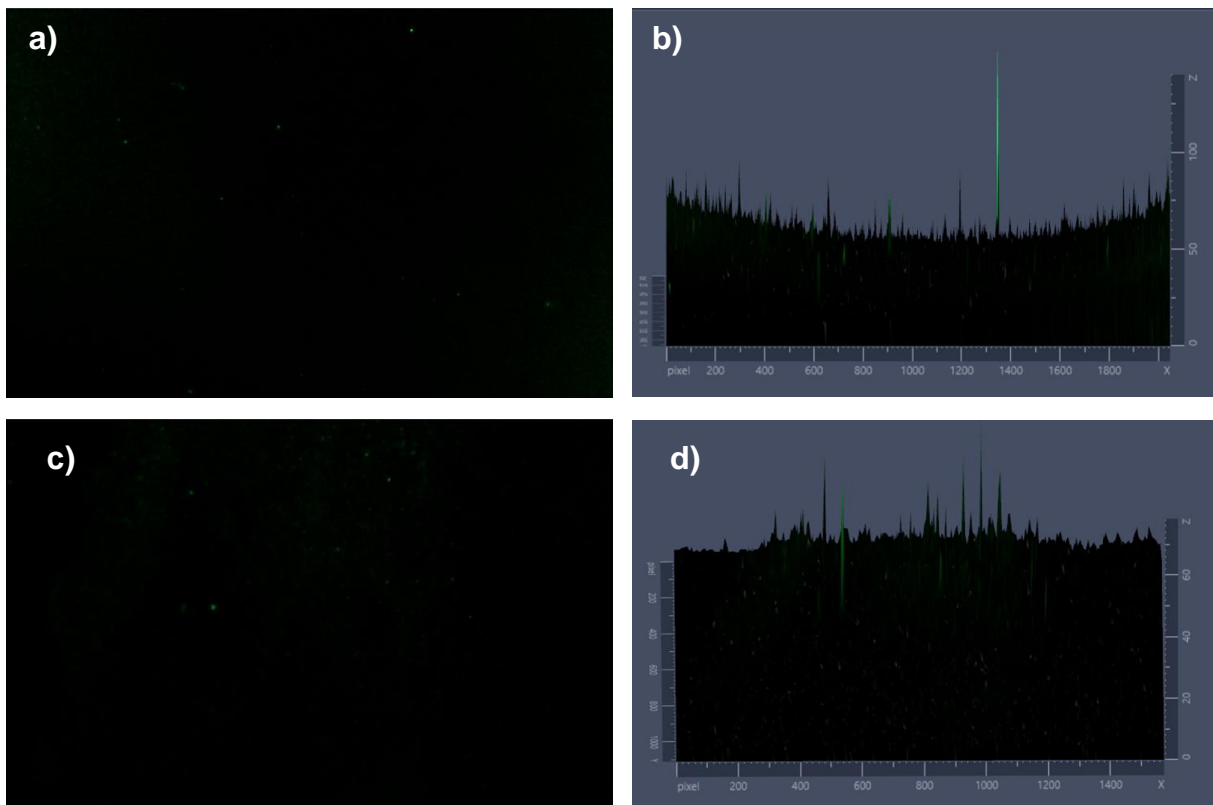
Elongation factor Tu (EF-Tu)	43.2	aminoacil-tRNA al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0CE47">rg/uniprotkb/P0CE47</a> (Lee, Kim & Gho, 2016)
Chaperonin (GroEL, GroL, GroL 1, GroL2)	~57	Proteína chaperona que actúa postraduccionalmente para el plegamiento de proteínas	(Campos Ortíz, 2021)
Penicillin-binding protein activator (LpoA)	72	Regulador de la síntesis de peptidoglicanos que es esencial para la función de la proteína de unión a penicilina 1A	(Lee, Kim & Gho, 2016; Campos Ortíz, 2021)
Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport	82.1	Participa en la captación de hierro en complejo con ferricromo. Se une y transporta ferricromo-hierro a través de la membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06971">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06971</a> (Lee, Kim & Gho, 2016)
Ferrioxamine receptor (FhuA)	77.4	Homeostasis del ión de hierro	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A486D354">https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A486D354</a>
Outer membrane protein assembly factor (BamA)	90	Proteína que participa en el ensamblaje y la inserción de proteínas de barril beta en la membrana externa	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A940">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A940</a> (Campos Ortíz, 2021)
Aconitate hidratasa B (acnB)	93	Proteína involucrada en el ciclo del ácido tricarbóxico	(Campos Ortíz, 2021)
DNA-directed RNA polymerase, beta subunit (RpoA)	140	La ARN polimerasa dependiente de ADN (RNAP) cataliza la transcripción de ADN en ARN	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A8V2">https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A8V2</a> (Campos Ortíz, 2021)

#### 8.4 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica ya estandarizada que permite la visualización de antígenos o proteínas en las células. Por lo anterior, se realizó una inmunofluorescencia indirecta con las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*

utilizando un anticuerpo policlonal anti-OMV's de *K. pneumoniae*, previamente fue obtenido en el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Carabarán Lima. El resultado fue positivo en la unión del anticuerpo heterólogo anti-OMV's de *K. pneumoniae* en las OMV's no permeabilizadas de ambas especies logrando una emisión de fluorescencia intensa por la excitación del FITC.

Gracias a la observación en el microscopio de epifluorescencia, fue posible determinar la presencia de moléculas inmunogénicas. En la Figura 9a se muestran las OMV's no permeabilizadas de *C. freundii*, en donde se observó la fluorescencia emitida por las proteínas externas, además, se observó la aglomeración de estas OMV's formando anillos de mayor tamaño. En la Figura 9b, se muestra la recreación en 3D de las OMV's de *C. freundii*. En la Figura 9c se visualizan las OMV's permeabilizadas de *C. amalonaticus* y se observa la fluorescencia de las proteínas contenidas en el interior mientras que en la Figura 9d se observa la recreación 3D de las OMV's.



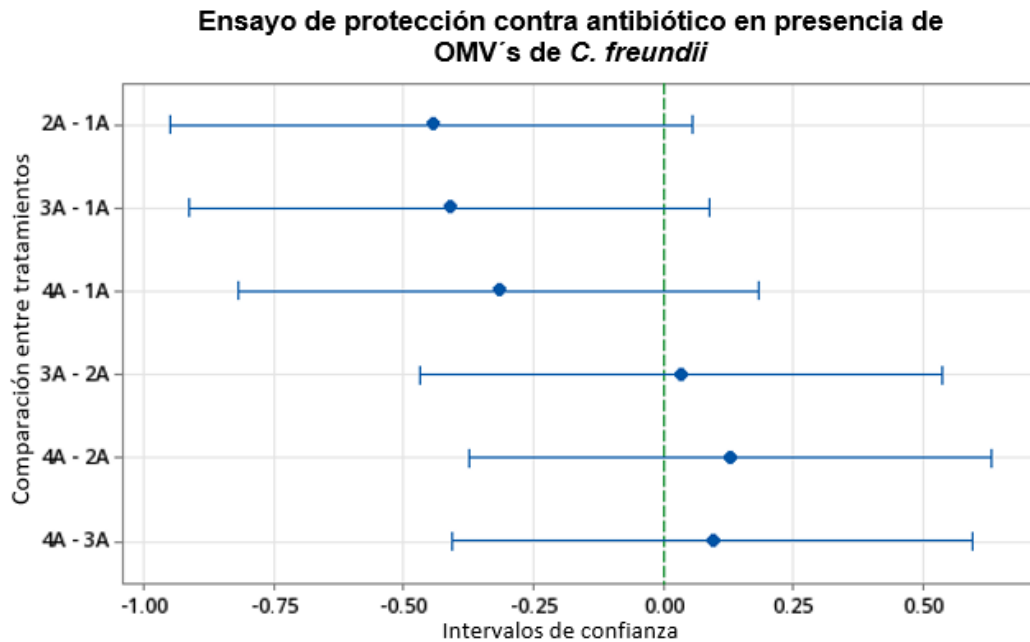
**Figura 9.** Microscopía de epifluorescencia de OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* marcadas con FITC. **a)** OMV's de *C. freundii* no permeabilizadas. **b)** Recreación 3D de las OMV's de *C. freundii*, se observa una

alta emisión de fluorescencia debido a la agrupación de OMV's. **c)** OMV's de *C. amalonaticus* permeabilizadas. **d)** Recreación 3D de las OMV's de *C. amalonaticus* permeabilizadas.

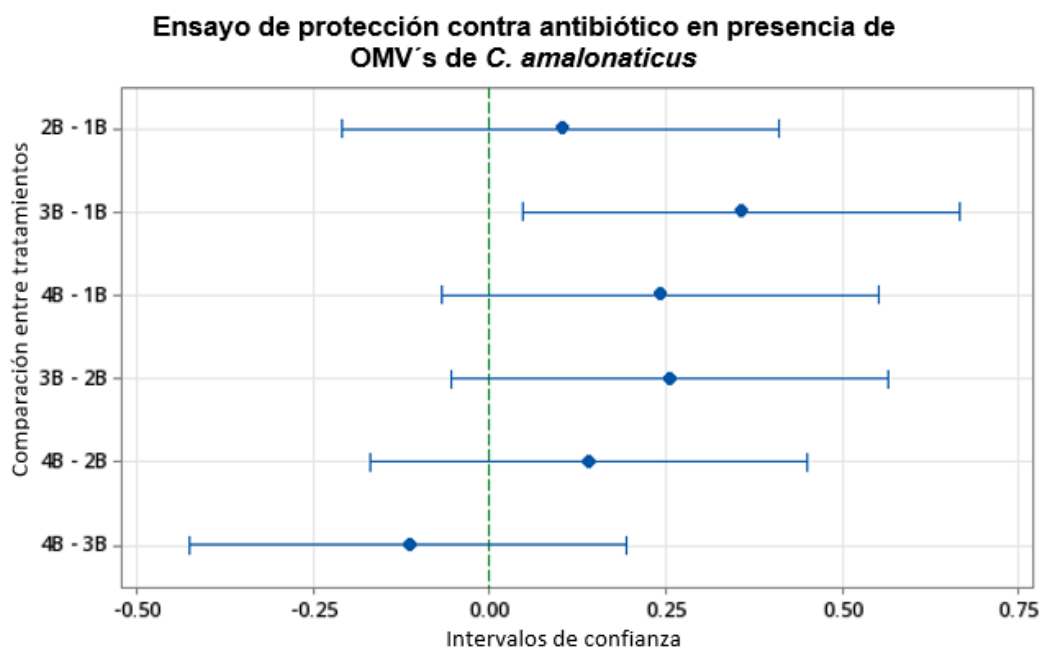
## 8.5 Ensayo de protección contra antibiótico

Recientemente, las OMV's han sido descritas como un nuevo mecanismo de resistencia antimicrobiana, ya que porta enzimas degradadoras de antibiótico. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el crecimiento bacteriano depende de la concentración de OMV's. Se realizó el ensayo de protección contra antibiótico una vez transcurrido el tiempo de incubación de *E. coli* DH5 $\alpha$  en medio LB con antibiótico y la adición de OMV's. Para probar esta hipótesis, se comparó el crecimiento bacteriano entre tratamientos. La Figura 10 muestra que no hubo diferencias significativas en el crecimiento promedio de *E. coli* DH5 $\alpha$  sometidas a los tratamientos de concentración de OMV's de *C. freundii*. Sin embargo, sí se mostraron diferencias significativas en el ensayo con OMV's de *C. amalonaticus*, entre los tratamientos 3B y 1B (Figura 11). Con respecto a los controles, no hubo crecimiento en el control negativo, pues la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  es una bacteria no resistente al antibiótico; mientras que en el control positivo de la cepa *E. coli* BI21 resistente a ampicilina sí hubo crecimiento de la bacteria. Cabe mencionar que estos resultados obtenidos, prevén la presencia de una enzima capaz de degradar el antibiótico presente en la membrana de las OMV's, principalmente una  $\beta$ -lactamasa, permitiendo así la supervivencia de la bacteria susceptible al antibiótico.





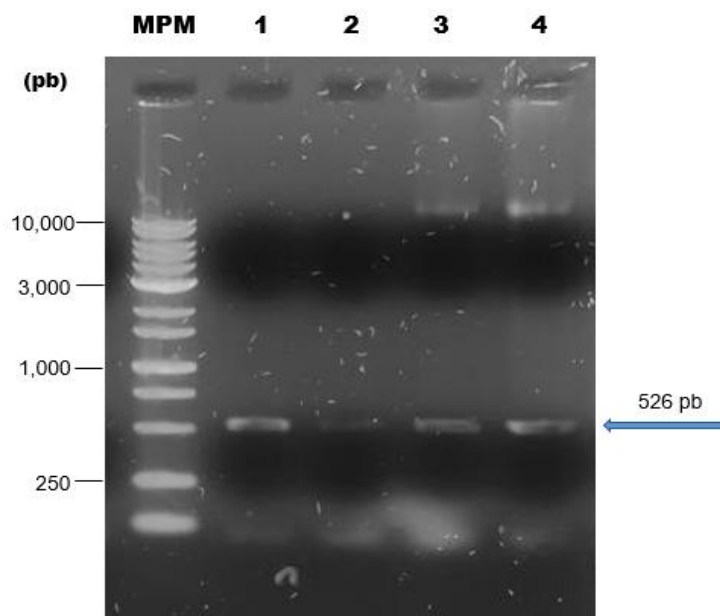
**Figura 10.** Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's de *C. freundii*. 1A: 2 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 2A: 4 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 3A: 10 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 4A: 20 µg de OMV's y *E. coli* DH5α. Para los análisis estadísticos se utilizaron ANOVA de una vía y la prueba de Tukey, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .



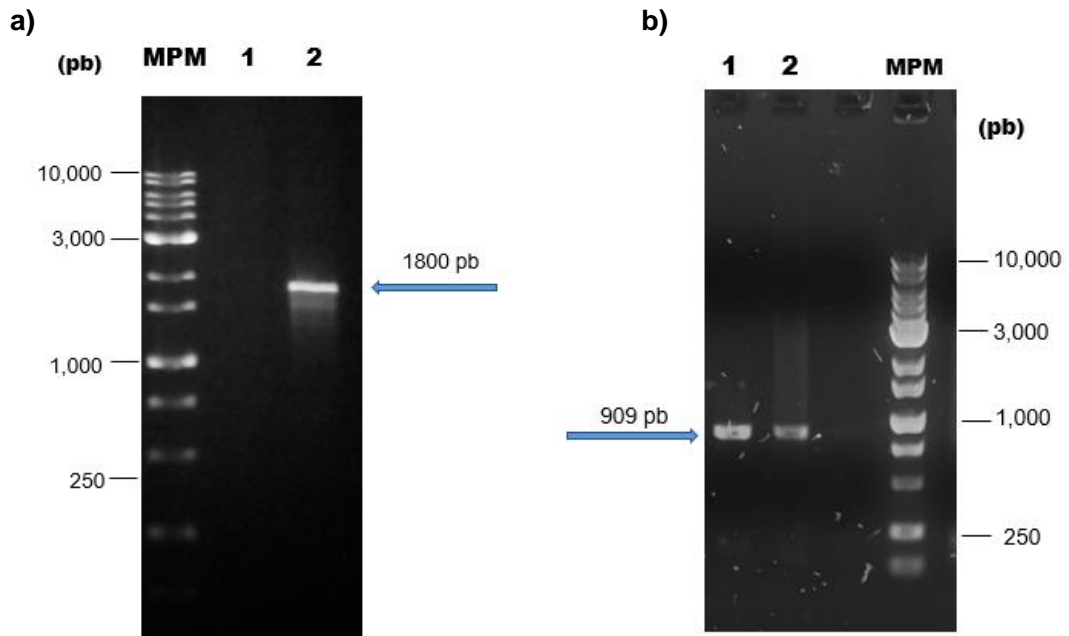
**Figura 11.** Ensayo de protección contra antibiótico en presencia de OMV's de *C. amalonaticus*. 1B: 2 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 2B: 4 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 3B: 10 µg de OMV's y *E. coli* DH5α; 4B: 20 µg de OMV's y *E. coli* DH5α. Para los análisis estadísticos se utilizaron ANOVA de una vía y la prueba de Tukey, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

## 8.6 Amplificación de diferentes genes de resistencia a antibióticos

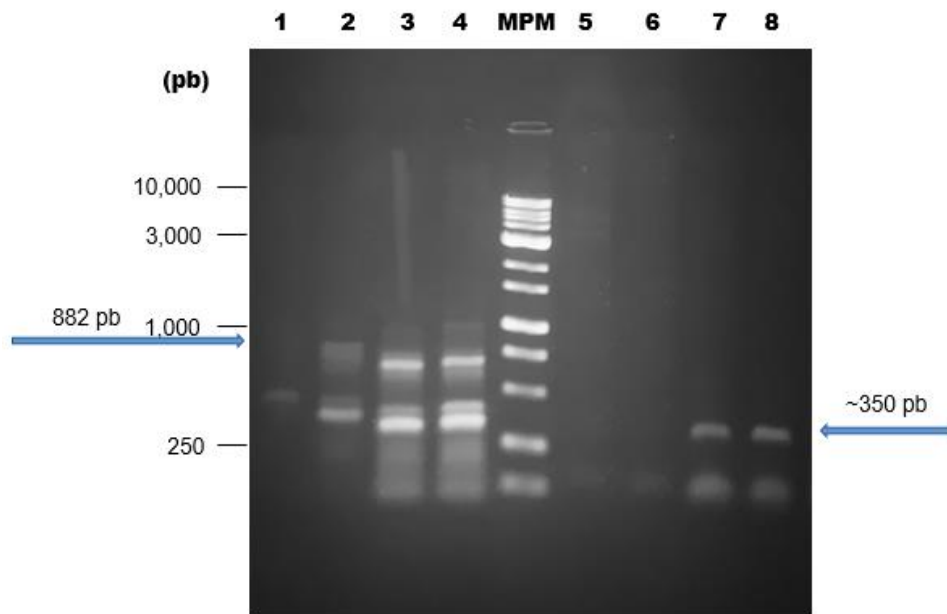
Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  adquirieron resistencia a algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos después de la incubación con OMV's de las células de *C. freundii* y *C. amalonaticus*. Se realizaron reacciones de PCR para detectar genes BLEE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>) en *C. freundii* y *C. amalonaticus*, así como la transferencia de estos genes en *E. coli* DH5 $\alpha$ . La flecha azul en la Figura 12 muestra el amplificado de 526 pb para el gen *bla*<sub>TEM</sub>. La Figura 13a muestra el amplificado para el gen *bla*<sub>CTX-M-Universal</sub> en *C. amalonaticus*, la flecha azul indica el tamaño del amplificado de 1800 pb, y ausente en *C. freundii*. Mientras que en la Figura 13b, se observa la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> en *E. coli* DH5 $\alpha$  con un tamaño de amplificado de 909 pb. La Figura 14 muestra la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub> en *C. amalonaticus* con un amplificado de 882 pb, pero en *C. freundii* este gen se encuentra ausente. Sin embargo, se obtuvieron bandas inespecíficas. De igual manera, el gen *bla*<sub>OXA-58</sub> se detectó en *C. amalonaticus* con un amplificado de aproximadamente 350 pb, y ausente en *C. freundii*.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado del gen *bla*<sub>TEM</sub>. Carril MPM: Marcador de Peso Molecular; carril 1: *C. freundii*; carril 2: *C. amalonaticus*; carril 3: *E. coli* DH5 $\alpha$  con resistencia adquirida por OMV's de *C. freundii*; carril 4: *E. coli* DH5 $\alpha$  con resistencia adquirida por OMV's de *C. amalonaticus*.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado del gen *bla<sub>CTX-M</sub> Universal* en *C. freundii* y *C. amalonaticus*; el gen *CTX-M* utilizado en *E. coli* DH5 $\alpha$ . **a)** Carril MPM: Marcador de Peso Molecular; carril 1: *C. freundii*; carril 2: *C. amalonaticus*. **b)** carril 1: *E. coli* DH5- $\alpha$  con resistencia adquirida por OMV's de *C. freundii*; carril 2: *E. coli* DH5 $\alpha$  con resistencia adquirida por OMV's de *C. amalonaticus*; MPM: Marcador de Peso Molecular.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del amplificado de los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>OXA-58</sub>*. Carril 1: *C. freundii*; carril 2, 3 y 4: *C. amalonaticus*; carril MPM: Marcador de Peso Molecular; carril 5: *C. freundii*; carril 6, 7 y 8: *C. amalonaticus*.

## 9. Discusión

Las OMV's son nanopartículas derivadas de la membrana externa de las bacterias, las cuales desempeñan un papel muy importante en la transferencia de la resistencia antimicrobiana, mecanismo que se ha convertido en una preocupación cada vez más seria como resultado del abuso de antibióticos.

*Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* son especies de bacterias Gram-negativas que mostraron la capacidad de producir OMV's en un ambiente con antibiótico, estas mostraron una morfología esférica de tamaño uniforme (Figura 6). Gracias a la tinción de Gram, fue posible observar la morfología de las células bacterianas teñidas de un color rosado-rojizo, así como sus OMV's secretadas (Figura 5) que adquirieron una coloración violeta.

Sin embargo, la coloración de las OMV's no corresponde a una tinción negativa estándar, por lo que se sugiere que podría deberse a que las OMV's tengan un alto contenido en LPS y/o Lpp ácidas aumentando la carga negativa, haciendo que el colorante de cristal-violeta tenga una mayor afinidad a estas moléculas y no permita la decoloración por el alcohol-acetona. Varios estudios han informado que alterar el contenido de LPS afecta la producción de OMV's. En *Pseudomonas aeruginosa* se han detectado LPS de banda B (carga aniónica) de manera abundante, provocando que la membrana externa sea doble para aliviar la repulsión de carga y liberando las OMV's con los LPS (Sartorio et. al., 2021). También, las OMV's de otras especies como *Bacteroides fragilis* y *B. thetaiotamicron* están enriquecidas con subconjuntos de proteínas exclusivas de OMV's, como lipoproteínas ácidas (cargadas negativamente), mientras que la mayoría de las proteínas de la ME, son proteínas de barril  $\beta$ , cargadas positivamente (Valguarnera et. al., 2018; Sartorio et al.,2021).

En la Figura 6, se observa a las OMV's ya purificadas y concentradas sin ningún tipo de contaminante. El aislamiento de OMV's, excluye contaminantes como flagelos, pili, fimbrias y agregados de proteínas. Además, diversos análisis de proteómica en OMV's han indicado que el gradiente de densidad por ultracentrifugación es actualmente una de las mejores técnicas para el aislamiento de OMV's de bacterias Gram-negativas (Lee, Kim & Gho, 2016). Sin embargo, la filtración asegura la eliminación de residuos que no se hayan precipitado durante la centrifugación, pues

en combinación de estas dos técnicas, se obtiene una mejor purificación. Además, se ha demostrado que el uso de acetona en frío como agente precipitante de proteínas (García-San Miguel, 2016) es una técnica eficiente para la concentración de OMV's, seguida de centrifugación diferencial.

Las microfotografías con TEM mostraron que las OMV's de *C. freundii* (Figura 7) tienen un fenotipo similar a las OMV's aisladas de otras especies como por ejemplo las OMV's de *Francisella novicida* (Pierson et. al., 2011). En cuanto al tamaño, las OMV's de *C. freundii* presentan un tamaño de 50 nm en promedio, las cuales, en comparación con otras especies, son pequeñas, puesto que se han reportado OMV's de *Salmonella typhimurium* con un tamaño de 100 nm (Liu et. al., 2016) y en OMV's de 3 cepas de *E. coli* patógena extraintestinal encontraron diferentes tamaños que van de 20 a 500 nm. En la Figura 7, también se muestra el agrupamiento de OMV's, fenómeno ya reportado en *E. coli* patógena extraintestinal (Jiang et. al., 2022).

En los primeros estudios, las proteínas asociadas a OMV's han sido identificadas por métodos bioquímicos incluyendo la electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de la tinción de proteínas y la inmunotransferencia. (Pierson et. al., 2011; Lee, Kim & Gho, 2016; Kohl et. al., 2018). La electroforesis en gel de proteínas de OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*. muestra un cargo proteico variado (Figura 8), a grandes rasgos, se muestran bandas proteicas similares entre proteínas asociadas a OMV's y las proteínas celulares, lo que demuestra que las OMV's son un importante contribuyente al proteoma extracelular, las cuales pueden estar inmersas en diversas funciones como componentes estructurales de la membrana, mediadores de transporte de moléculas, eliminación de competidores por medio de enzimas, captación de nutrientes, promover la patogenicidad al transportar factores de virulencia, entre otras funciones biológicas (Lee, Kim & Gho, 2016).

Un estudio de proteómica de la ME y de OMV's de *B. fragilis* identificó 40 proteínas únicas en OMV's, principalmente glucosidasas y proteasas, demostrando que las OMV's tienen una carga selectiva y no sólo es un acarreamiento inespecífico de proteínas (van der Pol, Stork & van der Ley, 2015). Sin embargo, aún no se ha descrito el mecanismo exacto de selección del cargo.

Análisis anteriores de proteómica, identificaron proteínas de vesículas de membrana externa que fueron catalogadas en grupos ortólogos como proteínas de ME, proteínas de carga y proteínas citoplasmáticas (van der Pol, Stork & van der Ley, 2015; Campos Ortiz, 2021). Se ha demostrado la presencia de 50 proteínas más frecuentes en OMV's de bacterias Gram-negativas que cumplen diversas funciones, además, comparado con proteínas celulares, las proteínas de las OMV's son ricas en proteínas asociadas con regiones extracelulares, en membrana externa, periplasma, y poco enriquecidas con proteínas de membrana interna (Lee, Kim & Gho, 2016). La Tabla 5, muestra proteínas posiblemente presentes en OMV's, asociadas a la membrana externa como porinas (OmpA, Omp4), proteínas TolB, proteínas activadoras de unión a la penicilina (LpoA), proteínas receptoras de la membrana externa para el transporte de hierro, receptores de ferrioxamina (FhuA) y factores de ensamblaje de proteínas de la membrana externa (BamA). Por otro lado, los factores de elongación (EF-Tu), chaperoninas (GroEL, GroL, GroL 1, GroL2), aconitáto hidratasa B (acnB) y polimerasa dirigida por ADN (RpoA) son proteínas que se encuentra en el interior de las OMV's.

Cabe destacar que entre las proteínas que presuntivamente se encuentran en las OMV's (Tabla 5), las porinas (OmpA, Omp4) están directamente relacionadas con la resistencia a los antibióticos, ya que permiten una difusión más lenta de antibióticos betalactámicos con carga negativa (Santajit & Indrawattana, 2016).

En el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (Figura 9), se observó la presencia de proteínas inmunogénicas asociadas a OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* y más aún, el hecho de reaccionar con un anticuerpo heterólogo sugiere que estas proteínas asociadas podrían estar conservadas entre las bacterias Gram-negativas. Además, cuando se detectaron las OMV's con microscopía de epifluorescencia, en las Figura 9a y 9c se observaron partículas aparentemente grandes, pero se debió a que las OMV's parecían agregarse para formar partículas de mayor tamaño, lo que se corrobora con TEM (Figura 7). Este fenómeno de agrupación de OMV's fue reportado por Jiang y colaboradores en 2022, mediante el análisis de microscopía fluorescente detectaron partículas grandes y determinaron que las OMV's pueden agruparse (Jiang et. al., 2022).

Un estudio realizado en 2022, se llevaron a cabo inmunofluorescencias en MV de cepas de *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC), para ello, generaron sueros anti-MV policlonal de ratón previamente inmunizados con las MV. Una vez obtenidos los anticuerpos primarios anti-MV de ratón, se marcaron directamente con el colorante TRITC (fluorescencia roja). Para visualizar MV intracelulares (en los macrófagos después de la fagocitosis) se utilizó un anticuerpo anti-MV policlonal de ratón, y luego un anticuerpo anti-ratón de cabra anti-mouse conjugado (FITC). Los resultados obtenidos con esta técnica demostraron principalmente la presencia de dos tipos de vesículas: OMV's y vesículas portadoras de citoplasma (Jiang et. al., 2022).

Para determinar si las OMV's confieren protección contra el antibiótico a bacterias susceptibles, se realizó el ensayo de protección contra el antibiótico. Los resultados demostraron que las OMV's de ambas especies contienen moléculas bioactivas que aseguran la supervivencia y proliferación de la bacteria, sin embargo, aunque hubo crecimiento de las bacterias sometidas a los tratamientos con OMV's, no se observó una correlación entre la concentración de OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* con respecto a la absorbancia de los cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Figura 10).

Un ensayo realizado con el mismo protocolo en 2023, demostró la capacidad de las OMV's de *Leclercia adecarboxylata* para degradar antibiótico (ampicilina) en un medio de cultivo con *E. coli* DH5, en donde se determinó que existe una correlación directamente proporcional en cuanto a la concentración de OMV's y el crecimiento bacteriano, es decir, a mayor concentración de OMV's, mayor degradación de antibiótico que permite el crecimiento de *E. coli* DH5 (Castolo Arellano, 2023).

Cabe destacar, que mediante este ensayo se evidenció la presencia de mecanismos que permitieron el crecimiento de una bacteria no resistente en un medio con antibiótico. Uno de los mecanismos es la secreción de enzimas degradadoras de antibióticos, específicamente una  $\beta$ -lactamasa.

Jonca y colaboradores (2021), realizaron un ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) para evaluar si la concentración de la  $\beta$ -lactamasa en OMV's sería lo suficientemente importante como para permitir el crecimiento de bacterias susceptibles, en donde añadieron OMV's de *Pectobacterium zantedeschiae* y *P.*

*odoriferum* a un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  cultivadas en presencia del aumento de las concentraciones de ampicilina. Los resultados del experimento revelaron un aumento significativo de *E. coli* DH5 $\alpha$  que se cultivó en presencia de las OMV's en ambos casos, lo que indica que la enzima  $\beta$ -lactamasa producida por *Pectobacterium spp.* está presente en la OMV's y pueden suprimir la actividad antibiótica para permitir el crecimiento de bacterias susceptibles.

La  $\beta$ -lactamasa también se encuentra en OMV's de *Francisella novicida* y *Francisella tularensis* resistentes a penicilina, por lo que se sugiere que estas pueden ser capaces de alterar la concentración de antibiótico presente en su ambiente, exportando estas proteínas en OMV's que pueden tener un papel importante en la protección de *Francisella* contra antibióticos o contra otras bacterias (Pierson et. al., 2011).

Finalmente, gracias al ensayo de protección contra antibiótico, se prevé la presencia de genes de resistencia dentro de las OMV's. Las Figuras 12 y 13, muestran la presencia de los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en *C. freundii* y *C. amalonaticus*, las cuales, por transferencia horizontal, son capaces de llevar a cabo la transformación de bacterias sin resistencia, como *E. coli* DH5 $\alpha$ , en una cepa con resistencia adquirida.

Las enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) están entre las de mayor relevancia clínica, que incluyen a las enzimas: TEM y CTX-M. Hasta la fecha, se han reportado más de 400 tipos de estas enzimas y la CTX-M es la que más frecuentemente se reporta en todo el mundo. Estudios previos han determinado que las enzimas TEM tienen una tasa de mutación alta, lo que resulta en un nivel alto de diversidad en los tipos de enzimas y, por lo tanto, aumenta el alcance de la resistencia a los antibióticos (Santajit & Indrawattana, 2016).

En los ensayos de amplificación de los genes *bla*<sub>CTX-M UNIVERSAL</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> en *C. freundii* y *C. amalonaticus*, los resultados mostraron la presencia de estos genes en *C. amalonaticus* sin embargo estuvieron ausentes en *C. freundii*. No obstante, para el gen *bla*<sub>OXA-58</sub> se esperaba un producto de PCR de 599 pb, sin embargo, se obtuvo una banda de 350 pb, indicando que el gen podría encontrarse de manera parcial (Figura 14).

En el proceso de movilización de elementos genéticos, se pueden desplazar genes de resistencia que estaban en el interior del genoma bacteriano, incluso, se ha



determinado que se puede producir una delección o pérdida de bases (Van Hoek et al., 2011). En 2021, un estudio realizado en *P. aeruginosa*, demostró cambios en la secuencia de la porina OprD, lo que conlleva a deducir que la resistencia a distintos tipos de antibióticos puede ser causada por la pérdida de la expresión de esta proteína debido a presencia de polimorfismos, inserción de secuencias y codones de paro en el gen *oprD* (González Vázquez, et. al., 2021).

En 2020, se reportó la prevalencia y las características genéticas de Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC), a partir de muestras de aguas residuales de hospitales y ríos, se obtuvo un total de 124 aislamientos, 24 fueron *Citrobacter ssp.* Las especies encontradas de este género fueron *C. freundii* y *C. amalonaticus* las cuales presentaron el gen KPC-2; además *C. freundii* poseía  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) como CTX-M-15 (Suzuki et. al., 2020). Estudiar este novedoso mecanismo de resistencia es muy importante debido a que las bacterias presentes en procesos infecciosos se pueden valer de estas proteínas asociadas a membrana para proliferar de manera adecuada (Rueter & Bielaszewska, 2020).

Otro trabajo demostró que las OMV's de *Acinetobacter baumannii* son capaces de mediar la transferencia de genes de resistencia a los carbapenémicos, es decir, transfiere ADN que codifica proteínas con actividad enzimática para degradar el antibiótico. Se observó que *A. baumannii* transfiere al plásmido portador del gen *bla<sub>oxa24</sub>*, que codifica la  $\beta$ -lactamasa responsable de esta resistencia (Rumbo et. al., 2011).

Los mecanismos de transferencia horizontal de genes con la capacidad de tener diferentes eventos de mutación, da lugar a la expresión de genotipos con resistencia genéticamente estable. Por otro lado, algunos estudios han definido que el empaquetamiento de ADN en OMV's de las especies de *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Pseudomonas*, es un proceso de encapsulación complejo. Además, sugieren que no sólo se empaquetan plásmidos sino también ADN cromosómico e incluso ADN de bacteriófagos (Renelli et. al., 2004). Fulsundar y colaboradores (2014), evaluaron el potencial de transferencia genética de OMV's de *Acinetobacter baylyi*, revelando que el ADN del citosol ingresó al periplasma y posteriormente a las OMV's durante el proceso de vesiculación y que las OMV's contienen DNA en su interior, así como la lisis celular prominente durante el crecimiento bacteriano en

condiciones estresantes también puede conducir a mayores cantidades de ADN en las superficies de las OMV's. Estas observaciones confirmaron reportes previos de la asociación de ADN con las superficies internas y externas de OMV's (Fulsundar et. al., 2014).

## 10. Conclusiones

Este proyecto de tesis permite llegar a las siguientes conclusiones:

- *C. freundii* y *C. amalonaticus* son capaces de producir OMV's en ambientes hostiles, en este caso, la presencia del antibiótico ampicilina como factor estresante que promovió la hipervesiculación.
- El protocolo de purificación de OMV's realizado resultó eficiente para ambas especies.
- La TEM permitió observar las OMV's de *C. freundii* con una buena resolución, demostrando la morfología, el tamaño y las agrupaciones que se forman entre ellas.
- El perfil proteico de las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* presentan bandas similares a las de los extractos totales bacterianos. Esto indica la presencia de una gran variedad de proteínas y enzimas enriquecidas e importantes en las OMV's.
- La inmunofluorescencia indirecta demuestra el cargo de proteínas inmunogénicas asociadas a OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*.
- En el ensayo de protección contra antibiótico, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al crecimiento bacteriano de *E. coli* DH5α por la concentración de OMV's de *C. freundii*, sin embargo, en el ensayo con OMV's de *C. amalonaticus*, sí hubo diferencias significativas. Asimismo, se corrobora la presencia de enzimas que cumplen un papel importante para la proliferación

bacteriana, principalmente, la de una  $\beta$ -lactamasa con capacidad para degradar la ampicilina.

- *C. freundii* y *C. amalonaticus* son capaces de transferir genes de resistencia por medio de las OMV's a una bacteria no resistente (*E. coli* DH5 $\alpha$ ). Los amplificadores resultaron positivos para genes BLEE como *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>.
- Se detectó la presencia de los genes *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-58</sub> en *C.amalonaticus*.

## 11. Líneas de trabajo a futuro

- Realizar una caracterización proteómica del cargo asociado a OMV's, mediante espectrometría de masas.
- Obtener DNA aislado de OMV's *Citrobacter sp* para determinar la presencia de enzimas modificadoras de antibióticos mediante la técnica de PCR.
- Mejorar las condiciones de amplificación por PCR y evaluar la transferencia horizontal de los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- Obtener anticuerpos policlonales con OMV's de *Citrobacter* en el modelo murino.

## 12. Referencias

1. Azrak, María A., D'Agustini, Marcelo, Fernández, Zulma, Peruffo, María V., & Malvaso, Roque. (2009). Absceso cerebral por *Citrobacter koseri* en lactantes: presentación de un caso y revisión de la bibliografía. Archivos argentinos de pediatría, 107(6), 553-556. Recuperado en 19 de julio de 2023, de

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-00752009000600015&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752009000600015&lng=es&tlng=es).

2. Balhuizen, D. M., Veldhuizen, J. A. & Haagsman, H. P. (2021) Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development. *Front. Microbiol.*, 12, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629090>
3. Bertini, A., Giordano, A., Varesi, P., Villa, L., Mancini, C., & Carattoli, A. (2006). First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6), 2268–2269. <https://doi.org/10.1128/AAC.00166-06>
4. Bishop, D. G., & Work, E. (1965). An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *The Biochemical journal*, 96(2), 567–576. <https://doi.org/10.1042/bj0960567>
5. Campos Ortiz, S. (2021). Caracterización molecular de microvesículas secretadas a partir de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* [Tesis de Licenciatura]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
6. Castolo Arellano, G. E, (2023). Identificación de proteínas inmunogénicas asociadas a OMVs e involucradas en la patogenicidad de *Leclercia adecarboxylata* [Tesis de Licenciatura]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
7. Clavel, T., Germon, P., Vianney, A., Portalier, R., & Lazzaroni, J. C. (1998). TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Molecular microbiology*, 29(1), 359–367. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00945.x>
8. Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative

- bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature reviews. Microbiology*, 13(6), 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
9. Garcia, V., Abat, C., Moal, V., & Rolain, J.M. (2016). *Citrobacter amalonaticus* human urinary tract infections, Marseille, France. *New Microbes and New Infections*. Vol. 11, 1-5, ISSN 2052-2975, <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.01.003>.
  10. Gill, S., Catchpole, R., & Forterre, P. (2019). Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS microbiology reviews*, 43(3), 273–303. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042>
  11. Dmitriev, B., Toukach, F., & Ehlers, S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends in Microbiology*, 13(12), 569–574.
  12. Florez, C., Raab, J. E., Cooke, A. C., & Schertzer, J. W. (2017). Membrane Distribution of the Pseudomonas Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in Pseudomonas aeruginosa. *mBio*, 8(4), e01034-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01034-17>
  13. Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G. E., Johnsen, P. J., Chopade, B. A., & Nielsen, K. M. (2014). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and environmental microbiology*, 80(11), 3469–3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.04248-13>
  14. García, S. M. (2016). Tratamientos hidrotérmicos para la revalorización de lodos de industria alimentaria: obtención de proteínas e hidratos de carbono. [Tesis de Maestría]. Universidad de Oviedo.
  15. Goh, S. Y., Khan, S. A., Tee, K. K., Abu Kasim, N. H., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2016). Quorum sensing activity of *Citrobacter amalonaticus* L8A, a bacterium isolated from dental plaque. *Scientific reports*, 6, 20702. <https://doi.org/10.1038/srep20702>

16. González-Vázquez, M. C., Rocha-Gracia, R. D. 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 : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 129(4), 213–224. <https://doi.org/10.1111/apm.13118>
17. Jiang, M., Wang, Z., Xia, F., Wen, Z., Chen, R., Zhu, D., Wang, M., Zhuge, X., & Dai, J. (2022). Reductions in bacterial viability stimulate the production of Extra-intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) cytoplasm-carrying Extracellular Vesicles (EVs). *PLoS pathogens*, 18(10), e1010908. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010908>
18. Jonca, J., Waleron, M., Czaplewska, P., Bogucka, A., Steć, A., Dziomba, S., Jasiocki, J., Rychłowski, M., & Waleron, K. (2021). Membrane Vesicles of *Pectobacterium* as an Effective Protein Secretion System. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12574. <https://doi.org/10.3390/ijms222212574>
19. Kamio, Y., & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15(12), 2561–2570. <https://doi.org/10.1021/bi00657a012>
20. Kohl, P., Zingl, F. G., Eichmann, T. O., & Schild, S. (2018). Isolation of Outer Membrane Vesicles Including Their Quantitative and Qualitative Analyses. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1839, 117–134. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9_11)
21. Kumar, P., Meghvansi, M. K., & Kamboj, D. V. (2021). Phenotypic Characterization and Whole-Genome Analysis of a Novel Bacteriophage HCF1 Infecting *Citrobacter amalonaticus* and *C. freundii*. *Frontiers in microbiology*, 12, 644013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644013>

22. Kulp, A. y Kuehn, MJ (2010). Funciones biológicas y biogénesis de vesículas de membrana externa bacteriana secretadas. *Rev. Microbiol.* 64, 163–184. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073413
23. Lee, J., Kim, OY y Gho, YS (2016). Perfil proteómico de vesículas de membrana externa de bacterias Gram-negativas: Perspectivas actuales. *PROTEÓMICA - Aplicaciones clínicas*, 10(9-10), 897–909. doi:10.1002/prca.201600032
24. León-Luna, D., Fajardo-Loyola, A., Yareta-Yareta, J., Burgos-Espejo, A., Peralta-Siesquen, C., Galarza-Pérez, M., & Marcos-Carbajal, P. (2021). Molecular characterization of multiresistant enterobacteria in two departments of the Peruvian jungle. Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 41(Sp. 2), 180–187. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5720>
25. Liu, Q., Liu, Q., Yi, J., Yi, J., Liang, K., Hu, B., Zhang, X. M., Curtiss, R & Kong, Q. (2016). Las vesículas de la membrana externa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium deficientes en flagelina inducen inmunidad de reacción cruzada y proporcionan protección cruzada contra el desafío de *Salmonella* heteróloga . Informe científico 6 , 34776. <https://doi.org/10.1038/srep34776>
26. Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini S. & Vay C. (2001). Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19(1), 11-14. DOI: [10.1016/S0213-005X\(01\)72541-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72541-4)
27. Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K., & Whiteley, M. (2008). Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Molecular microbiology*, 69(2), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06302.x>

28. McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular microbiology*, 63(2), 545–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>
29. Mogensen, J. E., & Otzen, D. E. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Molecular microbiology*, 57(2), 326–346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04674.x>
30. Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annual review of microbiology*, 75, 609–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>
31. Oromí, D. R. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral* 36(10), 367-369. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180>
32. Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, MB y Keenan, JI (2010). Captación de vesículas de la membrana externa de *Helicobacter pylori* por las células epiteliales gástricas. *Infección e inmunidad* , 78 (12), 5054–5061. <https://doi.org/10.1128/IAI.00299-10>
33. Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y. U., Manyam, G., Morozov, V. N., Zhou, W., & van Hoek, M. L. (2011). Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *Journal of proteome research*, 10(3), 954–967. <https://doi.org/10.1021/pr1009756>
34. Puentes, R., Cerda, M., Orellana, B. & López, C. (1975). Sepsis a *Citrobacter* en lactante. *Revista Chilena de Pediatría* 46(3), 211-217.
35. Rueter, C., & Bielaszewska, M. (2020). Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles.



- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10(March), 1–11.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>
36. Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Méndez, J. A., Soares, N. S., Mosquera, A., Chaves, F. & Bou, G. (2011). Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7):3084-3090.  
<https://doi/epdf/10.1128/AAC.00929-10?src=getfr>
37. Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 7), 2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
38. Rozo, C. y Dussán, J. (2010). Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 22–31.  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15519>
39. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
40. Schaar, V., de Vries, S. P., Perez Vidakovics, M. L., Bootsma, H. J., Larsson, L., Hermans, P. W., Bjartell, A., Mörgelin, M., & Riesbeck, K. (2011). Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cellular microbiology*, 13(3), 432–449. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01546.x>
41. Schertzer, J. W., & Whiteley, M. (2012). A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *mBio*, 3(2), e00297-11.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00297-11>

42. Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
43. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Wailker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
44. Suzuki, Y., Nazareno, P.J., Nakano, R., Mondoy, M., Nakano, A., Bugayong, M.P., et al. (2020). Presencia ambiental y características genéticas de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas de aguas residuales hospitalarias y agua de río en Filipinas. *aplicación Reinar. Microbiol.* 86, e1906–e1919. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-19>
45. Tashiro, Y., Ichikawa, S., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2010). Pseudomonas quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes and environments*, 25(2), 120–125. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me09182>
46. Thay, B., Damm, A., Kufer, T. A., Wai, S. N., & Oscarsson, J. (2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Infection and immunity*, 82(10), 4034–4046. <https://doi.org/10.1128/IAI.01980-14>
47. Uilauri-González, C. y Freire-Cuesta, S. (2019). *Citrobacter freundii* multirresistente como agente etiológico de infección de vías urinarias, *Kasmera*, vol. 47, núm. 1, pp. 09-13.
48. Valguarnera, E., Scott, N. E., Azimzadeh, P., & Feldman, M. F. (2018). Surface Exposure and Packing of Lipoproteins into Outer Membrane Vesicles Are Coupled Processes in Bacteroides. *mSphere*, 3(6), e00559-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00559-18>

49. van der Pol, L., Stork M, van der Ley P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J*, 1;10(11):1689–706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
50. Wessel, A. K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E. M., & Whiteley, M. (2013). Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. *Journal of bacteriology*, 195(2), 213–219. <https://doi.org/10.1128/JB.01253-12>
51. Wu, W., Feng, Y., Carattoli, A., & Zong, Z. (2015). Characterization of an *Enterobacter cloacae* Strain Producing both KPC and NDM Carbapenemases by Whole-Genome Sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 6625–6628. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-15>

## 13. Anexos

### Participaciones Académicas

**II Coloquio de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas**, llevado a cabo el 27 de febrero de 2023 con el proyecto en modalidad de cartel titulado: “Bacterias pertenecientes al género *Citrobacter* son capaces de secretar OMV’s en condiciones de estrés por antibiótico”.

**CVIII Reunión Anual y I Internacional de Profesores de Microbiología y Parasitología A.C. y el XIX Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología** realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad Veracruzana llevado a cabo del 20 al 22 de abril de 2023 en modalidad Microbiología-Investigación Básica y Clínica en Presentación de Carteles, obteniendo el 1er lugar con el proyecto titulado: “Expresión, purificación y caracterización molecular de OMV’s secretadas de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*”.

**XLXVII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica** realizado del 24 al 27 de mayo de 2023 en WTC Veracruz, México en la modalidad de trabajos libres en la categoría de “Trabajo de Investigación” con el tema: “Microvesículas bacterianas secretadas y su importancia en la multidrogorresistencia”.

**IV Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores 2023: Modalidad Virtual** en el área de Medicina y Ciencias de la salud el cual se llevó a cabo del 5 al 7 de junio de 2023, con el proyecto titulado: “Purificación y caracterización molecular de las OMV’s secretadas de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*”.