



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS CON CAPACIDAD PROTECTORA  
ANTE EL RETO LETAL CON *Acinetobacter baumannii* EN  
RATONES DIABETIZADOS**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**VICTOR MEDINA PASION**

**DIRECTOR:**

**DR. HUMBERTO VALDOVINOS TORRES**

**CUERNAVACA, MORELOS.**

**JUNIO, 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Humberto Valdovinos Torres**

Gracias por compartir su conocimiento, sus consejos, su paciencia y darme ánimos para seguir y culminar esta etapa de mi vida académica.

### **Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa**

Por su ingenio de encontrar solución ante situaciones complejas para mí, además por el conocimiento compartido durante mi estancia en L1PB.

### **Dr. Jesús Martínez Barnetch**

Por permitir mi estancia en el laboratorio.

### **A mis sinodales**

Por sus sugerencias y aportaciones en esta tesis.

### **Q. I. Sara Yuvisela Bahena Reyes**

Por apoyarme en todo momento durante mi estancia.

### **Biol. Sughey Bravo Romero**

Por su apoyo en los experimentos.

### **A mis amigos**

Miriam Liz Muñoz y Teo Santiago por el apoyo en todo momento.

### **Mi familia**

Mis padres y hermanos por apoyarme durante toda la carrera.

## CONTENIDO

Lista de abreviaturas y acrónimos.....	4
RESUMEN.....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
Resistencia bacteriana a los antibióticos .....	7
Infecciones nosocomiales causadas por bacterias.....	11
<i>Acinetobacter baumannii</i> .....	13
Mecanismo de resistencia de <i>A. baumannii</i> .....	14
Epidemiología .....	16
Biotecnología aplicada a la salud.....	17
ANTECEDENTES .....	19
JUSTIFICACIÓN .....	21
HIPÓTESIS .....	22
OBJETIVOS .....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos .....	22
METODOLOGÍA .....	23
1 <sup>er</sup> Objetivo: Obtención de las proteínas recombinantes.....	23
2 <sup>do</sup> Objetivo: Evaluar la seroconversión de ratones inmunizados .....	25
3 <sup>er</sup> Objetivo: Supervivencia de ratones desafiados con dosis letal.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	48
PERSPECTIVAS.....	52
ANEXOS .....	53
REFERENCIAS.....	58

## Lista de abreviaturas y acrónimos

AcM	Anticuerpos Monoclonales.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
Ant-His	Anti-Histidinas.
ATCC	American Type Culture Collection; centro global de recursos biológicos, proveedor de líneas de células y microorganismos.
AmpC	Enzima capaz de conferir resistencia contra antibióticos betalactámicos.
BALB/C	Cepa albina de laboratorio del ratón común
BL21-A1	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para expresión de proteínas recombinantes.
CDAS	Cefalosporina derivada de <i>Acinetobacter</i> .
CDDEP	Centro de Dinamica, Economica y Politica de Enfermedades.
DMT1	Diabetes melitus tipo 1.
EMEA	European Medicines Agency and Europa; agencia auropea de medicamentos.
ESBL	Extended Spectrum Beta-lactamase; Betalactamasa de espectro extendido.
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y especies de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>
FDA	Food and drug administration.
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography.
GLUT 2	Transporters Glucose; Transportador de glucosa.
GST	Glutathione S Transferasa.
HIS	Histidinas.
HiTrap HP	Columna de cromatografía de alta resolución para purificación de proteínas.
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atencion de la Salud.
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography; cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IN	Infecciones Nosocomiales.

ISAbal e ISAbal25	Promotores de transcripción del gen ampC.
kDa	kilo Dalton.
MDR	Multi Drug Resistance; Multirresistencia.
mg/kg	Miligramos por Kilogramo.
Ni <sup>+2</sup>	Ion Níquel.
nm	Nanómetros.
Ni-NTA	Níquel-Ácido Nitrilotriacético es una resina cargada con Níquel para purificación de proteínas recombinantes.
OMP24, OMP15, OMP07 y EXTR22	Outer membrane protein. Proteína de la membrana externa (Antígenos utilizados en este proyecto para su evaluar su capacidad inmunológica)
OXA51	Enzima capaz de hidrolizar a penicilinas y carbapenémicos
PBS	Phosphate Buffered Saline; solución amortiguadora de sales y fosfatos.
PDR	Pandrug Resistance; resistencia a las drogas.
PCR	Polymerase Chain Reaction; reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Indica la concentración de iones de hidrógeno en una solución.
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
STZ	Estreptozotocina.
TSA	Trypto-Casein Soy Agar; agar triptona de soya.
TSB	Tryptic Soy Broth; caldo de soja triptica.
UFC	Unidades Formadoras de Colonia.
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonia por Mililitro.
VME	Vesículas de Membrana Externa.
WHO	World Health Organization; Organización Mundial de la Salud.
XDR	Extensively Drug-Resistance; Resistencia extensa.

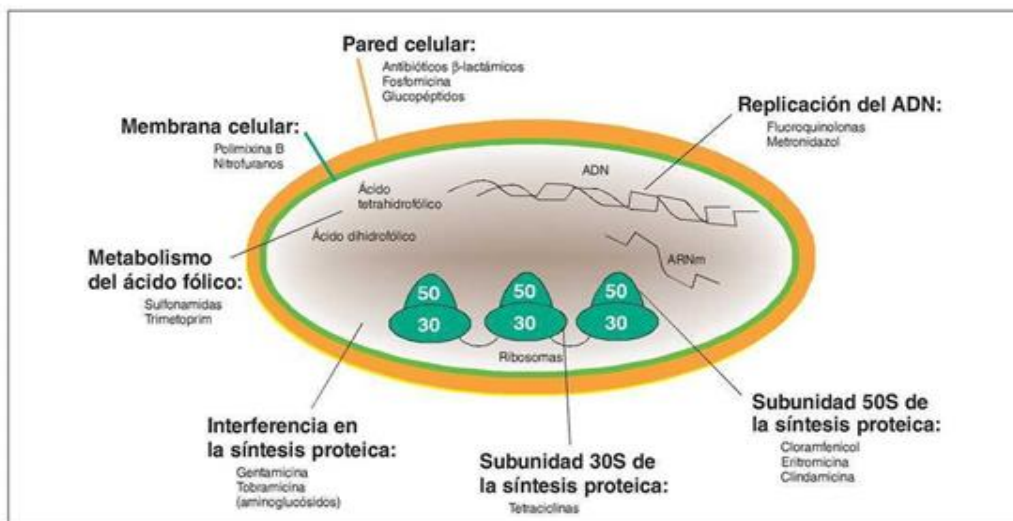
## RESUMEN

Las infecciones por bacterias ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Éste problema se ha potenciado debido a que estos microorganismos han desarrollado resistencia a los diferentes antibióticos utilizados para combatirlos. Cualquier individuo puede adquirir infecciones por microorganismo multirresistentes, sin embargo, las personas que sufren con mayor facilidad el embate de estas infecciones son aquellos que se encuentran hospitalizadas en las unidades de cuidados intensivos o que tienen un sistema inmune deprimido. Entre los microorganismos se encuentra *Acinetobacter baumannii*, esta bacteria produce infecciones que pueden evolucionar a bacteriemias, neumonía, meningitis y ocasionar incluso la muerte de estos pacientes. El control de estas infecciones representa un gasto económico de gran importancia para el sector salud y la sociedad en general, por lo cual, se hace necesario la búsqueda de otras alternativas preventivas o terapéuticas que permitan controlar y erradicar éstas infecciones. En este sentido, en nuestro grupo de investigación se identificaron, mediante vacunología reversa, proteínas de membrana externa conservadas en distintos aislados de *A. baumannii* que podrían poseer potencial terapéutico. En éste trabajo de tesis se evaluó la respuesta inmune de ratones BALB/C diabetizados contra algunas de estas proteínas. Los dominios expuestos de estas proteínas fueron producidos de manera recombinantemente en *E.coli* y luego se purificaron por columnas de afinidad. Los ratones inmunizados con estos péptidos, fueron diabetizados con estreptozotocina y posteriormente recibieron una dosis letal de *A. baumannii* para finalmente evaluar la capacidad inmune protectora inducida por dichos péptidos. Inicialmente se consideró trabajar con 4 proteínas, pero sólo 2 se lograron purificar en su totalidad. Los resultados demuestran que ambas proteínas inducen la producción de anticuerpos en los ratones inmunizados, sin embargo, esta respuesta inmune no protegió a los ratones cuando fueron desafiados con la dosis letal de *A. baumannii*. Por lo anterior, se requiere realizar más experimentos para determinar si estas proteínas tienen algún efecto inmunoprotector si se utilizan en combinación de dos o más proteínas durante la inmunización.

# MARCO TEÓRICO

## Resistencia bacteriana a los antibióticos

Los antibióticos son compuestos químicos utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos bacterianos infecciosos. La época de oro de los antibióticos osciló entre los años 1930 y 1960. Con la introducción de estos medicamentos en la práctica clínica en la década de los años cuarenta del siglo XX se salvaron millones de vidas humanas, además se han desarrollado diversos antibióticos que tienen distintas dianas dentro de la célula bacteriana lo que ha permitido hacerle frente a los patógenos y mejorando la salud e incrementando en varios años la esperanza de vida de las poblaciones en todo el mundo (Fig. 1) (Alós, 2015; Aslam y col., 2018).



**Fig.1 Múltiples antibióticos utilizados para tratar diferentes infecciones**

Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos y a veces múltiples, pero todos operan en algunos de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de la bacteria sobre la cual actúa (Pérez, 1998, imagen tomada de Bilal y col., 2011).

Lamentablemente pocos años más tarde Alexander Fleming y Howard Walter Florey emitieron la primera advertencia sobre la resistencia a los antibióticos, cuando recibieron el Premio Nobel en 1945, por el descubrimiento de la penicilina (Nathan y col. 2014). A finales de la década de 1950 y principios de 1960, la resistencia a los antibióticos se detectó por primera vez entre bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* (Aslam y col., 2018).

Múltiples medicamentos han sido rebasados por los patógenos provocando un problema de salud a nivel mundial que está en constante evolución. La resistencia antimicrobiana se desarrolla cuando las bacterias se adaptan y crecen en presencia de antibióticos, provocada principalmente por mutaciones o transferencia de genes de resistencia entre microorganismos. La aparición de la resistencia va ligada a la frecuencia del uso de los fármacos. Debido a que muchos antibióticos pertenecen a la misma clase de medicamentos, la resistencia a un antibiótico específico puede llevar a la resistencia de toda una clase relacionada (Fig. 1) (Rodríguez y col., 2014; WHO 2016). El uso indiscriminado de los antibióticos y la falta persistente para desarrollar o descubrir nuevos antibióticos son los factores predisponentes asociados con la aparición de resistencia antimicrobiana (Aslam y col., 2018). La resistencia se puede presentar en diferentes grados y para ello se crearon los términos para identificar el grado de susceptibilidad que presentan los microorganismos a los antibióticos. La MDR o multirresistencia (Multi Drug Resistance) se definió como la ausencia de sensibilidad al menos de un antibiótico de tres o más familias de antimicrobianos, XDR o resistencia extensa (Extensively Drug-Resistance) se definió como la ausencia de sensibilidad al menos un antibiótico de todas las familias excepto una o dos y el PDR o panresistencia (Pandrug Resistance) se definió como la no susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos. (Magiorakos y col., 2012).

Otras causas que coadyuvan a esta problemática global son: la superpoblación, migración, utilización errónea de antibióticos, interrupción del tratamiento, uso indebido de antimicrobianos en prevención de enfermedades en animales sanos,



promotores de crecimiento, propagación de la vida silvestre, entre otros (<http://www.who.int>; Aslam y col., 2018).

En el 2017, la organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, donde se incluyen las 11 especies de la familia *Enterobacteriaceae* que provocan infecciones nosocomiales graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías, etc. La lista publicada de la OMS divide estos microorganismos en tres categorías con prioridad: crítica, elevada y media.

### **Crítica**

- a) *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- b) *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- c) Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL o Betalactamasa de espectro extendido (del inglés Extended Spectrum Beta-lactamase)

### **Elevada**

- a) *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- b) *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- c) *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- d) *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- e) *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- f) *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas.

### **Media**

- a) *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- b) *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- c) *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas (OMS, 2017)

En el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos, la OMS enfatizó que este problema supone una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta de salud pública mundial eficaz ante el desafío persistente de las enfermedades infecciosas. Los antimicrobianos eficaces son imprescindibles para las medidas preventivas y curativas para proteger a pacientes frente a enfermedades potencialmente mortales, que permitan garantizar que se puedan llevar a cabo procedimientos complejos, como la cirugía y la quimioterapia con escasos riesgos de infecciones intrahospitalarias. Sin embargo, el mal uso y el abuso sistemático de estos fármacos en la medicina y en las granjas productoras de alimentos han puesto en riesgo a todas las naciones. En 2013, se hizo una estimación que sólo en EUA se administraron más de 18,000 toneladas de antibióticos en un año, lo que representa un 80% en animales y menos del 20% en humanos. La dimensión global de este problema se manifiesta en otro estudio por el gobierno de Inglaterra, donde se estimó que aproximadamente 700,000 personas mueren al año en el mundo por infecciones con microorganismos resistentes a los antibióticos. De continuar esta problemática, se estima que en el año 2050 incrementa a 10 millones de muertes (Pérez y col, 2018).

Además hay pocos productos de recambio en fase de investigación y desarrollo. Sin medidas armonizadas e inmediatas a escala mundial avanzamos hacia una era post-antibiótica en la que infecciones comunes podrían volver a ser mortales (WHO, 2017).

Ante ésta situación, la Asamblea Mundial de la Salud adoptó un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos en el que se establecen cinco objetivos:

- Mejorar la concienciación y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas.
- Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación.

- Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones.
- Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal.
- Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

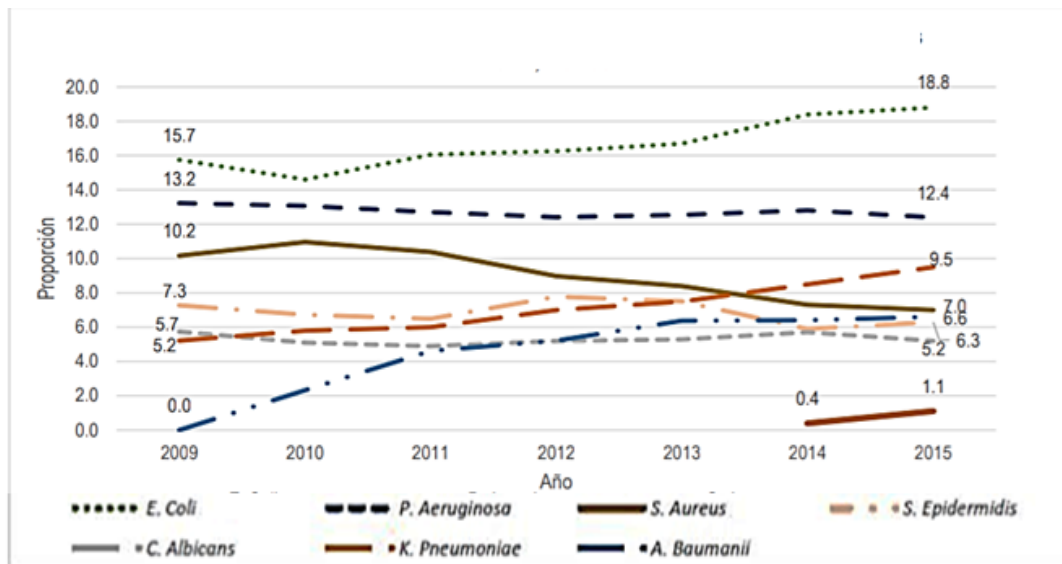
### **Infecciones nosocomiales causadas por bacterias**

Las infecciones nosocomiales (IN) son contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital u otro centro sanitario y que ocurrió durante las 24 ó 48 horas después de su ingreso. Para la adquisición de patógenos hospitalarios se requiere de un reservorio huésped y la diseminación del microorganismo se da a través del aire, soluciones, medicamentos, contacto de manos del personal y/o equipo médico (ventiladores mecánicos, estetoscopio, bata, corbata, etcétera) (Galván y col., 2017). Las IN según la OMS ocupan la máxima prevalencia en las unidades de cuidados intensivos y las personas inmunocomprometidas y mayores de edad tienen más vulnerabilidad para contraer una infección, estas infecciones provocan estancias hospitalarias prolongadas, costos adicionales para los sistemas de salud, elevados costos para familiares de los pacientes, resistencia de microorganismos a los antimicrobianos, algún tipo de discapacidad e incluso la muerte (WHO 2016; WHO, 2017).

Por otra parte, las especies patógenas causales de IN con mayor resistencia y más frecuentes a nivel mundial encontramos al grupo ESKAPE, nombrado así por la primera letra de cada especie (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de la familia *Enterobacteriaceae*) (Gutiérrez MJ y col. 2017). En los hospitales los bacilos Gram negativos son responsables del 60% de la neumonía asociada a ventilación mecánica, mientras que del 20 al 30% de las infecciones del torrente sanguíneo están relacionadas con el catéter, ambas acciones, son la

causa común de sepsis en los sitios de herida quirúrgica o infección de vías urinarias. (Rodríguez y col. 2016). Estos patógenos que causan infecciones han dejado de ser fácilmente tratables y representan un problema de gran importancia debido al bajo desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos.

En México, reportes de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) de la Secretaría de Salud 2015 indican que las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) más frecuentes son bacteriemias 24%, neumonía 20.7%, infección de vías urinarias 15.7%, infección de herida quirúrgica 15.0%, otras 24.6%, por otra parte la proporción microorganismos aislado con más frecuencia en los hospitales generales en México fueron las bacterias Gram-negativas (Fig. 2) (Gutiérrez MJ y col., 2017; RHOVE 2015).



**Fig. 2. Microorganismos aislados en IAAS durante 2009-2015 en las unidades RHOVE.**

De acuerdo con el último reporte de las unidades RHOVE 2015 muestra que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* han presentado una tendencia ascendente en los últimos 5 años (figura tomada de RHOVE., 2015).

### ***Acinetobacter baumannii***

Como se mencionó anteriormente, *A. baumannii* se encuentra entre los agentes microbianos multiresistentes que son adquiridos frecuentemente en unidades de cuidados intensivos que requiere de nuevas alternativas para su tratamiento. El nombre de *Acinetobacter* viene del griego "akinetos", que significa no móvil, fue descrita por primera vez en 1911 por el microbiólogo holandés Beijerinck con el nombre de *Micrococcus calcoaceticus*. En 1954, el género *Acinetobacter* fue propuesto por Brisou y Prévot, durante 1968 el género fue aceptado formando parte de la familia Moraxellaceae, se han hecho estudios de hibridación de ADN identificando 23 especies los cuales 11 no tienen nombre definido. Son bacilos cortos Gram negativos, inmóviles, aerobios estrictos, catalasa positiva y oxidasa negativos, no forman esporas. En su fase de crecimiento tienen forma de bacilo y en la fase estacionaria de cocobacilo, crece a diferentes temperaturas con un rango de 30 a 44°C. Presenta varios hábitats naturales, suelo, agua, en humanos puede colonizar piel, heridas, tracto respiratorio y gastrointestinal (Vanegas y col., 2014; Rada 2016).

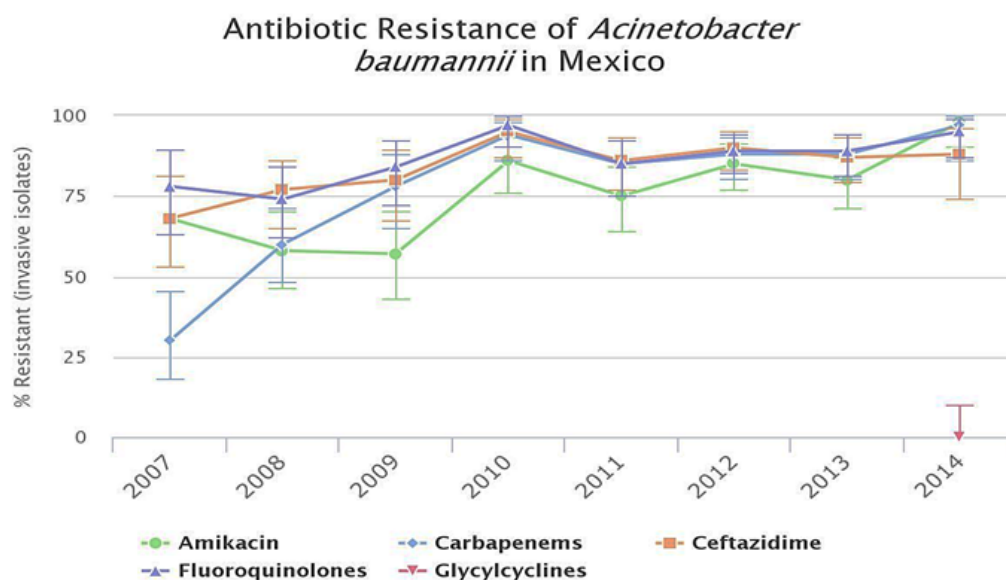
Entre algunas facultades que ha desarrollado *Acinetobacter* para producir infecciones se pueden mencionar: a) su capacidad de adherirse a las células epiteliales por medio de fimbrias; b) su tolerancia a pH ácidos, bajas temperaturas y condiciones de sequía; c) la producción de bacteriomicina que funciona como un antibiótico contra otras bacterias para incrementar su sobrevivencia; d) La presencia de polisacáridos capsulares (constituido por L-ramnosa, D-glucosa, D-ácido glucurónico y D-manosa) que hacen a *Acinetobacter* más hidrofílica, esto reduce la adherencia a hidrocarburos y la ayudan a evadir la fagocitosis; e) La producción de enzimas que dañan a tejidos lipídicos como, el butirato, caprilato, esterases, leucina arilamidasa, gelatinasa y lipasa; y f) la producción del sideroforo aerobactinas en la membrana externa que ayuda en el apresamiento de hierro para poder sobrevivir en el cuerpo humano (Rada 2016).

## **Mecanismo de resistencia de *A. baumannii***

*Acinetobacter baumannii* ha logrado desarrollar multirresistencia mediante  $\beta$ -lactamasas, sobre expresa bombas de expulsión propiciando la pérdida de porinas para eliminar o inhibir la entrada de antibióticos y puede modificar el blanco de acción de estos productos químicos. Presenta mecanismos de resistencia a antibióticos así como la capacidad para adquirir nuevas respuestas contra estos medicamentos. Estudios demuestran que *A. baumannii* presenta una *cefalosporinasa* tipo AmpC no inducible denominada CDAs (Cefalosporinasa derivada de *Acinetobacter*). Dicha enzima, codificada por el gen *ampC*, se encuentra en el cromosoma y confieren resistencia a cefalosporinas de amplio espectro. La sobreexpresión de CDAs está mediada por la presencia de secuencias de inserción que contienen promotores que favorecen la transcripción del gen *AmpC* (como la ISAba1 e ISAba125), lo que a su vez, produce resistencia a cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, sin afectar carbapenémicos, ni cefepime. Las cepas que expresan bajos niveles del gen *AmpC* tienen una resistencia exclusivamente a ampicilina. Otro mecanismo de resistencia en *A. baumannii* es la presencia de la oxacilinasasa OXA- 51, cuya expresión basal hidroliza débilmente penicilinas y carbapenémicos; su sobreexpresión también es mediada por la secuencia de inserción ISAba1 en un mecanismo similar a la AmpC cromosómica (Vanegas y col., 2014; Hernández y col., 2010).

Por otro parte, en los registros de la década de 1960 las cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* eran susceptibles a la mayoría de los antibióticos, pero en 1985 se reportó el primer aislamiento con resistencia a carbapenémicos, que eran fármacos de última opción terapéutica para su tratamiento. En la actualidad los médicos recetan medicamentos de último recurso porque los microorganismos que causan infecciones humanas han adquirido resistencia, además, hay pocas perspectivas para el desarrollo de nuevas clases de antibióticos a corto plazo (WHO, 2016).

Actualmente las cepas de *A. baumannii* aisladas en México presentan resistencia a carbapenémicos 70%-96%, Amikacina 90%-100%, Ceftazidime 74%-96%, Fluroquinolonas 87%-99% y glicilciclinas -1% -10% (Fig.3), lo anterior se asocia a que México tiene el mayor consumo de antibióticos registrado en Latinoamérica (Pérez 2018; Arias 2016; CDDEP 2019).



**Fig. 3. El incremento de resistencia a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* en México.**

Los datos agregados en la gráfica fueron del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" durante los años 2007-2015, en donde El Centro de Dinámica, Economía y Política de Enfermedades (CDDP por sus siglas en inglés) representa el aumento de resistencia que adquiere *Acinetobacter baumannii* en México anualmente (figura tomada de CDDEP, 2019).

## Epidemiología

En Europa *A. baumannii* se le considera el noveno patógeno más común en infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo, en Latinoamérica alcanza 5,3% de los aislados totales de bacteriemias nosocomiales. En México, la prevalencia va del 5 hasta 19% las infecciones asociadas con la atención de la salud, siendo las personas que están en las unidades de cuidados intensivos las que presentan un riesgo de 5 a 10 veces mayor en comparación con otras áreas del hospital. (Galván 2017; Rodríguez col., 2016). En un estudio de aislados clínicos intrahospitalarios de las unidades médicas de alta especialidad (traumatología, ortopedia y ginecología pediátrica) del Instituto Mexicano del Seguro social, se reportó que *Acinetobacter* ocupó el tercer y quinto lugar respectivamente de esas áreas, mientras que en el Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde, se convirtió en un agente nosocomial endémico con una disminución persistente en susceptibilidad a todas las categorías de agentes antimicrobianos en los últimos 13 años (Morfin-Otero y col., 2013; Arias-Flores 2016).

Durante los últimos años se han presentado infecciones nosocomiales en diferentes partes del mundo, además, son causas importantes de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometido. Los principales problemas inmunológicos en los humanos son la deficiencia células fagocitarias (neutropenia), deficiencia de la respuesta inmunológica humoral (hipogammaglobulinemia) y deficiencia de la inmunidad celular (linfopenia T4). Aunado a lo anterior, las enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión arterial, enfermedad crónica pulmonar, entre otras), la presencia de heridas y una estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos incrementan el riesgo de contraer una infección por bacterias multirresistentes. (Londoño y col. 2016; Saavedra y col., 2016; Cuellar 2013).

Como se puede observar, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de salud mundial que impacta a toda la población, sin embargo, el panorama se podría complicar aún más si se conjuga con la población que posee un sistema inmune que se degenera al paso del tiempo por alguna enfermedad crónica. Lo antes mencionado, y el escaso desarrollo de nuevos fármacos,



complican el panorama de la salud y la posibilidad para tratar cualquier infección ocasionada por microorganismos multirresistentes; propiciando un incremento de la mortalidad y/o una prolongada estancia de los pacientes en el hospital, con un consecuente incremento en el costo de los cuidados de la salud (WHO 2016).

### **Biotechnología aplicada a la salud**

La OMS destaca en su último punto la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías (incluyendo nuevos fármacos) para el tratamiento de las infecciones por bacterias Multirresistentes. Una de estas alternativas podría ser la investigación biotecnológica enfocada hacia el desarrollo de vacunas o anticuerpos producidos *in vitro*. En los últimos años se han obtenido diferentes anticuerpos monoclonales (AcM) con fines terapéuticos, lo cual, representa una oportunidad para controlar y erradicar diferentes enfermedades ocasionadas por microorganismos. Actualmente existen más de 25 AcM terapéuticos aprobados por las agencias reguladoras FDA (Food and Drug Administration en EUA) y EMEA (European Medicines Agency en Europa); y hay cientos de AcM en desarrollo clínico (<http://clinicaltrials.gov>). En la actualidad, también existen varios anticuerpos monoclonales contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* en fase clínica (Oleksiewicz y col., 2012). El avance biotecnológico y el creciente desarrollo de resistencia a antimicrobianos está renovando el interés de los anticuerpos en el tratamiento de infecciones bacterianas. La vacunología inversa es un enfoque *in silico* que implica el análisis bioinformático de secuencias genómicas de los organismos de interés para la identificación de antígenos potencialmente protectores. Estos antígenos suelen ser proteínas ampliamente conservadas y presentes en distintos aislados bacterianos de la misma especie, prevalentes, solubles y expuestas en la superficie celular. Otro enfoque implica el análisis proteómico de las vesículas de membrana externa (VME) liberadas por las bacterias, lo que proporciona una visión profunda de las proteínas que podrían estar expuestas en la superficie bacteriana y potencialmente accesibles a los anticuerpos. Ambas tecnologías se utilizan con frecuencia como estrategias independientes y han contribuido significativamente a la identificación de nuevos

antígenos protectores. Por ejemplo, los antígenos vacúnales que proporcionan protección contra *Escherichia coli* patógena extra intestinal (Moriel y col., 2010; Fattahian y col., 2011) y *Neisseria meningitidis* serogrupo B (Scorza y col., 2008; Pizza y col., 2010) se han identificado utilizando estos métodos.

Como se ha descrito, ante la escasez de antibióticos activos contra *A. baumannii* la vacunación podría ser una estrategia alterna para reducir la carga y el impacto de las infecciones causadas por este patógeno. En este contexto, se han realizado diferentes estudios que han logrado la protección contra las infecciones por *A. baumannii* en ratones inmunizados con las proteínas OmpA, Ata y Bap (Luo y col., 2012; Bentancor y col., 2012; Fattahian y col., 2011). En otro trabajo se demostró que distintos antígenos de *Acinetobacter baumannii* (OmpK, FKIB, Ompp1) fueron obtenidos mediante análisis de bioinformática, denominado vacunología reversa, podían generar actividad protectora en un modelo de neumonía de ratón (Chiang y col., 2015). En conjunto estos estudios resaltan el potencial y la viabilidad de la vacunación como medida para controlar infecciones contra *A. baumannii*. Sin embargo, la solubilidad, variabilidad y prevalencia de estos antígenos representan obstáculos significativos para la administración de una vacuna ampliamente protectora (Moriel y col., 2013).

## ANTECEDENTES

De acuerdo a lo anterior, la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud que requiere la búsqueda de otras alternativas (p.e. vacunas) que ayuden a controlar las infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii*. En el grupo de laboratorio donde se desarrolló éste trabajo de tesis, previamente se aplicó un enfoque de vacunología reversa para identificar proteínas de membrana externa que pudieran ser utilizadas como antígenos terapéuticos. Para este fin, previamente se realizó un análisis bioinformático de las secuencias de genómicas de diferentes cepas de *A. baumannii* que se encuentran disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/>) para identificar proteínas candidatas y ser utilizados como antígenos vacúnales. Con éste análisis se pretendía identificar proteínas de membrana externa, altamente conservadas en diferentes aislados, que tuvieran dominios peptídicos altamente expuestos (sitios no hidrofóbicos y que sus demás características les permitieran estar expuestos); por lo que potencialmente podrían ser antigénicos (ver Tabla 1). Este análisis permitió la identificación de 4 péptidos de más de 100 aminoácidos y fueron etiquetados como: OMP24, OMP15, OMP07 y EXTR22 como se muestran en la tabla 2. OMP24 es una proteína formadora de poros llamada Tsx. OMP15 es un subunidad de la bomba RND para la expulsión de multidrogas. OMP7 y EXTR22 son proteínas hipotéticas que tienen similitud con enzimas transglicosilasas y endonucleasas DNA/RNA, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican para los dominios expuestos de estas proteínas fueron amplificadas por PCR y cada uno de estos productos se introdujo en el vector de expresión pIVEX2.4 (Roche, Catálogo 3 253 538). Éste vector permite la adición de 6 histidinas en la región carboxilo terminal en las proteínas que a su vez permite la purificación de estos péptidos a través de cromatografía de afinidad en columnas con resina agarosa de níquel (Ni-NTA). Las construcciones generadas

fueron introducidas en la cepa BL21-A1 de *E. coli* para la producción recombinante de los distintos péptidos.

**Tabla 1. Proteínas de *A. baumannii* obtenidas por vacunología inversa**

Nombre Proteína	Función	aa	KDa
Hipotética <b>OMP07</b>	Lytic murein transglycosylase	247	27.1
AdeH <b>OMP15</b>	Multidrug efflux RND transporter outer membrane subunit	306	33.4
Hipotética <b>Extr22</b>	DNA/RNA non-specific endonuclease	266	29.6
Tsx <b>OMP24</b>	Nucleoside-specific channel-forming protein	241	27.7

**Tabla 2. Péptidos de *A. baumannii* clonadas en el vector pIVEX 2.4Nde y transformadas en la cepas BL21-A1 de *E. coli***

	# pb	aa	KDa	PI
<b>OMP07</b>	309	103	11.1	4.9
Pep-fusion		129	14.1	7
Sin Hist		112	12.2	6
<b>OMP15</b>	576	192	20.7	5.7
Pep-fusion		219	23.7	7.1
Sin Hist		202	21.8	7
<b>Extr22</b>	555	185	20.8	9.3
Pep-fusion		212	23.8	9.4
Sin Hist		195	22	9.4
<b>OMP24</b>	414	138	16.1	4.1
Pep-fusion		165	19.1	4.9
Sin Hist		148	17.2	4.4

## JUSTIFICACIÓN

La multirresistencia bacteriana a diferentes fármacos ha propiciado un panorama complicado para los sistemas de salud a nivel mundial. Estas infecciones prolongan la estancia de los pacientes en los hospitales y elevan los costos de su atención, afectando el presupuesto de los sistemas de salud y de la familia y en otras ocasiones propician la pérdida de vidas. Los pacientes con enfermedades crónico degenerativas son blanco fácil de estas infecciones, por lo tanto, es una parte de la población muy susceptible de padecer estas infecciones. En general, la multirresistencia bacteriana representa una grave amenaza para la salud pública y se requiere de otras herramientas como la biotecnología para combatir un problema emergente de importancia mundial.

*Acinetobacter baumannii* es un patógeno humano que ha desarrollado multirresistencia a antimicrobianos y su presencia es de gran importancia en infecciones intrahospitalarias. Desafortunadamente aún no se cuenta con una vacuna para controlar las infecciones causadas por esta bacteria. En éste trabajo se pretende evaluar la respuesta inmune protectora contra *A. baumannii* de diferentes antígenos de membrana externa en modelos murino. Esta respuesta inmune podría ser utilizada sola o en combinación con antibióticos para prevenir o eliminar dichas infecciones. El desarrollo de una respuesta inmune protectora contra *A. baumannii* en pacientes podría ser de ayuda para contender contra este tipo de infecciones.

## HIPÓTESIS

Las proteínas candidatas de membrana externa de *A. baumannii* inducirán inmunidad protectora en un modelo de ratón diabético.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la capacidad protectora de los péptidos OMP24, OMP15, OMP07 y EXTR22 de *Acinetobacter baumannii* en ratones diabetizados.

### Objetivos específicos

- Obtener péptidos recombinantes de la membrana externa de *Acinetobacter baumannii*.
- Evaluar la seroconversión de ratones inmunizados con antígenos de *Acinetobacter baumannii*.
- Evaluar la sobrevivencia de ratones diabéticos inmunizados y desafiados con una dosis letal de *Acinetobacter baumannii*.

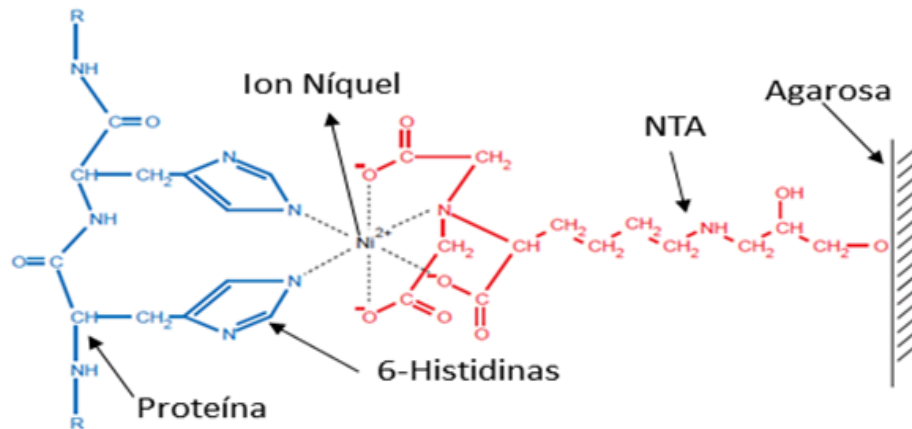
## METODOLOGÍA

### 1<sup>er</sup> Objetivo: Obtención de las proteínas recombinantes

Para cumplir con éste objetivo se realizaron cultivos de *E. coli* (BL21-A1) previamente transformadas en el laboratorio con las construcciones que contienen los segmentos génicos que codifican a los péptidos OMP24, OMP15, OMP07 y EXTR22 de *Acinetobacter baumannii* (Tabla 2). Éstos cultivos se realizaron en 100 ml de medio LB (Luria Bertani) con antibiótico (carbenicilina) 100 µg/ml, y glucosa al 0.1%. Los cultivos se incubaron durante 3 horas y media, aproximadamente a una densidad óptica de 0.4 a una longitud de onda de 600 nanómetros, posteriormente se indujo la expresión de las proteínas añadiendo arabinosa al 0.2% e incubando durante 4 horas adicionales (Anexo I). Las bacterias se cosecharon por centrifugación, se tomó una pequeña muestra para extraer sus proteínas y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie para visualizar las proteínas y observar la expresión y el estado de las proteínas de interés.

Las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography o IMAC) en columnas HiTrap™ Protein, (GE Healthcare). Se utilizó esta técnica debido su bajo costo en comparación de otras técnicas, además diversos autores mencionan mayor eficacia cuando se utilizan con proteínas etiquetadas con histidinas. El mecanismo de esta técnica, está basada en la afinidad de las histidinas, unido a iones metálicos que están inmovilizados en la columna como el Ni<sup>+2</sup>, es decir las proteínas que tengan la etiqueta de histidinas se unirán con el níquel y aquellas que no la presenten serán eludidas mediante lavados con diferentes buffers, en la imagen se observa la constitución del interior de la columna (Fig.4).

Una vez purificadas se analizó la calidad de la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE y por último se identificaron las proteínas de interés mediante western blot utilizando el anticuerpo Ant-His que reconoce la cola de histidinas que presentan las proteínas recombinantes.



**Fig. 4. Interacción entre Ni-NTA y una proteína marcada con 6xHis**

EL ácido nitrilotriacético (NTA) está unido al soporte sólido en una columna (perlas de agarosa). El ion de níquel está unido entre la proteína, la poli-histidina y la molécula de NTA. Por último en la imagen se observa dos de las 6 histidinas presentes en la proteína (imagen tomada y modificada del manual *The QIAexpressionist.*, 2003).



## **2<sup>do</sup> Objetivo: Evaluar la seroconversión de ratones inmunizados**

Para cumplir con éste objetivo se utilizaron ratones de la cepa BALB/C de 5 semanas de edad, se obtuvo una muestra de suero pre-inmune y se inmunizaron por vía subcutánea con 10 µg de proteína purificada de *A. baumannii* en combinación con adyuvante AddaVax (invivoGen, catálogo vac-adx-10) en una relación 1:1. A los 10 días, a los ratones se les aplicó una segunda inmunización con 10 µg de proteína diluida en solución de fosfatos (PBS), pero ahora sin adyuvante. Por último, al día 21 se tomaron muestras de sangre a los ratones y fueron procesadas para obtener el suero para su análisis posterior.

### **Evaluación de los sueros de los ratones control e inmunizados mediante la técnica de Western blot.**

Para poder evaluar los sueros, lo primero fue someter a electroforesis en geles de poliacrilamida las proteínas recombinantes y el lisado total de *A. baumannii*, posteriormente estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora 20 minutos a 100v. La membrana se bloqueó con leche al 10 % durante media hora para evitar uniones no específicas, al termino se dieron abundantes lavados con PBS 1X-Tween 0.05%. La membrana de nitrocelulosa se incubó durante toda la noche con los sueros pre-inmune o inmune de cada ratón, diluidos 1:200 con PBS-Tween con leche 5%. Al día siguientes se dieron exhaustivos lavados y se adicionó el anticuerpo secundario (Goat anti-Mouse IgG (H+L) en relación 1:5000 con PBS 1X- Tween 0.05%. Para observar si hubo seroconversión y reconocimiento de las proteínas recombinantes se adicionó el reactivo químico 1 y 2 relación 1:1 (LG Healthcare, catálogo RPN2108) a la membrana, cubriendo de la luz durante 1 min manteniendo en agitación para la dispersión total del reactivo en la membrana. Finalmente, la membrana se escaneó en el foto-documentador de quimioluminiscencia iBright CL1000 (Invitrogene) para visualizar las bandas de las proteínas.

### 3<sup>er</sup> Objetivo: Supervivencia de ratones desafiados con dosis letal

Para llevar a cabo este objetivo los ratones BALB/C de 5 semanas, que fueron inmunizados se les administró dos dosis de estreptozotocina con el fin de simular una patología como la diabetes. Para este fin se tomó lectura de glucosa en ayunas y posteriormente se administró la primera dosis de acuerdo al peso, partiendo de 75 mg/kg. La estreptozotocina fue diluida en buffer de citrato y administrado por vía intraperitoneal. Al tercer día se midió la glucosa y se administró otra dosis pero partiendo de 135 mg/kg y nuevamente se tomó la lectura de glucosa con ayuda del glucómetro OneTouch Ultra 2® a las 72 hora. De manera así que los ratones diabéticos serían aquellos que presentaron niveles de glucosa por arriba de 200 mg/dL. Una vez obtenido el resultado se aplicó una dosis letal de *Acinetobacter baumannii* vía intravenosa. Por último, los ratones fueron vigilados periódicamente (horas) para observar su mortandad o su supervivencia. De esta forma sabremos si los antígenos utilizados son capaces de producir anticuerpos o de neutralizar la infección. Para ello se evaluó la supervivencia mediante análisis estadístico de Kaplan-Meier. Los resultados obtenidos son representados en una gráfica por medio de una función escalonada (Fig. 5).

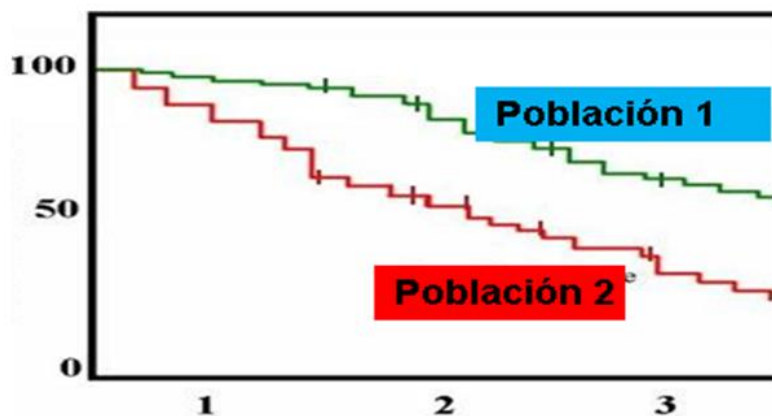
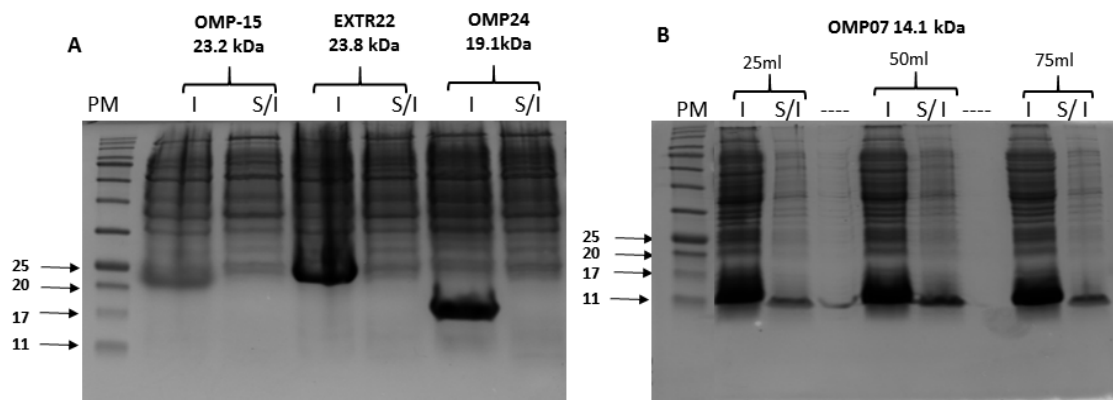


Fig. 5. Análisis estadístico de Kaplan-Meier.

## RESULTADOS

### Objetivo I. Obtención de los péptidos de membrana externa de *Acinetobacter baumannii*

Para estandarizar la inducción de la expresión de los péptidos de interés se realizaron varios cultivos bacterianos de las cepas BL21-A1 que contiene las distintas construcciones, para lo cual se modificó volumen de cultivo, tiempo de crecimiento y de inducción. De esta forma se pudo determinar que 3.5 horas de inducción era el tiempo adecuado para obtener una buena cantidad de proteína en volúmenes de 100 ml de medio de cultivo, para los péptidos OMP24, OMP15 y EXTR22 (Fig. 6-A). El péptido OMP07 no se indujo bajo las condiciones antes mencionadas, por lo tanto, se realizaron cultivos en matraces pequeños (100 ml) con volúmenes de 25, 50 y 75 ml de medio. Al analizar los 3 matraces con diferentes volúmenes se observó que la proteína se indujo adecuadamente en todos, en presencia del inductor (arabinosa) y en ausencia de éste se observó una banda similar al tamaño de la proteína de interés, posiblemente sea una proteína de *E. coli* (Fig. 6-B). Después de haber identificado que nuestras proteínas se indujeron en gran cantidad se procedió a purificarlas por cromatografía de afinidad.



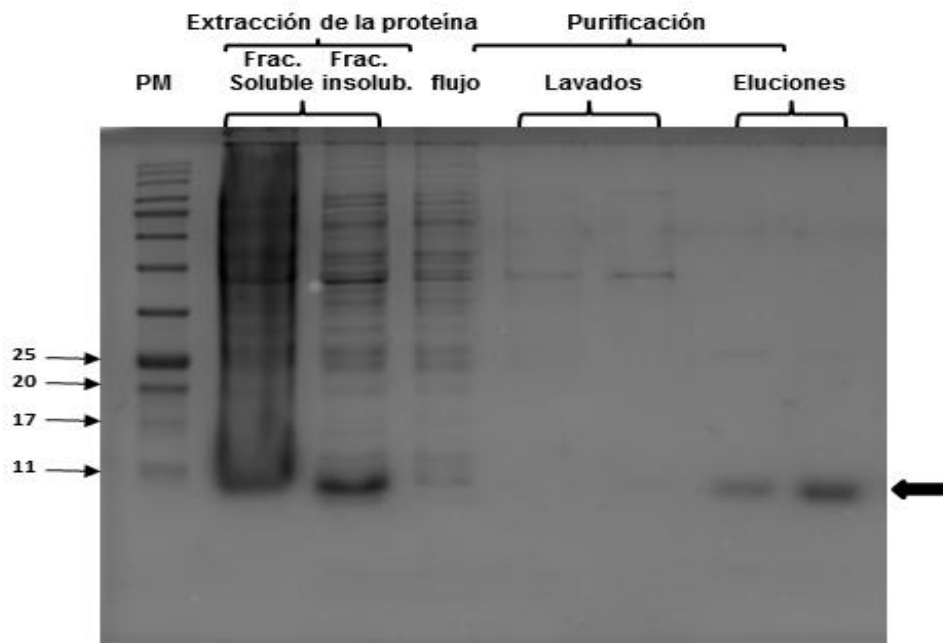
**Fig. 6. Expresión de los antígenos de membrana de *Acinetobacter baumannii*.**

En la figura A se observa la expresión de las diferentes proteínas OMP24, EXTR22 OMP15 en extracto crudo de bacterias sin inducir e inducidas con arabinosa. Las proteínas de interés muestran un movimiento electroforético similar al peso molecular esperado, excepto la OMP07 (figura B) que se observa con un peso molecular relativo de 11 kDa de acuerdo a los marcadores de peso molecular (AccuRuler RGB, cat 02102-250, Maestro gen). Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% y se visualizaron por tinción con azul de coomassie.

## Purificación

Inicialmente, a partir de un concentrado celular, obtenido de cultivos bacterianos que expresan los distintos péptidos de *A. baumannii* se realizó una sonicación para el rompimiento de la célula y liberación de las proteínas. La purificación de los péptidos se realizó por cromatografía de afinidad utilizando un equipo de cromatografía líquida de proteínas (AKTA FPLC de la marca GE) en conjunto con columnas HiTrap HP (GE).

La purificación de las proteínas se realizó de acuerdo a la instrucciones del manual "The QIAexpression and purification of 6xhis tagget proteins" de QIAGEN. La extracción y purificación de las proteínas inicialmente se realizó bajo condiciones desnaturizantes, por lo que en éste protocolo se utilizaron soluciones de unión, lavado y elución que contiene 8 M de urea. Mediante éste procedimiento la proteína OMP07 se purificó con gran eficacia, aunque el peso molecular observado fue menor al esperado de 14.1 kDa como se muestra en la Figura 7.

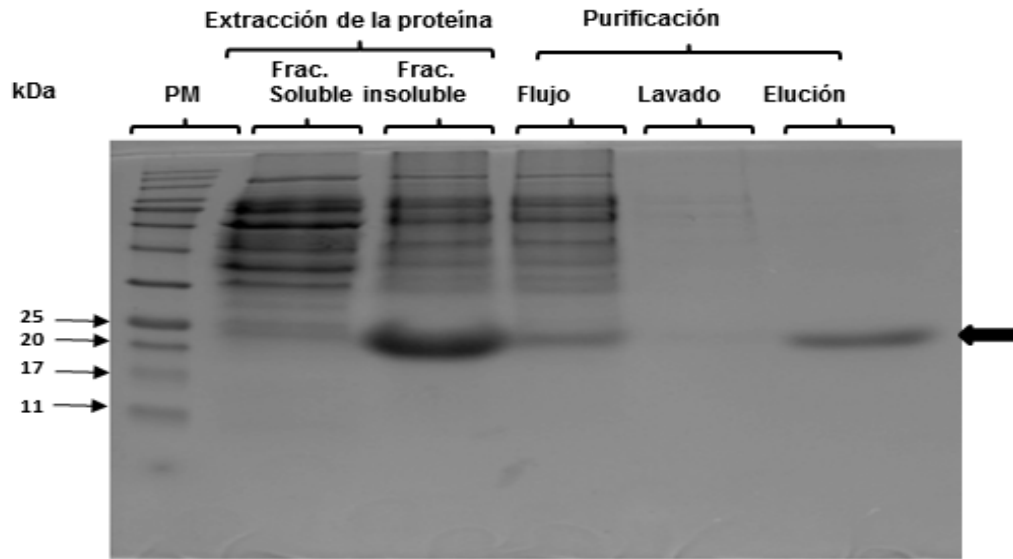


**Fig. 7. Purificación de la proteína OMP07**

En la figura se observan las diferentes fracciones del proceso de purificación, en el carril 7 y 8 son las eluciones de la proteína ya purificada, se obtuvo con alto grado de pureza y concentraciones altas. Las muestras fueron analizadas con la técnica SDS-PAGE y teñido con azul de comassie.

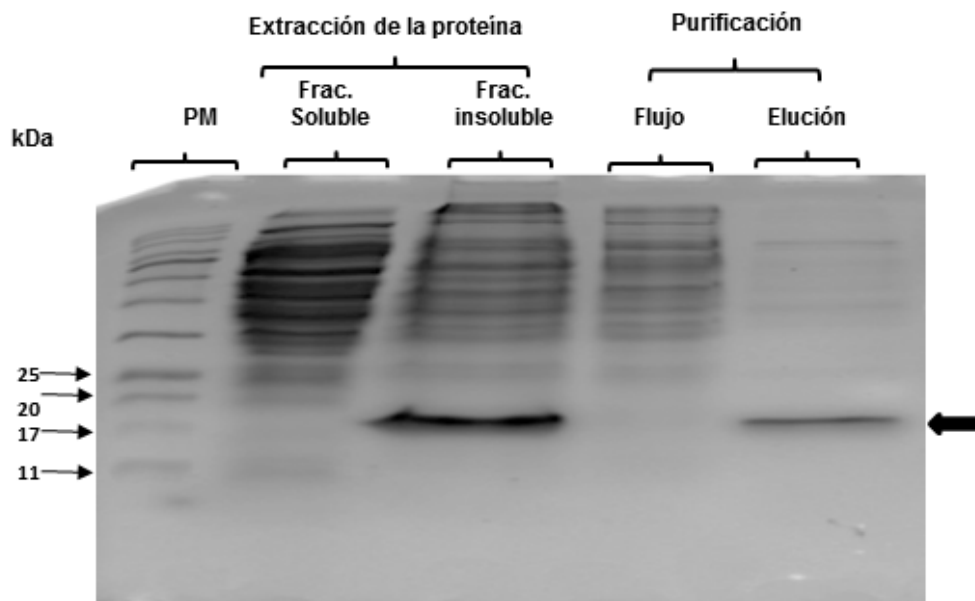
Sin embargo, para la inmunización de ratones fue necesario pasar las proteínas a un buffer de sales de fosfato (PBS). Desafortunadamente cuando se realizó éste procedimiento se perdió gran parte de la muestra y en ocasiones se precipitó (datos no mostrados). Las fracciones no precipitadas totalmente se sometieron a pruebas de digestión con el factor XA para retirar las histidinas de la proteína OMP07 (Fig. 13).

Debido a la pérdida de muestra, se tomó otra alternativa para purificar las proteínas donde se utilizó un protocolo híbrido obtenido del manual *Ni-NTA Purification; System For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins*. En este procedimiento las proteínas purificadas se obtienen de manera nativa y para ello se utilizan tapones que contienen urea tanto para la solución de unión a la resina como el lavado de la columna: seguido de dos tapones más que contienen imidazol (buffer de lavado, imidazol a baja concentración) y el segundo para eluir la proteína con una alta concentración de imidazol. Este último tapón permite desprender la proteína de la columna y recuperarla en su estado nativo. Cabe señalar que este procedimiento hace énfasis en el uso de cloruro de guanidina para lisar las células, sin embargo, se observó al correr las fracciones colectadas de las 4 purificaciones en geles de poliacrilamida se observó, que el cloruro de guanidina interfiere en el movimiento electroforético de las proteínas purificadas. También se observó que había proteínas contaminantes (datos no mostrados). Además, el buffer de lavado que se utilizó ocasionó que las proteínas se desprendieron de la columna propiciado posiblemente por el pH de la solución. Por lo tanto, se descartó el uso del buffer de lavado (8 M urea pH 6.0) y de lisis (cloruro de guanidina). En lugar de este último se utilizó urea para lisar, el procedimiento de purificación que se obtuvo después de varios ensayos (ver anexo II) mejoró considerablemente nuestros resultados, puesto que las proteínas la OMP15 (Fig.8) y OMP24 (Fig.9) se obtuvieron en buena cantidad y pureza.



**Fig. 8. Purificación de la proteína OMP15**

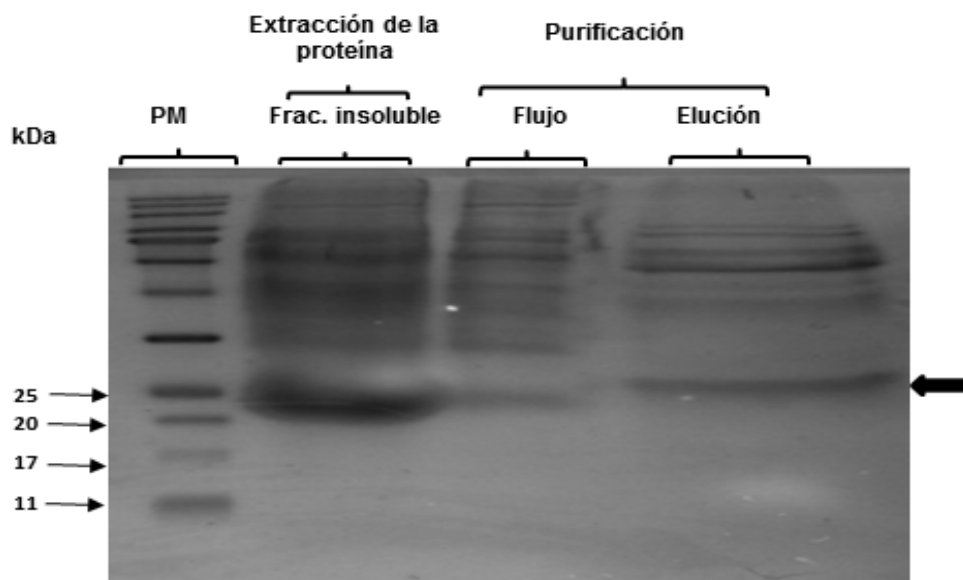
En la figura se observan las diferentes fracciones colectadas durante el proceso de purificación, se puede ver la proteína purificada en el carril 6 con el peso molecular de 23.2 kDa. Además se obtuvo con alto grado de pureza recuperando mas de 2 miligramos de proteína total de un cultivo bacteriano de 200ml. Las muestras fueron analizadas con la técnica SDS-PAGE.



**Fig. 9. Purificación de la proteína OMP24**

En la figura se observa la elución de la proteína purificada que dio el peso esperado de 19.1 kDa, sin embargo la purificación fue parcial ya que presentan patrones de proteínas en la parte superior que no corresponden al peso molecular esperado, a pesar de que la proteína no se purificó completamente se recuperó aprox. 1.5 mg totales de un cultivo de 200 ml. se analizaron las fracciones en gel de poliacrilamida al 14% teñido con azul de comassie.

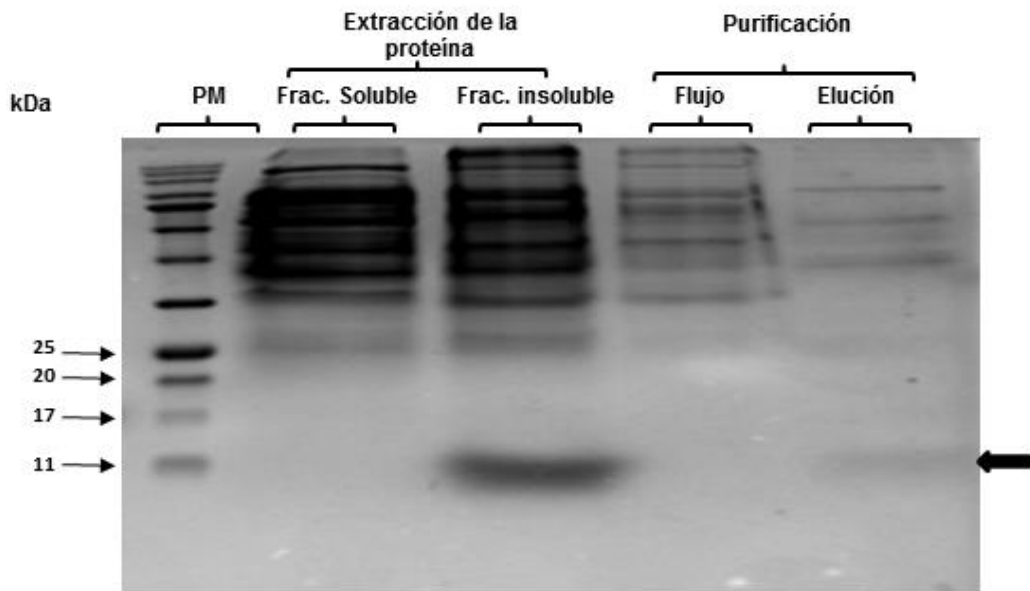
En cuanto a las proteínas EXTR22 (Fig.10) y OMP07 (Fig.11) lamentablemente no se obtuvieron los mismos resultados ya que se purificaron en bajas concentraciones junto con otras proteínas contaminantes de *E. coli*. Para obtener mejores resultados estas 2 proteínas se requiere modificar aún más el procedimiento de purificación, sin embargo, por cuestiones de tiempo éste proceso ya no se logró para realizar en éste trabajo tesis.



**Fig. 10. Purificación de la proteína EXTR22**

El figura en el carril 4 se encuentra la fracción purificada o elución de la proteína EXTR22, observamos una banda correspondiente al peso esperado de 23.8 kDa, sin embargo en la parte superior vemos otras proteínas, se realizó un Western blot para ver si las proteínas son reconocidas con el anticuerpo anti-histidinas, en base al resultado se deducirá si es viable para inmunizar. La muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 14 % teñido con azul de comassie.



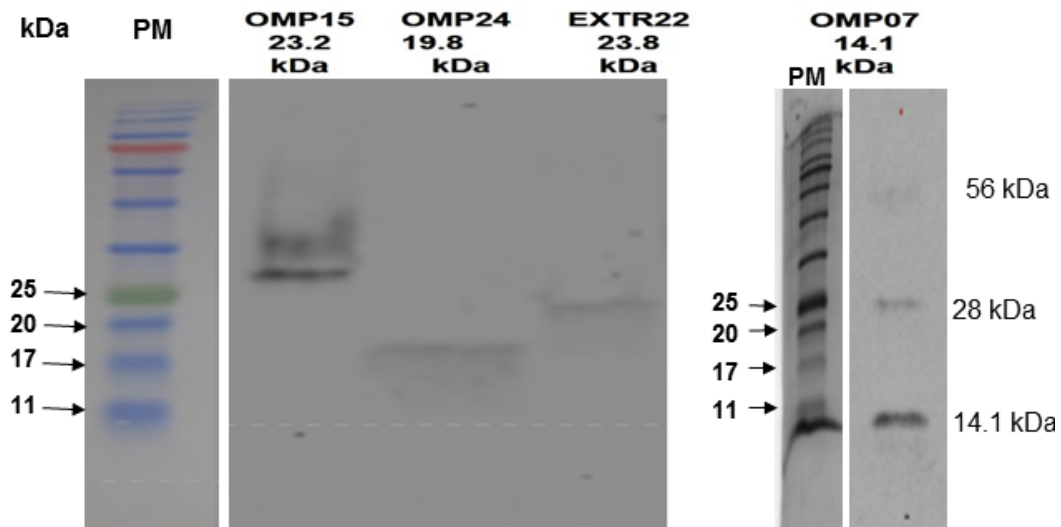


**Fig. 11. Purificación de la proteína OMP07.**

Esta proteína presenta un peso molecular de 14.1 kDa al analizar el resultado observamos una banda con el peso esperado, pero también un patrón de bandas de mayor tamaño aunque no se obtuvo una concentración suficiente, se realizó un Western blot y ver si todas las bandas presentes son reconocidas por el anticuerpo anti-hist. así posteriormente determinar su uso. Las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 14 % teñido con azul de comassie.

## Western blot para identificar las proteínas recombinantes de *A. baumannii*

Al finalizar la purificación de las proteínas se realizó un Western blot para ser identificadas y determinar que son nuestros péptidos de interés (Anexo IV). Como podemos observar todas las proteínas fueron reconocidas a través de la cola de histidinas por el anticuerpo (Anti-histidina). En todos los casos se observó la banda con el mismo peso molecular que presentaron las proteínas purificadas cuando se corrieron en los geles de poliacrilamida; excepto en la muestra de la proteína OMP07, donde se observó otra banda de 28 kDa y otra de 56 kDa. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos la proteína OMP07 tiene un peso molecular de 14.1 kDa, por lo tanto, las proteínas de 28 y 56 kDa detectadas en el western blot podrán ser dímeros y tetrameros que se formaron al momento de purificar la proteína. (Fig. 12).



**Fig. 12. Western blot.**

En la figura se observa el resultado del Western blot de las diferentes proteínas purificadas, para reconocer la etiqueta de histidinas presentes en las proteínas se utilizó el Anticuerpo Anti-His, así al agregar el revelador químico a la membrana las proteínas marcadas con esta etiqueta emitirán bandas de color negro al ser escaneadas el documentador iBright CL1000.

## Digestión

Después de haber purificado las proteínas se trataron con la proteasa Factor XA para remover las histidinas de nuestra proteína y evitar que altere su conformación o que se produzcan anticuerpos contra éste segmento. Por ello, el factor XA reconoce con un alto grado de especificidad y corta cualquier enlace peptídico después de la arginina en la secuencia de aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg. Este segmento está insertado entre las histidinas y las proteínas de interés, de manera que después de la digestión con el Factor XA, los péptidos se separan de las histidinas. Previo a la digestión, las soluciones peptídicas se sometieron a una diálisis para diluir las altas concentraciones de sales que contiene la solución de elución.

Desafortunadamente, parte de la proteína se precipitó, aun así se hicieron pruebas de digestión a diferentes tiempos (2, 4 y 8 horas) de incubación con 50 µg de proteína en una relación 1:100 con Factor XA, a una temperatura de 25°C en agitación, se esperaba observar dos fragmentos que corresponderían a la proteína de interés con un peso molecular de 12.2 kDa (sin histidinas) y otro de 1.9 kDa que correspondería a las histidinas. Después de haber realizado diferentes pruebas se determinó que la digestión no estaba funcionando, la proteína OMP07 aún contenía la cola de histidinas ya que no se observaron las dos bandas esperadas con distinto peso molecular (Fig. 13). Posiblemente haya sido a que la proteína se precipitó. Después de analizar la situación y determinar que nuestro objetivo final es generar una respuesta inmune protectora en ratones desafiados con una dosis letal de *A. baumannii* se decidió inmunizar los ratones usando la proteína con las histidinas.



**Fig.13. Digestión de la proteína OMP07**

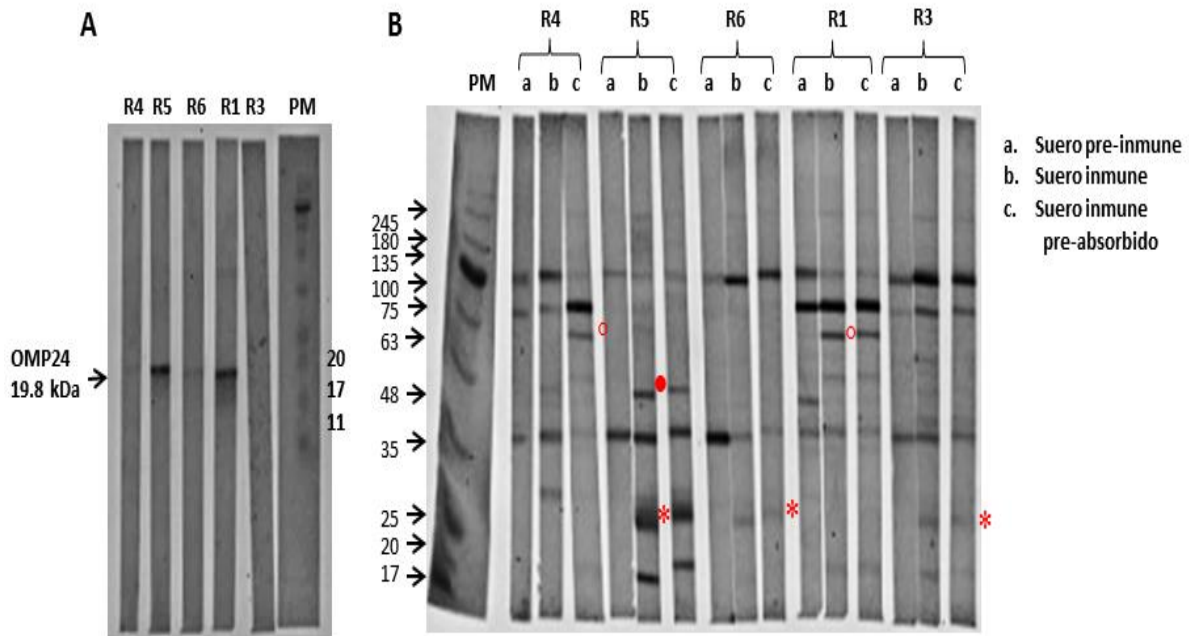
Después de la incubación con la proteasa factor Xa sometió a electroforesis en capilar en Bioanalyzer 2000, en este equipo se obtiene una mejor precisión de los datos en comparación con los técnicas convencionales, sin embargo los dos fragmentos con distinto peso que se esperaban (señaladas en la imagen) no fueron detectadas en ninguna de los diferentes tiempos de digestión.

## **Objetivo 2. Evaluación de la seroconversión de ratones BALB/c inmunizados con antígenos de *A. baumannii*.**

Para evaluar la seroconversión se inmunizaron ratones BALB/c por vía subcutánea con 10 microgramos de proteína diluida con adyuvante Adda Vax en una relación 1:1 en volumen total de 100 microlitros. Estos ratones recibieron una segunda inmunización con 10 microgramos de proteína (sin adyuvante) a los 10 días de la primera dosis y fueron sangrados a los 21 días (después de la primera inmunización) para obtener el suero inmune. En esta parte del trabajo se tomaron en consideración las proteínas con las que se contaba, siendo estas la OMP15 (Fig. 8), y la OMP24 (Fig. 9). Es necesario mencionar que la proteína OMP24 no se purificó completamente, sin embargo, dicha muestra contenía la proteína de interés en mayor cantidad. Se inmunizaron grupos de 5 ratones con cada una de las proteínas en mención, mientras que el grupo control solo fue “inmunizado” con PBS pH 7.4. Los sueros obtenidos de los fueron evaluados por la técnica de Western blot. Para este fin, los sueros se incubaron con extracto total de proteínas de *A. baumannii* (cepa 15308, ATCC) para buscar la presencia de bandas que nos indicaran que hay seroconversión de los sueros o presencia de anticuerpos contra las proteínas que fueron empleadas en las inmunizaciones (OMP15 Y OMP24).

Para realizar esto se corrieron geles preparativos de poliacrilamida al 10% con 1 mg de proteína de *A. baumannii* o 15 microgramos de proteína recombinante OMP24. Las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa por 1 hora y 20 minutos a 100 volts después se bloqueó con leche al 5% en buffer de fosfatos con Tween al 0.05% (PBS-T). Posteriormente, se cortaron tiras de 4mm de ancho de la membrana transferida y se incubaron con los sueros de los ratones que fueron inmunizados con la proteína OMP24 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas se lavaron con PBS-T 0.05% y después se incubaron por 2 horas con el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (conjugado con peroxidasa). La membrana se lavó de manera exhaustiva con PBS-T 0.05%, se reveló con el sustrato quimioluminiscente (LG Health Care, cat. RPN2108) y fue escanea en el foto-documentador (iBright CL1000, Invitrogene) para ser analizada.

Los resultados mostraron que sólo 4 ratones (R3, R4, R5 y R6) que fueron inmunizados con la proteína recombinante OMP24 produjeron anticuerpos que reconoce a ésta molécula de 19.8 kDa (Fig. 14 A), aunque sólo R1 y R5 lo hicieron con mayor intensidad.



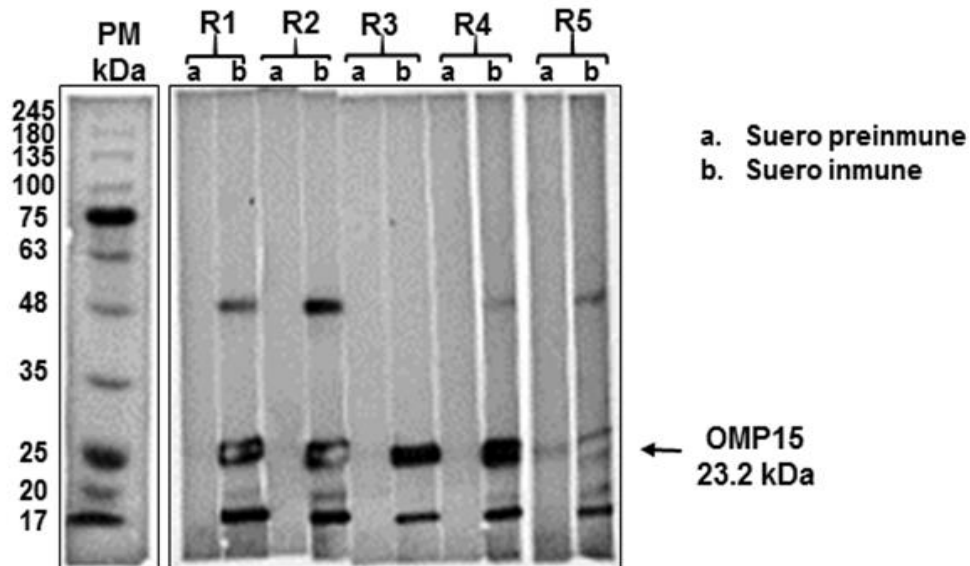
**Fig. 14. Evaluación de la seroconversión de ratones inmunizados con el péptido OMP24.**

Mediante la técnica de Western blot se determinó que los sueros de 4 ratones (R1, R4, R5 y R6) reconocen la proteína recombinante OMP24 con menor o mayor intensidad (A). En el extracto total de proteínas de *Acinetobacter baumannii* (B) el suero inmune del ratón 1 y 4 reconocen una banda específica con un peso molecular aproximado de 60 kDa (°), el suero del ratón 5 detecta una banda de 40 kDa (•), y al igual que el ratón 6 también reconoce una banda 25 kDa(\*)

Cuando se probaron estos sueros con el extracto total de proteínas de *A. baumannii*, el suero de los ratones R1 y R4 reconocieron una proteína con un peso molecular aproximado de 60 kDa que no se observó en la membrana incubada con el suero preinmune (Fig. 14 B). El suero del R5 detectó una banda de 40 kDa fue y otra de 25 kDa, ésta última proteína también fue reconocida por los sueros de los ratones R5 en mayor o menor intensidad (R3, R6) (Fig. 14 B).

Estos sueros reconocen otras proteínas de manera inespecífica que se observan en el suero pre-inmune e inmune (fig. 14 B). Como se mencionó anteriormente, la proteína OMP24 no se obtuvo completamente pura (fig. 9) y tal vez los ratones podrían estar produciendo anticuerpos contra estas proteínas de la cepa de *E. coli* BL21-A1 que podrían tener cierta homología con *A. baumannii*. Para evitar que suceda esto, los sueros fueron pre-absorbidos por 2 horas con lisados proteicos de BL21-A1 (transferidas a membrana de nitrocelulosa) sin transformar para tratar de quitar los anticuerpos inespecíficos y después se incubaron con las tiras que contienen las proteínas de *A. baumannii*. Los resultados demostraron que los sueros pre-absorbidos identificaron las mismas proteínas de 60 y 25 kDa que fueron detectadas con los sueros sin pre-absorber, sin embargo, también reconocieron las mismas bandas inespecíficas (Fig. 14 B).

El análisis de los sueros por Western blot nos permite concluir que OMP24 recombinante induce la producción de anticuerpos en estos ratones inmunizados con ésta proteína (Fig. 14A). En los extractos proteicos de *A. baumannii* estos sueros reconocieron una u otra proteína con un peso molecular aproximado de 45 y 60 kDa que no fueron identificadas por los sueros pre inmunes. El fragmento peptídico de OMP24 utilizado para inmunizar los ratones es de un peso molecular de 19.8 kDa. Sin embargo, el tamaño de la proteína completa en *A. baumannii* es de 27.7 kDa (Tabla 1). De acuerdo al peso molecular, la proteína de 25 kDa identificada por western blot tal vez sea la proteína de donde se obtuvo OMP24. Las bandas observadas de 40 y 60 kDa quizá sea la proteína de interés que está formando complejo con otras proteínas, agregados que no se lograron disociar por estas técnicas de extracción y electroforesis.



**Fig. 15. Identificación de la proteína recombinante OMP15**

Los resultados obtenidos se observó que los ratones R1, R2, R3 y R4 inmunizados se encontró que hay producción de anticuerpos que reconocen la proteína OMP15 obteniendo una banda del peso molecular esperado. Además se observa una banda intensa de 48 kDa en los sueros inmunizados R1-b y R2-b y en R4-b y R5-b con menor intensidad y mientras que R3-b no esta presente.

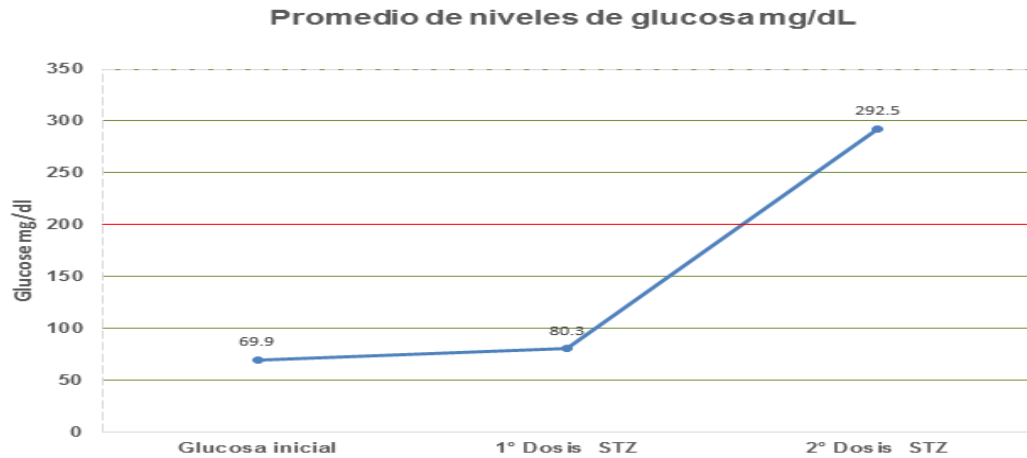
En el Western blot para detectar anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados con la proteína OMP15 únicamente R1, R2, R3 y R4 reconocieron a dicha proteína. (Fig. 15). Por lo anterior, podemos concluir que los ratones inmunizados si desarrollaron anticuerpos contra ésta proteína. Estos sueros no fueron evaluados con el extracto total de proteínas de *A. baumannii* ya que lo primordial consistía en desarrollar inmunoprotección en estos ratones que fueron desafiados con una dosis letal de esta bacteria.



### **Objetivo 3. Evaluación de la sobrevivencia de ratones diabéticos previamente inmunizados y desafiados posteriormente con una dosis letal**

#### **Diabetización de ratones**

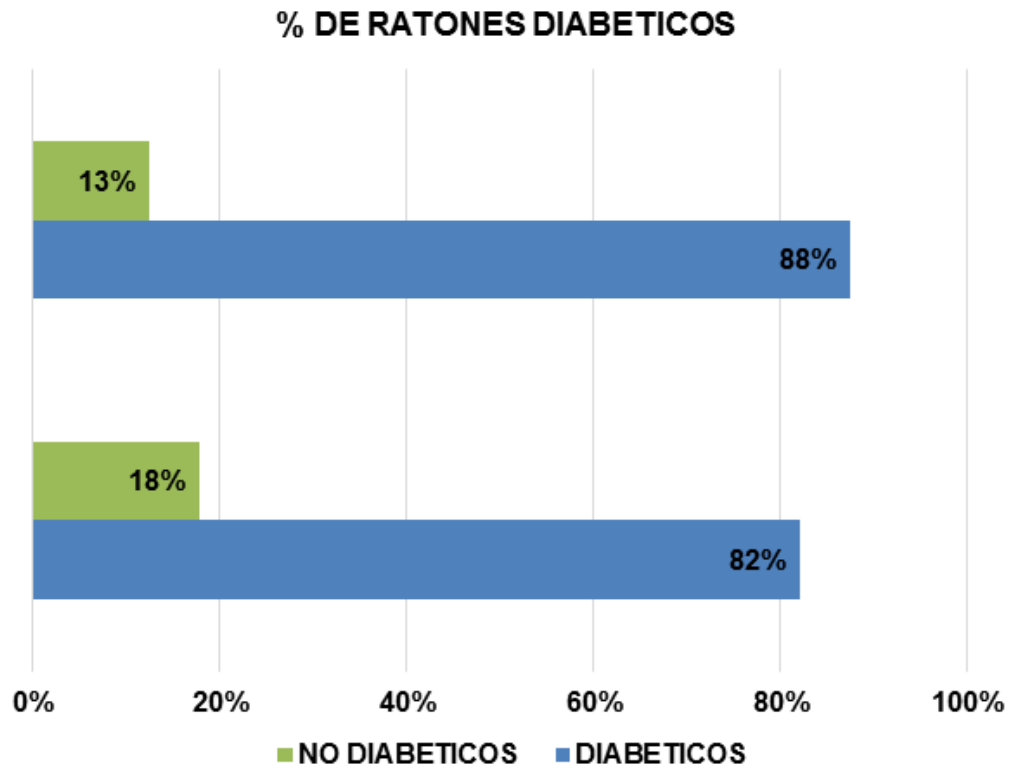
Al finalizar la inmunización de ratones BALB-C con el antígeno OMP24 y OMP15 se procedió a inducirles diabetes con estreptozotocina (STZ). La diabetización de los ratones es una condición necesaria para facilitar su infección con *A. baumannii*. La STZ es captada por las células  $\beta$  del páncreas a través del transportador GLUT 2, donde causa la muerte de las células  $\beta$  debido a la metilación o alquilación del DNA, y por consecuencia la fragmentación del material genético, llevando a una necrosis celular. (Eleazu y col. 2013). La estreptozotocina fue diluida en buffer de citrato (0.1 M de citrato de sodio, 0.1 M ácido cítrico, pH 4.5 a 4 °C) y se administraron dos dosis, la primera inoculación fue de 75 mg/kg, la segunda dosis fue 135 mg/kg y se aplicó a las 72 horas. Antes de cada inoculación y después de 72 horas de haber aplicado la segunda dosis se midió la glucosa en ayunas con el glucómetro OneTouch Ultra 2®. Los niveles de glucosa de los ratones antes de ser diabetizados abarcó un rango de 50 a 85 mg/dl y se consideró como ratón diabético aquellos que dieron niveles por arriba de 200 mg/dl (Damasceno y col., 2014) (Fig. 16). Los ratones que dieron lecturas abajo de estos niveles (150 – 190 mg/dl) no se consideraron como diabéticos debido a que con el paso de los días muchos de ellos lograban recuperar sus niveles normales de glucosa, por lo tanto, no fueron utilizados para nuestros experimentos.



**Fig. 16. niveles promedio de glucosa en ratones .**

En la grafica muestra las lecturas de los niveles de glucosa de los ratones que fueron administradas con dos dosis de STZ, observamos la primera lectura como glucosa inicial con promedio de 69.9 mg/dl, posteriormente a las 72 horas de inocular la primera dosis de STZ la glucosa oscilo sobre los 80.3 mg/dl y finalmente la última dosis a las 72 horas la esta oscilaba en los 292.5mg/dl como promedio.

El porcentaje de los ratones que fueron diabetizados con dos dosis de STZ arrojó que más del 80% de ratones desarrollaron la enfermedad a las 96 horas con un aumento de glucosa hasta por arriba de los 400 mg/dl y menos del 20% mantuvieron una hiperglucemia alrededor de los 170 mg/dl o menor (Fig.17).



**Fig. 17 Porcentaje de ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina.**

Los grupos de ratones fueron inducidos a diabéticos con STZ. Como se observa en la gráfica mas del 80% de los ratones de cada grupo tratados con STZ desarrollaron la enfermedad al séptimo día. Dónde la glucosa oscilo por arriba de 200 mg/dL.

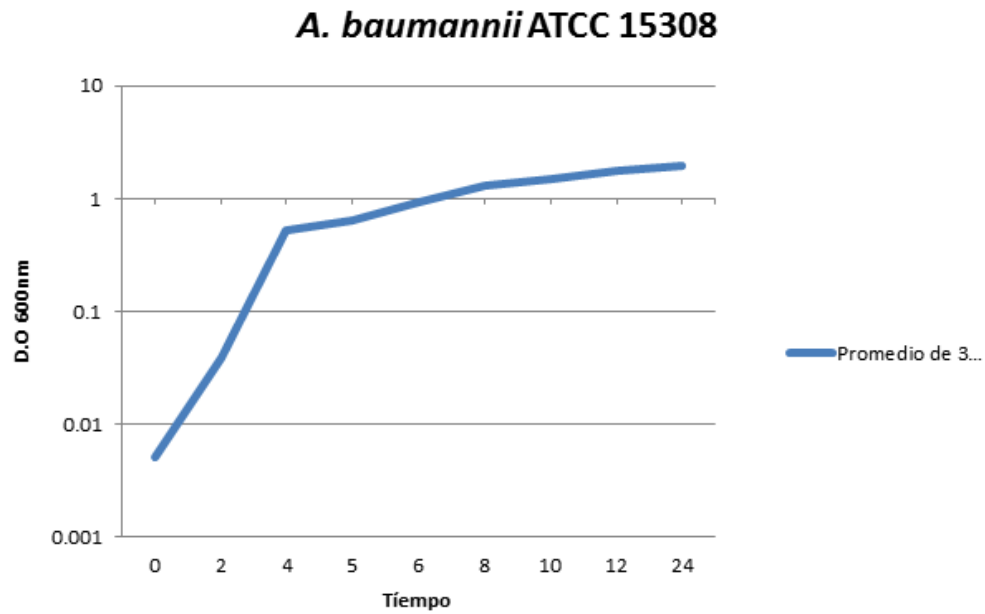
## Dosis letal

Para determinar la dosis letal previamente se realizaron curvas de crecimiento de *A. baumannii* con la cepa ATCC 15308 (American Type Culture Collection) crecidas en medio de cultivo TSB (caldo Triptona-Soja) y se hicieron lecturas de su absorbancia cada 2 horas a una densidad óptica de 600 nm para encontrar su fase de crecimiento logarítmico. Posteriormente se determinó el número de bacterias o unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro mediante diluciones seriadas 1:10. En cada dilución se sembraron 100 microlitros en placas de TSA (Agar tripticasa soja) por triplicado. Utilizando el promedio del conteo de colonias de las 3 placas se aplicó la siguiente fórmula para determinar el número de UFC

$$\text{UFC/ml o UFC/g} = \frac{\text{(colonias por placa) (factor de dilución)}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

Para nuestros cultivos se encontró que el mejor tiempo de cosecha fue de 3 ½ horas de crecimiento (Fig. 18) y se contabilizaron las UFC/ml para saber el volumen de la dosis requerida.

Para nuestros experimentos primero se determinó la dosis letal en ratones diabéticos. Grupos de 6 ratones fueron inoculados vía intravenosa y cada grupo fue inoculado con diferente número de UFC. Los ensayos demostraron que con una dosis de 1.60E+09 UFC de *A. baumannii* se murieron todos los ratones en 48 horas aproximadamente. En dosis más bajas los ratones enfermaron pero no murieron.



**Fig. 18. Curva de crecimiento de *Acinetobacter baumannii* ATCC15308**

Se realizaron curvas de crecimiento para monitorear el crecimiento de *Acinetobacter baumannii* durante 24 horas, para obtener el tiempo de fase exponencial y poder determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) para el reto letal. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro 600nm, se tomaron lecturas cada 2 horas.

## **Análisis sobrevivencia de los ratones retados con dosis letal de *A. baumannii***

De acuerdo a lo anterior, nosotros utilizamos una dosis letal de  $1.60E+09$  UFC de *A. baumannii* para nuestros experimentos de sobrevivencia bajo las condiciones arriba descritas. Después de aplicar la dosis letal de *A. baumannii* se les dio seguimiento por las próximas 72 horas. Para realizar nuestro análisis de supervivencia se tomaron en cuenta dos variables: el tiempo de seguimiento de los ratones y el desarrollo de la enfermedad o el evento esperado, para ello se utilizó el método estadístico Kaplan-Meier. Este método calcula la proporción acumulada de sobrevivencia durante el tiempo que dura un evento, y da proporciones exactas de supervivencia. (San jose y col. 2009). En los resultados de éste experimento se observó el 100% decesos en ratones inmunizados con la OMP15, sin embargo, el 60% del grupo no inmunizado sobrevivió al reto letal. En cuanto a los ratones inmunizados con OMP24 se observó el mismo porcentaje de mortandad que el grupo control y su muerte ocurrió en menor tiempo (horas) en comparación a los ratones no inmunizados y desafiados con *Acinetobacter baumannii*.

Los resultados de estos experimentos demostraron que la inmunización de los ratones con OMP24 o OMP15 desarrollaron una respuesta de anticuerpos contra *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, no protegió a los ratones cuando fueron desafiados con una dosis letal de esta bacteria. Es preciso señalar que durante la inoculación bacteriana se presentaron algunas fallas como la pérdida de pequeños volúmenes de bacteria. Esto se debió a pequeños errores al momento de aplicar la bacteria vía intravenosa (vena del ratón son muy pequeñas, agresividad de los animales y la falta de más practica durante el manejo de los ratones), por lo tanto, se debe mejorar el procedimiento de inoculación o considerar la posibilidad de aplicar el inóculo vía intraperitoneal.

## Proporciones de sobrevivencia

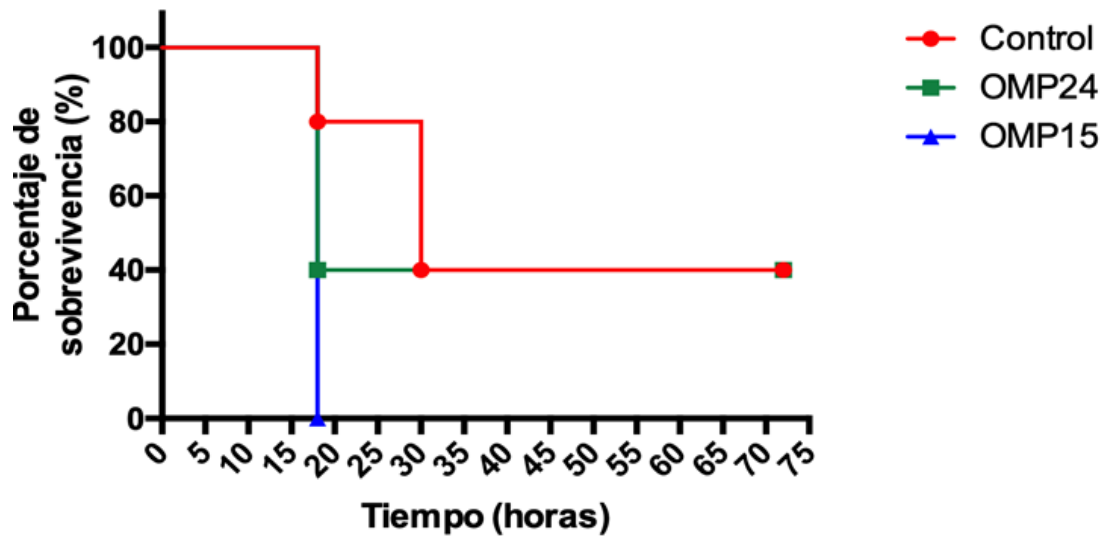


Fig.19 Curva de sobrevivencia de los ratones retados con dosis de  $1.60E+09$  UFC de *Acinetobacter baumannii*. En el grupo control (rojo) murieron entre las 18 y 30 horas el porcentaje de sobrevivencia representó un 40%, por otra parte los ratones inmunizados con la proteína OMP24 (verde) se obtuvo el mismo resultado que el grupo control, mientras que todos los ratones inmunizados con la proteína OMP15 (azul) murieron a las 18 horas aproximadamente, para cada uno de los grupos fueron de 5 organismos. La comparación de las curvas de sobrevivencia se realizó con el software Prism 6.

## DISCUSIÓN

En éste trabajo fueron producidos y purificados diferentes péptidos recombinantes de *A. baumannii* para evaluar su capacidad para generar una respuesta inmune-protectora en ratones. Estos péptidos OMP24, OMP07, OMP15 Y EXTR22 de *A. baumannii*, fueron purificados por cromatografía de afinidad. Mediante éste método se pueden purificar proteínas que contienen alguna etiqueta molecular como: HIS (Histidinas), GST (Glutathione S tranferasa) y FLAG (Epitope) que se unen a una matriz inmóvil en una columna. En este proyecto se utilizó una etiqueta de histidinas para optimizar la purificación de nuestras proteínas. En la literatura consultada se mencionan las ventajas de este sistema de purificación donde, rara vez afecta la actividad biológica o bioquímica de la proteína (Structural Genomics Consortium y col., 2008). Mediante éste método se obtuvieron 2 proteínas (OMP15 Y OMP24) con aceptable pureza y buena concentración (Fig. 8 y Fig. 9). Por otra parte, la proteína EXTR22 y OMP07 presentaron proteínas contaminantes (Fig.10 y Fig.11) y por ello no se utilizaron en nuestros experimentos. Las proteínas con pureza insuficiente, se atribuye a que contienen otras proteínas contaminantes que tienen múltiples residuos de histidina y/o que actúan como chaperonas moleculares que pueden unirse a la resina o a la proteína recombinante lo que resulta en una co-purificación (Structural Genomics Consortium y col., 2008).

En los experimentos tipo Western blot, la proteína OMP07 mostró un peso molecular por debajo de 14.1 kDa, sin embargo, también presentó 2 bandas de 28 y 56 kDa de peso molecular (Fig. 12). Esto quizá pudiera deberse a que muchas proteínas en su estado bioactivo (proporcionado por sus características físico-químicas) forman oligómeros y cuando estos son disociados las moléculas pierden su estructura. De esta manera, muchas proteínas pueden presentar un comportamiento electroforético anómalo y mostrar dos o más pesos moleculares correspondientes al oligómero en su estado nativo y a los polipéptidos disociados y desnaturalizados (Moreno 2010). Si bien las proteínas OMP07 Y EXTR22 no se purificaron adecuadamente por ésta técnica (Fig. 10 y 11), existen otros métodos



que se pueden aplicar para optimizar y obtener un mejor grado de pureza como se mencionan al inicio de este párrafo.

En este proyecto se tuvo que diabetizar a los ratones BALB/C debido a que es un factor de riesgo para la adquisición de la infección por *A. baumannii*, además imita complicaciones de la diabetes humana, debido a las similitudes de algunas anomalías estructurales, funcionales y bioquímicas con la enfermedad humana. El mecanismo de acción de la estreptozotocina es producir una necrosis, que lleva a la muerte celular de las células  $\beta$  del páncreas lo que conduce a un estado de diabetes tipo 1, STZ puede inducir la DM en la mayoría de las cepas de roedores, además la diabetes inducida por STZ puede ser variable, no existe un protocolo estándar para la preparación, dosis o administración.

Las dosis se clasifican en tres categorías: dosis pequeñas múltiples de STZ, dosis de tamaño moderado o una dosis grande del medicamento. La administración de dosis bajas de STZ se utiliza para producir diabetes mellitus leve dependiente de insulina (DMT1), la dosis de STZ moderada para inducir una DM lentamente progresiva y las dosis grandes pueden causar una destrucción de las células  $\beta$  y poca o ninguna producción de insulina. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos muestran que alrededor del 80 % de los ratones de la cepa BALB/C que fueron inoculados con 2 dosis (75 mg/kg y 135 mg/kg) de STZ por vía intraperitoneal desarrollaron diabetes al séptimo día, estos resultados fueron muy similares a los obtenidos en otros grupos de investigación (comunicación personal, Dr. Nahim Salgado Medrano, Departamento del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos). Entre los factores moleculares que intervienen para ayudar al organismo e impedir el desarrollo de la diabetes son los inhibidores de la poli ADP-ribosilación que suprimen el proceso de metilación del ADN y protege las células beta contra la acción tóxica de la estreptozotocina y previene el desarrollo de un estado diabético. (Lenzen, 2008 y Eleazu y col. 2013).

En estos experimentos pudimos observar que las proteínas OMP15 y OMP24 son capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos en ratones inmunizados (Fig. 14 y 15). Sin embargo, dichos anticuerpos no lograron

neutralizar la infección de *A. baumannii* cuando recibieron la dosis letal (Fig. 19). Contrariamente a lo esperado, el 40% de los ratones del grupo control (grupo no inmunizado) sobrevivió al desafío letal. Esto último se debió a la falta de habilidad para inocular al ratón por vía intravenosa (cola de ratón), lo que propició pequeñas pérdidas del inóculo. Por lo tanto, se requiere minimizar los errores en el momento de administrar el inóculo o utilizar la vía de inoculación intraperitoneal para tener un resultado más confiable.

En un estudio realizado con antígenos seleccionados de *Acinetobacter baumannii* se utilizaron diferentes concentraciones de antígenos que van de 5, 10, 20 y 50 µg en una sola dosis, donde el porcentaje de sobrevivencia fue de 0%, 33%, 33% y 100%, (Huang y col. 2016). Por lo anterior, en nuestros experimentos se podría realizar ensayos donde las concentraciones de la OMP15 y OMP24 sean más altas e incluso mezclar las 2 proteínas y observar si hay mejora en los resultados en comparación a nuestro primer experimento donde se administró 20µg de antígeno en dos inmunizaciones.

## CONCLUSIONES

En éste trabajo de tesis se logró purificar 2 péptidos recombinantes de *Acinetobacter baumannii*. Los resultados experimentales realizados en éste trabajo de tesis demostraron que las proteínas OMP24 y OMP15 son capaces de inducir la producción anticuerpos específicos en ratones BALB/C que fueron previamente inmunizados con 2 dosis de 20 µg de proteína (Fig. 14 y 15). Sin embargo, estos anticuerpos fueron incapaces de producir una respuesta inmune protectora en ratones desafiados con una dosis letal ( $1.60E+09$  UFC) de *Acinetobacter baumannii* (Fig. 19).

Las proteínas OMP07 y EXTR22 se produjeron en buena cantidad, sin embargo, no se logró purificarlas completamente o con grado de pureza aceptable (Fig. 10 y 11), por tal motivo, se requiere utilizar otras alternativas que permitan una mejor purificación para realizar los experimentos correspondientes. Por otra parte, el porcentaje de ratones diabetizados obtenido (80%) fue muy similar al reportado en otros grupos de investigación. Se requiere hacer experimentos donde se realicen inmunizaciones con la mezcla de 2 o más proteínas, mejorar el procedimiento de inoculación intravenosa o utilizar el método intraperitoneal.

## PERSPECTIVAS

- Para mejorar la pureza de las proteínas purificadas, particularmente de aquellas que presentan residuos contaminantes después de la cromatografía de afinidad, se pueden utilizar otras técnicas como: cromatografía por exclusión molecular o cromatografía por intercambio iónico.
- Realizar más ensayos con diferentes concentraciones de los antígenos para observar la producción de anticuerpos y el efecto protector mediante técnicas moleculares. Además realizar ensayos con otra cepa de ratones como C57BL/6 que no requieren previa sensibilización como los BALB/C que fueron inducidos a diabéticos y se espera que los resultados sean determinantes.
- Aquellos antígenos que se observen alta capacidad de respuesta inmunológica hacer combinaciones para obtener la protección total de los ratones durante el reto letal con *Acinetobacter baumannii*.

## ANEXOS

### **Anexo I. Inducción de proteínas recombinantes en *E. coli* con la cepa BL21-A1 TM (invitrogen).**

- Realizar un pre-cultivo de toda la noche de *E. coli* (cepa BL21-A1) que expresan las diferentes proteínas de interés en un volumen de 5 ml de medio LB en presencia de carbenicilina (100µg/ml) y glucosa 0.1%, incubando a 180 RPM a 37 °c.
- Al día siguiente se inocula 1 ml del pre-cultivo en 100 ml en medio LB, hasta alcanzar la densidad óptica de 0.4 nm (durante 3.30 a 4 horas).
- Una vez alcanzada la densidad, se inducirá la expresión de la proteína añadiendo L-arabinosa al 0.2% y se cultivan durante 4 horas en las condiciones antes mencionadas.
- Las células son cosechadas por centrifugación a 4,900 rpm por 30 minutos a 25 °c, posteriormente se guarda la fase insoluble a -20 °c hasta su uso.
- Nota: antes de centrifugar tomar 1 ml del cultivo, centrifugar y re-suspender las bacterias en 100 µl de PBS-SDS 1% y hervir por 5 minutos, se cuantifican las proteínas y se toman 400 µg, se agrega buffer de muestra y se corren en gel SDS-PAGE al 14% para observar la expresión de la proteína de interés

## **ANEXO II. Preparación de lisados de *E. coli* bajo condiciones desnaturalizantes**

- Las bacterias inducidas a expresión son re-suspendidas en 5 ml de buffer de lisis (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol, ajustar a pH 8.0 en frío)
- Añadir lisozima de gallina a una concentración de 1 mg/ml e incubar en hielo durante 30 min.
- Sonicar las bacterias por 30 seg. a 300 W con un periodo de enfriamiento de un minuto, repetir éste procedimiento por 6 ocasiones más.
- Centrifugar el lisado por 40 min a 5,000 RPM a 4 °c.
- Recuperar el sobrenadante y guardar a -20 para su análisis posterior. El sedimento celular es re-suspendido en 5 ml de buffer (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, ajustar pH a 5.9 con HCl). Incubar la muestra con agitación suave durante toda la noche a temperatura ambiente. La lisis se completa cuando la solución se vuelve translúcida.
- Centrifugar el lisado 7,300 RPM a temperatura ambiente durante 20 min. Se recupera el sobrenadante o extracto el cual contiene la proteína de interés que será purificará en un FPLC/AKTA. El sedimento se guarda para su análisis posterior.
- Se cuantifica la proteína del sobrenadante y los sedimentos guardados. Se toman 400 µg de proteína de cada fracción y se analizan por gel SDS-PAGE AL 14% para observar la recuperación de la proteína de interés.

### **Anexo III. Protocolo manual para la purificación de proteínas fusionadas a histidinas usando una columna “HiTrap HP” en el equipo FPLC/AKTA**

- Para la purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando equipo FPLC con columnas HiTrap HP que contienen una matriz de agarosa unidas con níquel. La proteína a purificar tiene una cola de 6 histidinas, estas se transfieren a la columna, donde habrá interacción del níquel e histidinas, quedando retenidas en la columna.
- Adicionar buffer de unión pH 7.8 con urea 8M desnaturizante, se añade 120 mL por la columna cargada con la proteína con finalidad de que las proteínas que no tenga la etiqueta fueran desechadas.
- Posteriormente se adiciono 25 mL buffer de lavado nativo con 10mM de Imidazol a pH 8.0, para optimizar la eliminación de proteínas que no tengan dicha interacción.
- Eluir con buffer de elución con 500mM de Imidazol a pH 8.0, recuperar la proteína en fracciones de 1mL. Para posteriormente analizarlas mediante electroforesis.

### **Anexo IV. Detección de proteínas purificadas mediante la técnica de Western blot**

- Las proteínas separadas por gel SDS-PAGE se transfieren en membrana de nitrocelulosa, durante 1 hora 20 min 100 volts (Towbin y col.)
- La membrana se tiñe con rojo de ponceau por 5 min para observar la transferencia de las proteínas a la membrana, después se retira el colorante con lavados con H<sub>2</sub>O destilada hasta remover el colorante.
- Bloquear durante 1 hora con leche al 5% en PBS Tween al 0.05% a 4 °c
- Lavar 3 veces con PBS Tween al 0.05%, durante 10 minutos en agitación cada lavado y lavar 1 vez más con solo PBS 1x pH 7.4 en frio durante 5 min.
- Adicionar el anticuerpo Anti-histidina conjugado con HRP, dilución 1:5000 en PBS-Tween 0.05% y dejar en agitación durante toda la noche a 4 °c.

- Al día siguiente lavar 3 veces con PBS Tween al 0.05% durante 10 minutos en agitación y lavar 1 vez más con solo PBS 1x pH 7.4 en frío durante 5 min.
- Para revelar se adiciona el reactivo químico 1 y 2 relación 1:1 (LG Healthcare, cat. RPN2108) a la membrana, cubriendo de la luz durante 1 min en agitación.
- Posteriormente se escanea la membrana en el foto-documentador iBright CL1000 (invitrogene) para visualizar las bandas de proteínas.

#### **Anexo V. Curva de crecimiento de *Acinetobacter baumannii* y determinación de dosis letal**

- Del ATCC 15308 de *Acinetobacter baumannii* guardado en glicerol a -70, se descongelo y rayar en placa con medio TSA, dejar crecer toda la noche a 37°C, al día siguiente rayar una segunda placa (partiendo de la primera) dejando en condiciones antes mencionadas, para poder obtener colonias viables.
- Posteriormente sembrar una colonia aislada en 3mL con TSB (pre-cultivo), dejar crecer durante 12 h a 37°C a 180 RPM.
- Al día siguiente en un matraz con 100mL de TSB inocular 100µL del pre cultivo, homogenizar y medir densidad óptica, tomando lecturas cada 2 h hasta las 12 h y una última lectura a las 24 horas, a 600nm con factor de corrección de 0.74 Esto para monitorear el crecimiento durante 12 horas.



**Estandarizada la curva de crecimiento se procede a realizar cultivos para la dosis letal.**

- Sembrar una colonia aislada de *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308 en 3ml con TSB (pre-cultivo), dejar crecer durante 12 horas aprox. a 37°C a 180 RPM.
- Al día siguiente en un matraz con 100ml de TSB inocular 100µL del pre cultivo (sin glucosa).
- Detener el crecimiento a la densidad óptica a 0.6 con una absorbancia de 0.4
- Alcanzada la densidad óptica centrifugar a 4°C a 4,950 RPM por 25 min en tubos falcon de 50 ml, al terminar retirar el medio (con pipeta, cuidando de no re-suspender el pellet)
- Lavar con 45 ml de PBS 1X pH 7.4 grado cultivo celular durante 3 veces. (antes de centrifugar re-suspender el pellet completamente en cada uno de los lavados, en condiciones antes mencionadas)
- Al finalizar los lavados recuperar el pellet y re-suspender en 1 mL de PBS y verter en un tubo eppendorf (5mL) y aforar a 2ml (stock).
- Del stock hacer diluciones relación 1 a 10 en eppendorf (5mL) agregando 1.8 mL de PBS 1X grado cultivo celular por 0.2 ml del stock, de 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>7</sup> (cada dilución se re-suspenderá completamente para hacer la siguiente dilución)
- Elaboradas las diluciones, platear con 50 µL de 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> en cajas Petri con medio TSA por triplicado incubando a 37 °c durante toda la noche.
- Finalmente hacer el conteo colonias en placa para obtener las unidades formadoras de colonia (UFC) con la fórmula:

$$\text{UFC/ml o UFC/g} = \frac{\text{colonias por placa} \times (\text{factor de dilución})}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

Esto para determinar el dato más aproximado de cuantas bacterias se administraron en la dosis.

## REFERENCIAS

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M., ... Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645-1658.

Arias-Flores, R., & Rosado-Quiab, U., & Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54 (1), 20-24.

Alós J. I. Resistencia Bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier. 2015; 33(10):692–699

Bentancor LV, Routray A, Bozkurt-Guzel C, Camacho-Peiro A, Pier GB, Maira-Litrán T. (2012). Evaluation of the Trimeric Autotransporter Ata, as a Vaccine Candidate against *Acinetobacter baumannii* Infections. *Infect Immun*. 80: 3381–3388.

Chiang, M. H., Sung, W. C., Lien, S. P., Chen, Y. Z., Lo, A. F., Huang, J. H., Kuo, S. C., & Chong, P. (2015). Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(4), 1065–1073.

Cuéllar Ponce de León, L. E. (2013). Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. *Revista Medica Herediana*, 24(2), 156-162.

Dirección General de Epidemiología/DGAE. Informe Anual de la RHOVE 2015.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual\\_rhove\\_2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf)

Damasceno, D. C., Netto, A. O., Iessi, I. L., Gallego, F. Q., Corvino, S. B., Dallaqua, B., ... & Rudge, M. V. C. (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed research international*, 2014.

Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 12 (1), 60.

Fattahian, Y., Rasooli, I., Mousavi Gargari, S. L., Rahbar, M. R., Darvish Alipour Astaneh, S., & Amani, J. (2011). Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microbial pathogenesis*, 51(6), 402–406.

Galván-Meléndez MF, Castañeda-Martínez LY, Galindo-Burciaga M, Morales-Castro ME. (2017). Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. *Rev. Esp Med Quir.* 22 (1):1-13.

Muñoz, J. G., Corona, A. M. R., Bustamante, M. E. M., Lorenzo, J. D. J. C., Gallegos, L. A., Franco, J. R. A., ... & Cuenca, J. A. S. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(2), 68-75

Huang, W., Yao, Y., Wang, S., Xia, Y., Yang, X., Long, Q., ... & Ma, Y. (2016). Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Monoclonal+antibodies+in+clinical+development&cntry=&state=&city=&dist>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/>

Luo, G., Lin, L., Ibrahim, A. S., Baquir, B., Pantapalangkoor, P., Bonomo, R. A., ... & Spellberg, B. (2012). Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-Acinetobacter baumannii infection. *PloS one*, 7(1), e29446

Restrepo, J. L., Ospina, I. C. M., & Jaramillo, F. L. O. (2016). Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*, 20(2), 77-83

Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226.

Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L.M., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 415-429.

Manual para la implementación de los paquetes de acciones para prevenir y vigilar las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) 2019. [http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/manual\\_IAAS.pdf](http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/manual_IAAS.pdf)

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.

Moriel, D. G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., ... & Serino, L. (2010). Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9072-9077.

Moriel, D. G., Beatson, S. A., Worpel, D. J., Lipman, J., Nimmo, G. R., Paterson, D. L., & Schembri, M. A. (2013). Identification of novel vaccine candidates against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 8(10), e77631.

Morfín-Otero, R., Alcántar-Curiel, M. D., Rocha, M. J., Alpuche-Aranda, C. M., Santos-Preciado, J. I., Gayosso-Vázquez, C., ... & Rodríguez-Noriega, E. (2013). *Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. *Chemotherapy*, 59(1), 57-65.

Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic resistance problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine*, 371(19), 1761-1763.

Oleksiewicz, M. B., Nagy, G., & Nagy, E. (2012). Anti-bacterial monoclonal antibodies: back to the future? *Archives of biochemistry and biophysics*, 526(2), 124–131

Organización Mundial de la Salud. Plan de Acción Mundial Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. 2015. No de pg.: 30. Idiomas: español, francés, inglés, ruso ISBN: 9789243509761.

Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M., ... & Rappuoli, R. (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287(5459), 1816-1820.

Pérez D. & Bustamant H. (2018). Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Revista de Divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. 36, pp3-5.

QIAGEN. El QIAexpresionista. Un manual para la expresión y purificación de alto nivel de proteínas marcadas con 6xHis. 15 ed. Australia: QIAGEN; 2003.

Rada Cuentas, Jaime. (2016). Acinetobacter un patógeno actual. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 55(1), 29-48

Rodríguez-Noriega, E., & León-Garnica, G., & Petersen-Morfín, S., & Pérez-Gómez, H., & González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. (2014). Biomédica. 34 (1), 181-190.

Rodríguez RD, Bustillo DE, Caicedo DC, Cadena DC, Castellanos C. Acinetobacter baumannii: patógeno Multirresistentes emergente. MÉD.UIS. 2016; 29(2):113-35

San José B., Pérez E., Madero R. (2009). Métodos estadísticos en estudios de supervivencia. Anales de Pediatría Continuada, Volume 7, Issue 1, Pages 55-59.

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., ... & Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. Nature methods, 5(2), 135-146.

Saavedra-Trujillo C. H., Arias-León G., Gualtero-Trujillo S. M., Leal A. L., Saavedra-Rojas S. Y. & Murcia M. I. (2016). Factores de riesgo para infección o colonización por Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos en pacientes adultos hospitalizados en Unidades de Cuidado Intensivo, Bogotá, Colombia. Infectio. 20(4) 238 ,249.

Scorza, F. B., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M. J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A. R., ... & Grandi, G. (2008). Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*  $\Delta$ tolR IHE3034 mutant. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(3), 473-485

The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. Mapa de resistencia: Mapa de resistencia: resistencia a los antibióticos. 2019.

Vanegas-Múnera JM., Roncancio-Villamil G., Jiménez-Quiceno JN. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28 (2), 233-246.

WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of new Antibiotics 2017. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)

WHO. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. 2016 [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/)

WHO. Resistencia a los antimicrobianos. 2018 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

Cuernavaca, Morelos a 16 de marzo de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **VICTOR MEDINA PASIÓN**, con el título del trabajo: **IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS CON CAPACIDAD PROTECTORA ANTE EL RETO LETAL CON *Acinetobacter baumannii* EN RATONES DIABETIZADOS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de **Titulación Profesional por Etapas** como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR FIRMA**

PRESIDENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

SECRETARIO: M. EN B. MARÍA LUISA CASTREJON GODINEZ

VOCAL: DR. HUMBERTO VALDOVINOS TORRES

SUPLENTE: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

SUPLENTE: DR. JUAN MAURICIO TELLEZ SOSA

Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Tel-fax: (777) 329 7047  
[www.uaem.mx/organizacion-institucional/unidades-academicas/facultades/ciencias-biologicas](http://www.uaem.mx/organizacion-institucional/unidades-academicas/facultades/ciencias-biologicas)



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**HUMBERTO VALDOVINOS TORRES | Fecha:2022-03-16 15:13:49 | Firmante**

HR+VqzrY2yQEWHGuz1nKF0g6hpfiegVesCraZ6/KYGb1amU6dyYnjmbeBmJxnP60peK5vAVwSSvCgv4fhAFMZUCSX9wouliXlxOXuQoKvUp1t2Y73BYi97gEz5Vf6bAECp+qmWplbePQwh3ZnKYpFpUZVmvC0T4/TtAyvPEqvN0ZM86S5d2Lo+YwuLQvp7REV18067uYnNcp1PRP3naNFEaK4sOJB01D1q8YUkPJ0Tm1zDI2Urod2YpDjHAGYw0e2yC6H/dGskh+EYdqHEq8LOM4wWUE3Im92oUrKt3xuiMyVj52OJNCzIkTeAjaUAZmL0rx+Tq2jRNYzFf0w4oXQ==

**CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2022-03-16 17:21:32 | Firmante**

UmfUjzkzUcKTCYZarZjd81AVgHzuXLf0hJc4SvmYRQITHoY0qLRXTk5gE3z4Z/ZoZtb7ENLle/+Ovk8dSVNL5lwsNqZAcaCgOHikvRTu3cGd9sPBjd5y73TSL+sqp+oNRTLNM+wfUoSWauVTL7UhhdfGrZFawP9caTqC6jMwHNFZ1m0lwXNsXUFNFgpfV0TcLOFTMKoCXQxhm6CasDgtQLjHB+aW+Ucp0FstxkvXnVOauriBCtntLPfDZG5Zl/9NWZvTVO4JINyFgm11bBwLr/nmTZojleGHSXL1A7UR55t5+64KHrt425h/Diqva9tfY/XNR0dx1OUWBS+JpO9g==

**MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-03-16 18:32:53 | Firmante**

OU+X0TfscRFEGLE98yoRVELgWiN83ec+uL4in24W8KGPiBEeKmp50gg2mLRglU6i9eKICx+y8Tvd8LDozyHbww4A5qKvoWFR1758+9TGO4v61dhy7exiLveW8LK+tse67HfiNBTFYDxXYJEGC2VsJPgRN7eskX75m6hCdkFWfpWm+qQ7KH9j6WQKIR+cgMRrwxS0joK10kuHJb3RId/85jqAtq6JNF3d1qKHFUaMnu3bEaTOn6cS0Goe0MlmyMjgX6i3/NpD10cMkEe/6QFmkoWN629Ek3aFB+ijJa99nBs8hCrOhKXXv7d0nYN+rrjzBXAoxJU9p4Pxf/OJA==

**FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2022-03-18 12:01:10 | Firmante**

QZ4UD3Erczcp/i0YJOMvopIgeUOUc4DWJHZXluEh+kGZNAC7Meiea8AL7anYjIPKpsNyYh3SEe9JmW+H+eE3Ii8+YB3PapIbcvfflUT698GEihkVef68gqsbW90pOL1IW8gK2J/K8dAbrrbCl6hT/EU6SEfo+mhk1NDC1yIWKFoYdpnbYZEtPM0NWew300Hn63P6i2Q9Mvj6K0obQ5i1WmCRWzISfM8Vrg4ZkYOE/p2BCsCb5fTuBoUHcywiQ3OjBMN+AUO+1O4YbRc4qQnv+dxVzOjBpYDENpnLZagaEKmVII2yxGt5QYNIW14ZN0XyS2Km6kXxbfEFHhB7108g==

**JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA | Fecha:2022-03-22 16:55:08 | Firmante**

ChApcX+yangFM0u5chHyLJcJ6gNO56BJ86F5/625NJ1ZkplFSBbV75rB0IEL6OIAxgFejIXhPkgxskvfOyTsRc1t7k0bE51DSABQKn72tUihNQ3IGPWJQZig8DWdibNXLGX3WIORrm+t829AjB/dxy/1h4MnevSOGfqzu4B6COWykgdsVE8rUz8Q+9/8H5Grk+dGxqB0xUibSZDD9pizr/FDTIqHqZivbXuzcgC7exteVtUuO8EbrBwojXoffk6QjfvbtXPSQgxp1/xZSdqL+HzERli2rA/FRGF6H7T3i08EP9WVbbPyEIQZQEIdOYkKDXvB3d4Ug6TFPKxyYfCw==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o

escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

**bZrs3NoUJ**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qzCtNb7LbTGQI5f03BijZl6WZUdrXBB>